

ANDAMIOS POROSOS BASADOS EN SUPERFICIES MINIMALES TRIPLEMENTE PERIODICAS PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Lic. Alejandro González González¹, Dr. C. Marcelino Rivas Santana²

1, 2. Universidad de Matanzas, alejandro.glez@umcc.cu

Resumen

Este trabajo, hasta donde se tiene conocimiento, constituye una primera aproximación a la ingeniería de tejidos en nuestro país desde el punto de vista de la fabricación aditiva o impresión 3D. El objetivo es reflejar el estado del arte acerca del diseño y fabricación de andamios porosos utilizados en la regeneración de tejido óseo mediante estas técnicas. Se destacan las características ideales de los andamios, los materiales de fabricación con énfasis en el PLA como polímero termoplástico, los métodos de diseño convencionales y los basados en superficies minimales triplemente periódicas así como en combinaciones de ellas que dan lugar a los andamios funcionalizados con estructura porosa interna gradada. En cada tema se analizan críticamente los resultados más relevantes de la literatura escogida y se exponen los criterios de los autores.

Palabras claves: *Andamios porosos; superficies minimales triplemente periódicas; modelación por deposición fundida; ácido poliláctico; andamios funcionalmente gradados.*

Introducción

La ingeniería de tejidos es una rama de la bioingeniería que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias exactas y naturales para diseñar y fabricar sustitutos biológicos que mantengan, mejoren, restauren o reemplacen, parcial o totalmente, las funciones de órganos y tejidos en el cuerpo humano que se han perdido por causa de lesiones, envejecimiento o enfermedades (Chandra et al., 2020).

En esencia consiste en la fabricación de tejidos nuevos y funcionales a partir de células vivas usando una matriz o un andamio para guiar el desarrollo del nuevo tejido. Surge como una alternativa a los trasplantes de órganos debido a las dificultades asociadas a esta forma de medicina regenerativa como son la disponibilidad de órganos y tejidos compatibles para el trasplante, el rechazo inmune, infecciones, fracturas y cambios biológicos asociados con el implante de tejido de partes del cuerpo que no tienen la misma función biológica que la del sitio del implante (Chandra et al., 2020; Vacanti and Vacanti, 2014).

En las últimas dos décadas esta disciplina ha evolucionado continua y rápidamente incorporando los más recientes avances en el campo de los biomateriales, las tecnologías de bio-impresión 3D, la nanotecnología y las tecnologías de células madre y de edición genética. Hoy día es posible el diseño de biomateriales inteligentes que responden a las señales del medio ambiente local, la impresión de múltiples materiales biocompatibles (naturales y sintéticos), células y factores de crecimiento en un solo tejido tridimensional complejo con una red vascular funcional (Bandyopadhyay et al. 2015). En el área clínica ya están en uso muchos tejidos diseñados y fabricados por ingeniería tisular como cartílago, hueso, piel, tejido cardíaco y otros. En el laboratorio se han recreado versiones en miniatura (organoides) de algunos tipos de tejidos para uso *in vitro* en investigaciones sobre modelado de enfermedades, desarrollo de drogas y para funciones de diagnóstico (*organ-on-a-chip*, *body-on-a-chip*) mientras que el desarrollo de modelos 3D, de tejidos que emulan la estructura y fisiología de los tejidos vivos, está revolucionando nuestra comprensión de enfermedades complejas y acelerando el desarrollo de nuevas terapias para múltiples enfermedades y desórdenes (Chandra et al., 2020).

El hueso es el segundo tejido más trasplantado a nivel mundial con más de 4 millones de operaciones anuales donde se usan injertos óseos o materiales sustitutos (Turnbull et al., 2017). Aún cuando el hueso posee una determinada capacidad regenerativa, como puede verse sobre todo en la curación de fracturas, la ocurrencia de infecciones, traumas o el propio envejecimiento pueden dejar defectos óseos mayores que el tamaño crítico, haciendo imposible la regeneración natural. Las terapias de injertos naturales tienen un alcance y disponibilidad limitados por lo que se hace necesario el desarrollo de alternativas terapéuticas capaces de lidiar sobre todo con defectos óseos de grandes dimensiones.

La terapia regenerativa de hueso se apoya en dos principios fundamentales derivados de la habilidad intrínseca de este tejido para regenerarse: la no interferencia con el proceso regenerativo natural del cuerpo y la sinergia con los caminos curativos endógenos. Por lo

tanto, la idea es diseñar terapéuticas que se acoplen a la biología y la biomecánica natural del hueso (Shrivats et al., 2014). Una de las estrategias actuales en este sentido es la fabricación de andamios a partir de una variedad de métodos y biomateriales.

En este trabajo se realiza una revisión crítica de las investigaciones más actuales sobre diseño y fabricación de andamios porosos para la regeneración de tejidos y en particular para el tejido óseo. Se revisan los materiales, los métodos de fabricación y los factores de diseño que afectan el desempeño de los andamios para la regeneración de tejido óseo, enfatizando en el ácido poliláctico (PLA) como material, en los métodos de fabricación aditiva y sobre todo en el método de deposición fundida y se analizan los factores de diseño macroscópicos, microscópicos y geométricos. Se concluye que la estrategia más efectiva a nuestro alcance sería la fabricación de andamios porosos de PLA con estructura gradada basados en una arquitectura interna con superficie minimal triplemente periódica.

Desarrollo

Andamios para la regeneración de tejidos

Un andamio es una estructura de soporte sólida utilizada para injertos de tejidos y que, a partir de una serie de requisitos mecánicos, fisico-químicos y biológicos, es capaz de promover la regeneración del mismo. Su estructura interna debe poseer una red de poros interconectados para el transporte de nutrientes y productos de desecho celulares, así como para promover el crecimiento del nuevo tejido. Debe ser biocompatible, lo que se garantiza mediante grupos funcionales superficiales y volumétricos que permiten la adhesión celular y posterior proliferación, migración y diferenciación y debe ser biodegradable, con una tasa de degradación semejante a la tasa de crecimiento del nuevo tejido (Nikolova and Chavali 2019). Además, su diseño debe proporcionar los requisitos mecánicos apropiados de rigidez y resistencia mecánica de acuerdo a la aplicación que se desee (Kanczler et al., 2020).

Los andamios también sirven como vehículos para transportar moléculas bioactivas (citoquinas, inhibidores, drogas, antibióticos, etc) (Dorati et al., 2017) y como plantillas para la adhesión de células genéticamente transducidas, que establecen nuevos centros de regeneración y morfogénesis tisular, que pueden influir en las terapias de regeneración, lo que los convierte en andamios multifuncionales (Foroughi et al., 2020).

De acuerdo con su geometría, los andamios se pueden clasificar en fibrosos o porosos. Las estructuras fibrosas se fabrican generalmente de polímeros o de materiales compuestos dando preferencia a las nanofibras por encima de las microfibras debido a que la nanoescala permite imitar mejor la morfología de los tejidos *in vivo* (Chuan et al., 2020; Salerno et al., 2014; Valencia et al., 2016). Los andamios porosos pueden fabricarse de varios tipos de materiales y su principal característica es la red interconectada de poros que debe ser tal que permita la distribución celular, el transporte de sustancias, la integración con el tejido vivo de soporte y el crecimiento capilar, sin sacrificar las propiedades mecánicas de acuerdo al tipo de aplicación deseada (Abbasi et al., 2020).

La porosidad ideal de un andamio debe estar en el rango 60-90 % (Turnbull et al., 2017) aunque el tamaño de poros puede variar mucho de acuerdo al tipo de tejido que se desee replicar. Por ejemplo para favorecer el crecimiento de tejido muscular se requiere un rango de 50-200 μm en el tamaño de poros, mientras que para el tejido óseo es de 200-400 μm (Nikolova and Chavali 2019). Como regla general se acepta que el tamaño mínimo de poros que permite el crecimiento de nuevo tejido y la vascularización es de 100 μm (Babaie and Bhaduri 2018), mientras que los microporos (<10 μm) y los mesoporos (10-50 μm) promueven o modulan la adhesión celular, la absorción de proteínas y la diferenciación celular (Turnbull et al., 2017).

En el caso de los huesos, esto se debe al tamaño de los osteoblastos (10-50 μm) que prefieren los poros grandes (100-200 μm) para su adhesión y proliferación mientras que los poros menores que 100 μm se asocian con la formación de tejido fibroso (Abbasi, Hamlet, Love and Nguyen 2020). Los poros muy grandes (>400 μm) disminuyen la tasa de contacto célula-célula al disminuir el área superficial específica y las células pudieran experimentar un patrón de crecimiento bidimensional en lugar de uno tridimensional (Nikolova and Chavali 2019).

No obstante, estos resultados no son absolutos pues aunque se recomienda que el tamaño de poros esté en el rango 100-325 μm en el caso de andamios para huesos *in vitro* (Murphy et al., 2010) y la porosidad sea de un 90 %, se ha demostrado que quizás no sea necesario mantener este alto grado de porosidad, lo que puede llegar a comprometer la integridad mecánica del andamio, y que el tamaño de un poro individual puede llegar a ser el doble del tamaño recomendado sin afectar la proliferación celular (Gregor et al., 2017).

El hueso no tiene una estructura interna homogénea de poros sino una estructura jerárquica con un gradiente de porosidad y tamaño de poros, lo que sugiere que los andamios para implantes de hueso a base de biomateriales con una estructura de poros gradada (con gradiente) imitarían mejor las propiedades del hueso natural. Se ha reportado que una capa más porosa (como la del hueso esponjoso) contribuye más al crecimiento celular y transporte de nutrientes y productos de desecho, mientras que una capa más compacta (como la del hueso cortical) es más apropiada para soportar cargas mecánicas (Boccaccio et al., 2016).

También se ha reportado el empleo de andamios de policaprolactona (PCL) fabricados con una estructura homogénea de poros (100 y 750 μm) y con gradiente (100-700-100 μm y 700-100-700 μm) para evaluar la eficiencia del sembrado de osteoblastos en condiciones de cultivo estático. Se observó que los andamios con gradiente muestran unas propiedades mecánicas y morfológicas intermedias con respecto a los andamios con estructura homogénea de poros y que estos últimos mostraron una eficiencia de alrededor del 35 % con respecto a la de los andamios gradados que fue de un 70 % (Sobral et al., 2011).

Otro aspecto relacionado con la estructura interna de los andamios es la morfología de los poros, la cual depende del método o puede controlarse por diseño. El mecanismo mediante el cual las células sensan las características geométricas y mecánicas de su medio ambiente es complicado pero conocido (Werner et al., 2020). Se sabe que una mayor curvatura de la

superficie está asociada con una mayor tasa de crecimiento celular y que la formación de tejido se favorece en las superficies cóncavas (aquellas con la parte hundida dirigida al observador) mientras que las planas y convexas retrasan el crecimiento celular (Zadpoor, 2014) (Knychala et al., 2013).

Desde nuestro punto de vista el andamio más óptimo sería aquel que en primer lugar tenga en cuenta el tipo de tejido para el cual se fabrica y luego, de acuerdo a las posibilidades del material y del método a utilizar en su fabricación, tenga una estructura porosa con combinación de macroporos, microporos y si fuese necesario nanoporos con una morfología adecuada, que permita las diferentes funciones biológicas manteniendo un elevado grado de porosidad sin comprometer las propiedades mecánicas.

Materiales para fabricación de andamios porosos en regeneración tisular

A la hora de diseñar y fabricar un andamio para regeneración de tejido es necesario tener en cuenta el material a utilizar, el método de fabricación, el diseño de la estructura interna de la red porosa y la aplicación específica. Los diferentes métodos de fabricación de andamios permiten controlar una serie de factores de diseño geométrico macroscópicos y microscópicos, así como la escalabilidad. A su vez, los factores de diseño y fabricación determinan la eficacia biomecánica de los andamios *in vivo* e *in vitro* y estos factores a su vez dependen de las propiedades del material de fabricación (Kanczler et al., 2020).

Los materiales (biomateriales) más utilizados para la fabricación de andamios para la regeneración de tejidos son las cerámicas, polímeros (naturales y sintéticos), los metales y sus aleaciones y los materiales compuestos o composites. Dentro de las cerámicas tenemos la hidroxiapatita (HA), el dióxido de circonio (ZrO_2), el dióxido de titanio (TiO_2), sulfatos y silicatos de calcio, entre otros. Se utilizan fundamentalmente en aplicaciones de ortodoncia y para reparación de tejidos duros (Nikolova and Chavali 2019).

Los metales y aleaciones más utilizados en aplicaciones ortopédicas y dentales son el titanio y su aleación Ti_6Al_4V , el acero inoxidable (316L), la aleación Co-Cr y otras aleaciones (Babaie and Bhaduri 2018). Son los materiales más utilizados para implantes aún cuando no son biodegradables ni promueven el crecimiento de nuevo tejido. Sus propiedades más importantes, que los hacen elegibles para desarrollar implantes, son la rigidez y resistencia mecánicas, combinadas con una posible ausencia de respuesta inmune. No obstante pueden presentar problemas como el apantallado de esfuerzos, fatiga y problemas de fijación (Dorati et al., 2017). Los composites son materiales compuestos por mezclas de polímeros y de cerámicas con metales que tienen fundamentalmente las mismas aplicaciones que los metales y serán nuestro objeto de estudio en próximos trabajos.

Entre los materiales más utilizados en la industria biomédica están los polímeros naturales o sintéticos. Dentro de los naturales tenemos las proteínas (seda, colágeno, gelatina, actina, keratina) y los polisacáridos (alginato, quitosana, celulosa, dextrana, quitina, agarosa, etc). En el grupo de los polímeros sintéticos encontramos aquellos que son degradables

(poliésteres, polilactonas, policarbonatos, entre otros) y los no degradables como el polietileno (PE), politetrafluoroetileno (PTFE), polimetilmetacrilato (PMMA), entre otros (Nikolova and Chavali, 2019).

Las características de la interacción de los polímeros con las células vivas son las que los han hecho elegibles como materiales en la industria biomédica y aunque no existen principios generales para predecir el alcance de la adhesión, proliferación y crecimiento celular sobre las superficies de los polímeros, sí se puede decir que la naturaleza química y geométrica de estas superficies tiene consecuencias significativas en cuanto al uso de los polímeros en ingeniería tisular (Saltzman and Kyriakides, 2020).

En este sentido se destacan los polímeros biodegradables cuya superficie cambia dinámicamente en relación con el medio ambiente celular. Por ejemplo, se han fabricado andamios basados en policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico (PLA) con osteoblastos derivados de células madre adiposas y del tejido endotélico venoso umbilical para mejorar la osteogénesis en implantes craneales en ratas, observándose la formación de nuevo tejido (Kim et al. 2010). También se ha reportado la fabricación de andamios fibrosos utilizando el copolímero con ácido láctico del poliglicolato (PLGA) para implante de cartílago, observándose la formación de nuevo tejido alrededor del andamio pero no en el interior, lo que se atribuye al espaciamiento de las fibras en el andamio (Yen et al., 2009).

El PLA es un poliéster alifático formado por unidades de ácido láctico que es un ácido α -hidroxílico (un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo) con dos enantiómeros: D-ácido láctico (PDLA) y L-ácido láctico (PLLA) que se producen a partir de la fermentación bacteriana de azúcares simples en el almidón de maíz y la caña de azúcar. Es un polímero termoplástico, puede ser semi-cristalino o amorfo y es biocompatible por lo que no produce efectos tóxicos o carcinogénicos. Cuando es implantado en organismos vivos, se degrada por hidrólisis al ácido α -hidroxílico que luego se incorpora al ácido tricarbóxico y es excretado por el organismo (Farah et al. 2016). Esta propiedad y su biocompatibilidad son las que lo han convertido en objeto de interés en aplicaciones médicas como la construcción de andamios para diferentes aplicaciones (Oladapo et al., 2019).

No obstante, también tiene algunos inconvenientes tales como su baja tenacidad lo que lo limita para aplicaciones donde se requieran deformaciones plásticas con altos niveles de esfuerzos como la fabricación de placas y tornillos de fijación. Tiene una lenta tasa de degradación (3 a 5 años) y una relativamente alta hidrofobicidad lo que puede impedir la adhesión celular. Además es un compuesto inerte, sin grupos funcionales laterales reactivos, lo que limita su posible modificación tanto volumétrica como superficial (Farah, Anderson and Langer 2016). Una de las estrategias para superar estos inconvenientes ha sido la composición con biocerámicas, como la hidroxiapatita, mediante recubrimientos y modificaciones químicas (Dubinenko et al., 2019; Rocha et al., 2020; Shuai et al., 2020; Yan et al., 2020).

Tabla 1. Propiedades físicas del PLA

<i>Propiedad</i>	<i>Magnitud</i>
Densidad, ρ [g/cm ³]	1,21-1,25
Temperatura de transición vidriosa, T_g [°C]	45-60
Temperatura de fusión, T_m [°C]	150-162
Resistencia a la tracción, σ [MPa]	21-60
Resistencia a la tracción específica, σ^* [Nm/g]	16,8-48
Deformación última, ε [%]	2,5-6
Módulo de Young, E [GPa]	0.35-3.5
Módulo de Young específico, E^* [kNm/g]	0,28-2,80

En la Tabla 1 se muestran las propiedades físicas del PLA (Farah, Anderson and Langer 2016) que son de interés para este trabajo. Se destacan las propiedades específicas que se obtienen al dividir la magnitud de la propiedad original por la densidad del polímero y que son de utilidad si se quiere utilizar al polímero como elemento estructural sin necesidad de refuerzos. Ellas determinan las dimensiones necesarias para lograr cierta rigidez o resistencia mecánica (Farah, Anderson and Langer 2016). Debemos decir además que estas son las propiedades del PLA en estado no procesado y que siempre existirá una variación de las mismas al someter al polímero a diferentes procesos como, por ejemplo, la extrusión por fusión.

El PLA es el polímero biodegradable más extensamente estudiado y utilizado en aplicaciones (Farah et al., 2016). Existe una abundante literatura sobre la utilización del PLA en la fabricación de andamios porosos para tejido óseo ya sea simple o combinado con otro

material. Por ejemplo, se ha reportado la fabricación de andamios de PLA con partículas de fosfato de calcio que mejoran la hidrofiliidad, las propiedades mecánicas y la adhesión celular (Sahmani et al. 2019; Serra et al. 2013). Otro reporte indica el uso de andamios de PLA/HA con diferentes proporciones utilizando el método de impresión 3D para reproducir la estructura interna del hueso (Wu et al., 2019), mientras que en otro se analiza la viabilidad y el impacto económico de la fabricación de andamios porosos con PLA mediante tecnologías de impresión 3D (Gregor et al., 2017). Otros trabajos relacionados con la fabricación de andamios de PLA serán discutidos en el contexto de los métodos de fabricación y los factores de diseño.

Métodos de fabricación de andamios porosos para regeneración tisular

Los métodos de fabricación de andamios se pueden clasificar en convencionales, que crean una porosidad aleatoria y de prototipado rápido (PR), también llamados de manufactura aditiva (MA), que permiten controlar la porosidad, el tamaño de poros y la interconectividad desde el diseño del andamio. Algunos de los métodos convencionales para fabricar andamios porosos o fibrosos son el secado-congelado (*freeze-drying*), la lixiviación de solvente (*solvent casting and leaching*), el espumado por gas (*gas foaming*), espumado por sol-gel (*sol-gel foaming*), electro-rotación (*electrospinning*), separación de fases inducida térmicamente (*TIPS*), entre otros. Babaie y Bhaduri (2018) han publicado un excelente *review* donde detallan cada uno de los métodos correlacionados con los materiales y las aplicaciones biológicas. Una clasificación similar pero más reducida la podemos ver en el *review* de Eltom, Zhong y Muhammad 2019 (Eltom et al., 2019).

De forma general podemos concluir que los métodos convencionales generan poros de forma y tamaños aleatorios, aunque la interconectividad puede mejorar mucho mediante combinaciones de métodos. El tamaño de poros y la porosidad depende mucho del método y del material. Por ejemplo, para fabricar una estructura porosa altamente conectada con tamaños de poro homogéneos y mejor infiltración celular en polímeros se necesitan composites donde las propiedades de los componentes individuales garanticen la estructura deseada (Babaie and Bhaduri 2018). Además, los métodos convencionales sufren de otras desventajas como el uso de solventes orgánicos tóxicos, dificultades para la eliminación de partículas residuales de solvente de la matriz del andamio, largos tiempos de fabricación y baja reproducibilidad de las técnicas (Mota et al., 2016)

Los métodos PR pueden agruparse en acelulares, que imprimen materiales sin células vivas y los celulares. También pueden clasificarse en métodos que usan una fuente de energía directa (como un láser o un haz de electrones) o métodos que utilizan un agente aglutinante (*binder jetting*) (Bose et al., 2018). Otra forma de clasificarlos es por la forma en que se imprimen las capas de material: sistemas basados en resinas, en polvos, en extrusión y en goteo (Provaggi and Kalaskar 2017). Algunos de los métodos PR más conocidos son la sinterización selectiva por láser (SLS), la estereolitografía (SLA), la bioimpresión, la impresión por chorro de tinta (*injet printing*) y el modelado por deposición fundida (FDM).

Independientemente del método que sea, todos los métodos PR comparten una serie de características comunes. En todos ellos, a partir de un diseño digital, se crea un objeto físico añadiendo sucesivas capas de material. El objeto puede ser totalmente diseñado mediante un software CAD como SolidWorks o AutoCAD o puede ser la imagen digital de un objeto real que ha sido escaneado con un escáner 3D. La información del objeto se almacena en forma de una malla de puntos espaciales que es exportada en formato STL (*Surface Tessellation Language*) para el software de impresión que se encarga de organizar la información del objeto en capas, en un proceso conocido como *Slicing*, creando el G-code para comunicarse con la impresora 3D (Ngo et al., 2018).

En general los métodos PR son rápidos, lo que permite diseñar un mayor volumen de experimentos al disminuir el tiempo de fabricación, permiten mayor control sobre la arquitectura del andamio porque la pieza final es mucho más fiel al diseño computacional y permiten el uso de estrategias de diseño paramétrico, creando modelos con parámetros predefinidos que permiten de manera fácil y rápida su adaptación a diferentes pacientes a partir de la información adquirida de los mismos mediante imágenes de tomografía axial computarizada (TAC) o de resonancia magnética nuclear (RMN) (Mota et al., 2016).

En el método FDM un filamento de un polímero termoplástico es calentado en una boquilla a una temperatura cercana a la de fusión (T_m), alcanzando un estado semi-líquido para luego ser extruído sobre una plataforma antiadherente (Bhushan and Caspers, 2017). Las capas de material fundido se depositan una sobre otra siguiendo el patrón tridimensional previamente diseñado en el archivo STL y el polímero solidifica a temperatura ambiente. Las principales ventajas de este método son su bajo costo (Alagoz and Hasirci, 2019), facilidad de operación y mantenimiento y alta velocidad de impresión. Entre sus desventajas se destacan la pobre calidad superficial (Chohan et al., 2017), la apariencia de capas, el relativo limitado número de materiales termoplásticos y las malas propiedades mecánicas de las piezas impresas.

Estudios teóricos utilizando la Teoría de Laminado Clásica con elementos finitos apoyada en test mecánicos de tracción demuestran que las propiedades mecánicas de las probetas de P400-ABS (acrinonitrilo butadieno estireno) dependen considerablemente de la orientación de las fibras, de la orientación de la probeta respecto a la plataforma de impresión y del camino seguido por la boquilla durante la impresión (Martínez et al., 2012). Otros trabajos también reportan la influencia del espesor de capa, la velocidad de alimentación del filamento y la geometría de las probetas en el desempeño mecánico. En probetas de PLA se observó que las propiedades mecánicas aumentaron con el aumento del espesor de capa pero disminuyeron con el aumento de la velocidad de alimentación y que la impresión con la probeta en ZXY o vertical tiene las peores propiedades mecánicas (Chacón et al., 2017). Estos resultados se confirman en probetas de ABS con diferentes geometrías, aunque hay gran variabilidad de los resultados (Torrado y Roberson 2016).

El desempeño de diferentes marcas de impresoras 3D así como la influencia de la velocidad de extrusión, la temperatura de la boquilla y de la plataforma así como de las propiedades del diseño en las propiedades mecánicas ha sido rigurosamente analizado (Gendviliene et al.,

2020). En otro trabajo se analiza la influencia de varias de estas variables en las resistencias a la tracción, la flexión y al impacto y se encuentra que el factor más decisivo en la debilidad mecánica de las probetas fabricadas con ABS es la distorsión inter e intra capas (Sood et al., 2010).

El trabajo más completo en este sentido, hasta donde alcanza la amplitud de nuestra búsqueda bibliográfica, analiza una gran cantidad de variables del método de impresión que influyen en las propiedades mecánicas de las piezas y mediante la comparación de los resultados de varios métodos estadísticos y de optimización se concluye que las variables más determinantes son el espesor de capa, el ancho y orientación de los filamentos superpuestos (tramas) y los espacios de aire laterales en cada capa o entre capas adyacentes (Mohamed et al., 2015).

En general, los métodos de fabricación aditiva permiten controlar los aspectos morfológicos del andamio (tamaño, orientación e interconectividad de poros, porosidad) a diferencia de los métodos convencionales que generan porosidad aleatoria. Estos factores tienen gran influencia en las propiedades mecánicas de la estructura final, las cuales tienden a disminuir exponencialmente con el aumento de la porosidad (Hollister 2005; Zein et al., 2002). La arquitectura simple de los andamios homogéneos tiende a colapsar bajo altos esfuerzos mientras que la complejidad estructural de los andamios con una estructura porosa no uniforme tiende a recobrase de la deformación manteniendo el régimen elástico, algo de importancia crítica para los implantes (Sobral et al., 2011).

En nuestra opinión, el método de impresión por deposición fundida (FDM) con PLA como polímero termoplástico puede ser una alternativa viable para el diseño de andamios con buenas propiedades mecánicas y morfológicas que lo hagan elegible como candidato a futuros implantes para regeneración del tejido óseo.

El diseño de andamios para regeneración de tejido óseo

El primer aspecto a tener en cuenta en el diseño de un andamio para regeneración de tejido es precisamente qué tipo de tejido se desea replicar o imitar. En nuestro caso, estamos interesados en andamios para tejido óseo, por lo que el siguiente subepígrafe resume los aspectos fundamentales de los huesos, su estructura interna y propiedades.

Características del tejido óseo

Los huesos son tejidos dinámicos y metabólicamente activos, duros y resistentes a impactos y flexiones que forman parte del endoesqueleto de los vertebrados. Se componen de tejidos blandos y duros (óseo) y de una cubierta superficial de tejido conectivo fibroso llamada periostio en la diáfisis y de tejido conectivo cartilaginoso en la epífisis (Yokochi et al., 1991). El tejido blando del hueso lo componen el tejido adiposo (grasa) que está en la médula ósea amarilla de la diáfisis y el tejido hematopoyético que está en la médula ósea roja de la epífisis,

responsable de la producción de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas a partir de una célula madre hematopoyética pluripotencial (Lu et al., 2014).

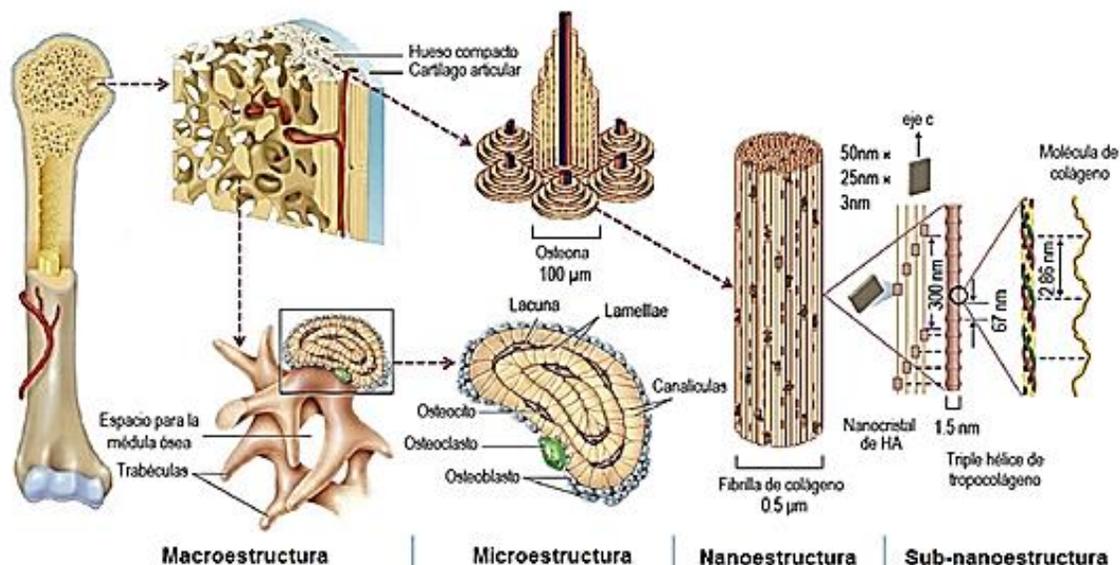


Figura 1. Estructura jerárquica estructural del hueso (Wang et al., 2016)

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo constituido por varios tipos de células: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar la matriz ósea y del mantenimiento, crecimiento y reparación del hueso. Proceden de las células osteoprogenitoras de la médula ósea (*bone marrow*) y del periostio y, al diferenciarse a través de diferentes factores de crecimiento, dan lugar a los osteocitos. Los osteoclastos se forman por la unión de varias células derivadas de una célula madre sanguínea y son las responsables de la resorción de la matriz ósea, o sea, degrada, absorbe y remodela los huesos. El tejido óseo representa la constitución general del hueso que es de un 9% de agua, 69% de minerales y 22% de colágenos y otras proteínas (Nikolova and Chavali 2019). El mineral fundamental del hueso es la hidroxiapatita (HA), una forma de fosfato de calcio cristalino que representa el 30-70 % de la masa de los huesos y dientes con una relación Ca/P de 1.67 (Oladapo et al., 2019).

El tejido óseo se organiza en dos estructuras principales: el hueso esponjoso y el hueso compacto o cortical. El hueso esponjoso está presente en todos los huesos llenando el espacio entre las láminas duras de los huesos planos y la epífisis de los huesos largos y está formado por una red interconectada de trabéculas óseas. En el centro de los huesos largos y por toda la longitud de la diáfisis, corre la cavidad medular revestida por el tejido conectivo más fino del endostio y donde se localiza la médula ósea amarilla. Alrededor de ella y radialmente hacia el periostio, está el hueso compacto compuesto de un arreglo de estructuras cilíndricas (osteonas o sistemas de Havers) orientadas paralelamente al eje longitudinal del hueso (Fig.

1). Cada osteona contiene láminas concéntricas de tejido óseo alrededor de un canal central con presencia de lagunas y canalículas que forman un sistema poroso altamente interconectado (Yokochi et al., 1991).

Tabla 2. Propiedades físico-mecánicas de los huesos (a=(Babaie and Bhaduri 2018), b=(Turnbull et al., 2017))

<i>Propiedad [unidad de medida]</i>	<i>Hueso Compacto</i>	<i>Hueso Esponjoso</i>
Porosidad [%]	5-13	30-90
Resistencia a la compresión [MPa]	130-180 ^a (100-230 ^b)	4-12
Resistencia a la flexión [MPa]	135-190	
Resistencia a la tracción [MPa]	50-151 ^{a,b}	1-6
Módulo de Young [GPa]	12-18 ^a (7-30 ^b)	0,1-0,5

En la Tabla 2 se resumen las propiedades principales de los huesos compacto y esponjoso que son de interés para este trabajo. Es de notar la diferencia entre los rangos publicados por dos referencias distintas en cuanto a los valores de resistencia a la compresión y el módulo de Young.

Métodos de diseño de andamios

En este epígrafe nos referiremos a los métodos de diseño de andamios para regeneración de tejido óseo utilizados por los métodos de PR debido a que este tipo de métodos permite un mayor control sobre la estructura interna (micro-geometría) de los andamios que los métodos convencionales que solo pueden controlar la geometría global del andamio.

Las microestructuras porosas de los andamios para regeneración tisular pueden clasificarse como irregulares y como periódicas o regulares. Las primeras no tienen una periodicidad fija y existe una distribución anisotrópica de los tamaños de poros. Las estructuras regulares o

periódicas se generan a partir de la repetición espacial de una unidad básica, también llamada celda unitaria (Fig 2).

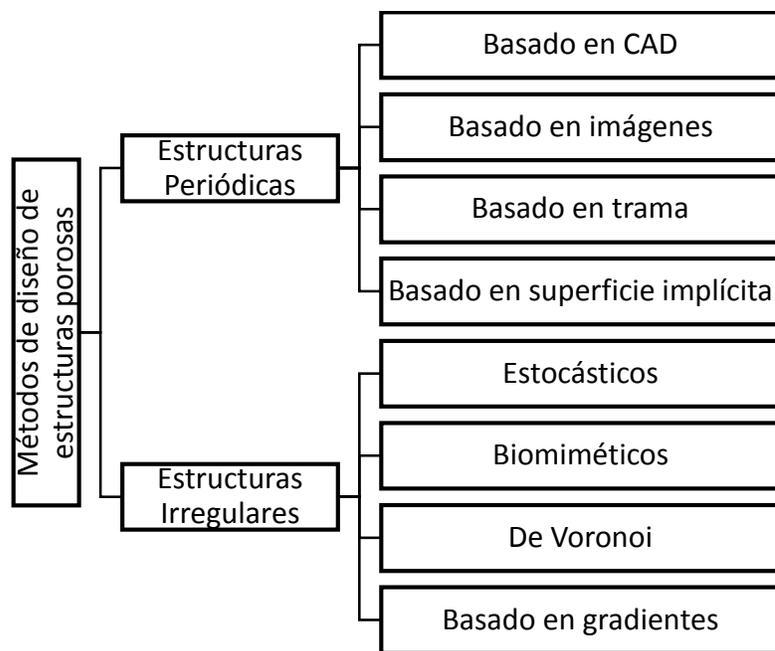


Figura 2. Métodos para generar estructuras porosas

Entre los métodos para generar estructuras irregulares tenemos el método biomimético que busca reproducir lo más fielmente posible la estructura interna de los huesos a partir de información de TAC y datos histológicos y los métodos estocásticos y de Voronoi (Gómez et al., 2016) que permiten simular la aleatoriedad de los tejidos naturales y trasladarla al diseño de andamios. Uno de estos métodos que ha recibido mucha atención últimamente es el desarrollo de lo que se llaman andamios funcionalmente gradados. Consiste en la fabricación de andamios con un gradiente de porosidad y/o tamaño de poros de forma tal que se asemeje un poco más a la estructura interna real de los huesos que no es totalmente uniforme ni homogénea (Giannitelli et al., 2014).

Para modelar estructuras porosas periódicas existen fundamentalmente cuatro métodos. El primero de ellos se basa en crear celdas unitarias a partir de sólidos fundamentales (cilindro, esfera, cono, cubo) que luego se usan para diseñar las geometrías de poliedros convexos o de Platón (tetraedro, cubo, octaedro, dodecaedro e icosaedro) y de los sólidos arquimedianos (los truncados de los sólidos platónicos). Estos sólidos se unen entre sí mediante operaciones Booleanas de intersección y unión utilizando algún software CAD como SolidWorks, AutoCAD, Siemens NX, CATIA y MIMICS (Ahmadi et al., 2015; Naing et al., 2005).

La modelación con software CAD de la estructura interna de los andamios a partir de estos sólidos elementales es tediosa y consume mucho tiempo sobre todo si es manual, por lo que algunos investigadores han creado librerías paramétricas con diferentes modelos de geometría interna que permiten seleccionar el tipo y tamaño de celda unitaria así como combinaciones de varias de ellas. Estos modelos se pueden replicar en el espacio y exportar a softwares de análisis por elementos finitos para realizar estudios de distribución de cargas y esfuerzos (Cheah et al., 2003a; b).

Aunque el método basado en CAD es muy poderoso para la modelación de las geometrías de los andamios, está relativamente automatizado y es el más ampliamente utilizado, aún carece de suficiente control sobre las propiedades biomecánicas de los andamios.

El segundo método se basa en la intersección de dos imágenes 3D binarias, donde los valores de los voxels son Booleanos representando el "sólido" o el "vacío" y donde una de las imágenes representa la forma del defecto óseo a ser reproducido (obtenido por imágenes médicas de TAC ó RMN) y la otra es el arreglo de celdas unitarias. El valor de cada voxel que representa lo que hay en cada celda unitaria puede ser generado por software CAD a partir de poliedros convexos, puede generarse de forma aleatoria o puede ser obtenido a partir de patrones derivados de imágenes médicas (Hollister 2005; Saito et al., 2010; Wu et al., 2019). Este es un método más rápido que el anterior y permite el uso de diferentes escalas para el diseño macro y microscópico. Su mayor limitación es la necesidad de grandes capacidades de almacenamiento y procesamiento de datos de imágenes.

El tercer método de modelación se basa en los patrones de tramas del método de fabricación por deposición fundida (FDM). En cada capa se puede variar el diámetro de los filamentos, su orientación y forma de apilado respecto a la capa adyacente, el espaciado y la altura de las capas para lograr diferentes tamaños y formas de poros, así como diferentes porosidades (Fig. 3). También es posible utilizar caminos curvilíneos recursivos (fractales) en el movimiento de la boquilla en el plano XY como la curva de Sierpinsky y de Hilbert (Giannitelli et al., 2014). Todos estos factores de diseño geométricos afectan la porosidad, las propiedades mecánicas y el desempeño biológico.

Los diseños más estudiados, basados en este método, son aquellas que tienen un patrón de trama (orientación de los filamentos de una capa respecto a los de la capa adyacente) de $0/90^\circ$ u ortogonal y de $45/135^\circ$ ó $60/120^\circ$ llamados diagonales (Fig 3). Una gran cantidad de trabajos se dedican al estudio de las propiedades de los andamios sobre la base de la variación de la geometría del diseño (Amirkhani et al., 2012; Cuan-Urquizo et al., 2019; Cuan-Urquizo et al., 2015; Lee et al., 2012; Malinauskas et al., 2015; Moroni et al., 2006; Norato and Johnson, 2011).

En este sentido se ha estudiado el efecto de trama en cuanto a la porosidad, difusividad y resistencia a la compresión en andamios de PLA con recubrimiento de pululano y ácido hialurónico encontrándose que la trama óptima es la ortogonal (Souness et al., 2017). También se han utilizado diferentes tramas en andamios de PCL con diferentes tramas para

estudiar su efecto en las propiedades mecánicas y se han encontrado diferencias en el comportamiento de las diferentes tramas aunque tanto la resistencia a la compresión y el límite de fluencia tienen una dependencia de ley de potencia con la porosidad, independientemente del tipo de trama o forma y tamaño de poros (Zein et al., 2002).

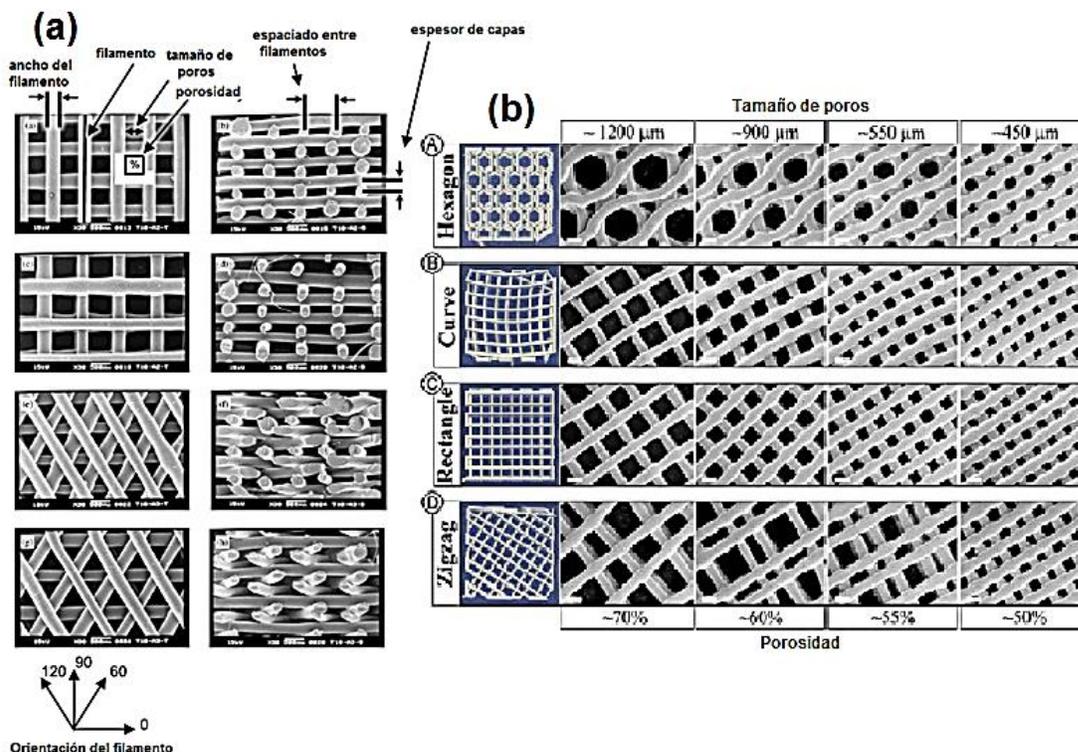


Figura 3. (a) Diferentes posiciones y orientaciones de los filamentos en fotografías SEM. Las cuatro de arriba con orientación 0/90° y las cuatro de abajo con orientación 0/60/120°. (b) Patrones de llenado de capas con tamaño de poros y porosidad (Gleadall et al., 2018).

En un excelente *review* se analiza la influencia de la estructura del andamio en la porosidad, propiedades mecánicas y desempeño biológico teniendo en cuenta una gran cantidad de variables de diseño geométrico (Gleadall et al., 2018). De forma general, cuando la geometría es tal que se logra un efecto columnar en la dirección de la carga aplicada, los ensayos mecánicos y las simulaciones coinciden en reportar un mejoramiento en las propiedades mecánicas de los andamios. También se puede concluir que este tipo de método de diseño no permite controlar totalmente las propiedades geométricas finales del andamio diseñado.

El cuarto método, y al que dedicaremos mayor atención, es el de superficies implícitas el cual permite la generación de estructuras celulares con un alto grado de complejidad. Las superficies son generadas a partir de ecuaciones matemáticas con varios parámetros que controlan el tamaño de la celda unitaria, de los poros, el espesor de la superficie y la porosidad unitaria. Uno de los candidatos más prometedores es el uso de superficies implícitas

pertenecientes a un determinado grupo de simetría espacial. Entre estas se destacan las superficies minimales triplemente periódicas.

Superficies Mínimas Triplemente Periódicas (SMTP)

Una superficie minimal es aquella que satisface el problema variacional de hallar la superficie orientable cerrada de menor área cuya frontera es una curva cerrada en el espacio (Carmo, 1976; Meeks III, 1990). Este problema data de 1760 cuando fue planteado por primera vez por Joseph Louis Lagrange y posteriormente reformulado por Joseph-Antoine Ferdinand Plateau al estudiar las superficies de las películas de jabón (Jr. 1966) por lo que hoy día se denomina un “problema de Plateau”. En 1776 Jean Baptiste Marie Meusnier halló varias superficies minimales y demostró que el problema se reduce a hallar aquellas superficies de curvatura media nula, aunque no existe solución a este problema en el caso general (Carmo, 1976).

La curvatura media $H = 1/2 (k_1 + k_2)$ involucra a las curvaturas principales en cada punto de la superficie. Para que $H = 0$, o bien $k_1 = k_2 = 0$ en cual caso se tendría el caso trivial de un plano o si se trata de puntos aislados se llaman puntos planos, o bien $k_1 = -k_2$ y la curvatura de Gaussiana ($k_1 k_2$) es siempre negativa por lo que cada punto de la superficie mínima será de ensilladura o hiperbólico (Cvijović and Klinowski, 1992). Si la superficie se expresa en la forma de Monge $z = z(x, y)$, Lagrange demostró que la condición necesaria para la existencia de la superficie minimal es que satisfaga la ecuación de Laplace-Young:

$$(1 + z_x^2)z_{xx} - 2z_x z_y z_{xy} + (1 + z_y^2)z_{yy} = 0$$

Donde z_x y z_y son las derivadas parciales. Aunque existen muchas de estas superficies, las más interesantes y de mayores aplicaciones técnicas son las superficies minimales triplemente periódicas (SMTP) que son aquellas que son periódicas en tres direcciones espaciales independientes y no se autointersectan, por lo que pertenecen a cierto grupo de simetría espacial (Fogden and Hyde, 1992) y dividen al espacio en dos sub-volúmenes conectados disjuntos llamados laberintos (Anderson et al., 1990).

Las primeras SMTP fueron determinadas por Schwarz (Schwarz, 1890) y la más conocida de todas es la superficie P (*Primitive*) de Schwarz, la cual puede ser deformada para tener cualquier tipo de simetría traslacional aunque se pierde la simetría de reflexión especular (Meeks III, 1990). En 1970 Alan Schoen halló una serie de superficies inscritas en celdas cristalográficas (Schoen 1970) sin demostrar matemáticamente su existencia, lo cual fue hecho por Karcher utilizando el método de superficie conjugada (Karcher, 1989). Dentro de las superficies más conocidas y estudiadas, además de la P (*Primitive*) de Schwarz, están la D (*Diamond*) de Schwarz y la G (*Gyroid*) de Schoen.

Modelado geométrico de las SMTP

Para generar las SMTP, como para cualquier superficie, existen tres métodos: el paramétrico, el implícito y el método de frontera. El método paramétrico consiste en utilizar una parametrización que aplica una región del plano en una superficie del espacio. Para las SMTP se utiliza la representación de Enneper-Weierstrass (Anderson et al., 1990; Rajagopalan y Robb, 2006) y una transformación de Bonnet (Carmo 1976) que queda definida por el ángulo de Bonnet siendo este igual a 0, 90° y 38.0147° para las superficies D, P y G respectivamente. El cálculo mediante esta representación es muy complicado e involucra soluciones analíticas de las funciones elípticas e hipergeométricas y además, las funciones de Weierstrass (el argumento de la representación) no son conocidas para otros tipos de superficies, por lo que este método no se usa en la práctica para generar las SMTP.

El método de frontera o de superficie conjugada se basa en la idea del problema de Plateau donde una pequeña superficie o parche inscrito en una celda cristalográfica con cierta simetría, es iterativamente refinado mediante criterios de optimización físicos y geométricos para crear la SMTP (Karcher and Polthier 1996; Rajagopalan and Robb 2006). Es un método muy complejo en lo técnico y lo computacional (Yoo, 2011a; b).

El método implícito hace uso de una función implícita de 3 variables reales y la SMTP es el lugar geométrico de los puntos donde la función tiene un valor (C) constante (superficie de nivel). Este método se basa en el desarrollo en series de Fourier:

$$\Psi(\vec{r}) = \sum_{\vec{k}} F(\vec{k}) \cos[2\pi\vec{k} \cdot \vec{r} - \alpha(\vec{k})] = C$$

que al ser truncada en el término principal nos da las aproximaciones nodales para las SMTP. Aquí $F(\vec{k})$ es el factor de estructura que depende de la simetría de la red cristalina, \vec{k} es el vector de la red recíproca y $\alpha(\vec{k})$ es un factor de fase.

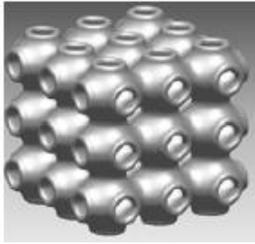
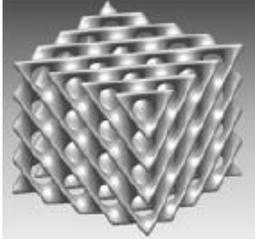
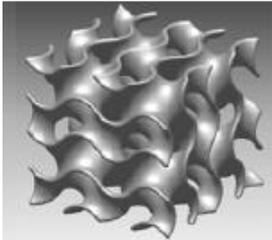
En particular las superficies P, D y G han sido las más estudiadas y representadas por este método (Gandy et al., 2001) por lo que en la Tabla 3 se presentan los datos fundamentales de estas tres superficies.

Tabla 3. Principales características de las superficies minimales triplemente periódicas más estudiadas.

<i>SMTP</i>	<i>Características</i>	<i>Figura (C=0)</i>
-------------	------------------------	---------------------

El diseño de andamios basado en SMTP

El interés por el uso de estas superficies para el modelado de andamios porosos proviene de dos direcciones diferentes. Por una parte se ha demostrado la existencia de este tipo de estructuras en la naturaleza, como por ejemplo en las alas de la especie de mariposa

<p>P</p>	<p><i>Nombre: Primitiva de Schwarz</i></p> <p><i>Ecuación: $\cos(X) + \cos(Y) + \cos(Z) = C$</i></p> <p><i>Tipo de simetría: cúbica (BCC)</i></p> <p><i>Grupo: $Im\bar{3}m$</i></p>	
<p>D</p>	<p><i>Nombre: Diamante</i></p> <p><i>Ecuación: $\cos(X) \cos(Y) \cos(Z) - \sin(X) \sin(Y) \sin(Z) = C$</i></p> <p><i>Tipo de simetría: cúbica (principal)</i></p> <p><i>Grupo: $Pn\bar{3}m$</i></p>	
<p>G</p>	<p><i>Nombre: Giroide</i></p> <p><i>Ecuación: $\cos(X) \sin(Y) + \cos(Y) \sin(Z) + \cos(Z) \sin(X) = C$</i></p> <p><i>Tipo de Simetría: cúbica (BCC)</i></p> <p><i>Grupo: $Ia\bar{3}d$</i></p>	

Callophrys rubi, donde se ha encontrado una estructura giroide o en la mitocondria de la especie de ameba *Chaos carolinense* donde coexisten al menos 2 estructuras SMTP (P, G o D) de acuerdo al régimen de inanición que se someta el cultivo (Han y Che, 2018). Por otra parte se ha demostrado que la estructura del hueso trabecular tiene una curvatura media cercana a cero, lo que es una propiedad de las SMTP (Bidan et al., 2013; Bobbert et al., 2017).

Existe una amplia bibliografía del uso de las SMTP en el diseño de andamios porosos, sobre todo para terapia regenerativa de hueso, utilizando diferentes enfoques. Para generar computacionalmente las estructuras, por ejemplo, se ha utilizado el software k3dsurf v.0.6.2 (<http://k3dsurf.sourceforge.net>) exportando a fichero CAD (formato STL) un juego de estructuras G y D con un gradiente de tamaños de poros y de porosidad, lo que se logró mediante la introducción de un término lineal en los valores "z" de la ecuación (Melchels et al. 2010). En varios trabajos relacionados, Dong-Jin Yoo (Yoo, 2011a; b; Yoo, 2012) desarrolla una metodología para primero diseñar celdas unitarias basadas en SMTP y luego replicarlas para rellenar el interior de diversas formas espaciales regulares (esferas, cilindros,

etc) y no regulares (huesos de diferentes tipos) basados en el algoritmo de campo de distancias y cubo marchante (*marching cube algorithm*).

En otro enfoque, se utiliza una metodología híbrida combinando el método implícito con geometría fractal apoyado en imágenes de TAC (Shi et al., 2018) para generar las superficies triplemente periódicas. Siguiendo la línea del desarrollo de celdas unitarias repetibles para formar la estructura interna de los andamios, un trabajo muy interesante muestra cómo utilizar imágenes 2D para generar la celda unitaria 3D en un enfoque más de diseño CAD que matemático (Mohammed y Gibson 2018).

La influencia de la arquitectura interna de los andamios en el desempeño biológico es también otro factor a tener en cuenta en el diseño. La influencia de la arquitectura porosa en el cultivo de células estático fue evaluada para una estructura giroide fabricada por SLA y otra con arquitectura aleatoria obtenida por el método convencional de lixiviación. Se halló que la estructura G, aunque tiene iguales valores de tamaño de poros y porosidad que la estructura aleatoria, mostró una permeabilidad 10 veces superior y que la estructura G distribuye más homogéneamente los esfuerzos que las estructuras con simetría cúbica (Melchels et al., 2010).

También se ha evaluado la proliferación celular midiendo el contenido de ADN en estructuras hechas con PLA y alúmina con geometría D-Schwarz y geometría regular de poros ortogonales. El resultado es que la geometría tipo SMTP da los mejores resultados en cuanto a adhesión y proliferación (Ramírez et al., 2019).

Recientemente se ha demostrado que cuando el tejido crece en superficies curvas, se desarrollan formas con superficies externas de curvatura media constante. La cantidad de tejido formado depende de la forma del sustrato y se deposita mayor cantidad en las superficies cóncavas, por lo que las formas en que crece el tejido son similares a las formas de equilibrio de los líquidos (tensión superficial). En aquellas superficies con simetría rotacional, el tejido se mantiene acotado por superficies de curvatura media constante y su velocidad de crecimiento depende de la curvatura (Ehrig et al., 2019).

La regulación geométrica de la remodelación ósea (acción de los osteoclastos) es determinada por factores como la porosidad, que determina la velocidad de secreción (volumen de hueso formado por célula en la unidad de tiempo) y la curvatura, que determina cuán rápido se llenan los poros corticales durante la osteoconducción (Alias and Buenzli 2018). Sin embargo en otros tipos de tejidos, como el muscular, la curvatura puede provocar el desprendimiento celular (Yamashita et al., 2013).

Jung y Torquato, 2005 han demostrado que entre las estructuras P, G y una de geometría irregular, la estructura de mayor permeabilidad a fluido es la primitiva de Schwarz (P) y que los valores máximos se alcanzan por aquellas estructuras que minimizan su área superficial, o sea, con curvatura media nula (Jung and Torquato 2005). En un estudio con 8 SMTP, entre las que se incluyen la P, D y G, fabricadas por SLA con poli-trimetileno carbonato, se ha

reportado que las estructuras tienen curvaturas (Gaussiana) y distribución de la curvatura diferentes. Además, para un mismo nivel de porosidad y mismo número de celdas unitarias se reporta que las estructuras P, G y D tienen las mayores permeabilidades a fluido, lo que indica una estructura porosa más interconectada (Blanquer et al., 2017).

Cuando se diseñan estructuras basadas en SMTP hay que tener en cuenta que la superficie divide al espacio de la celda unitaria en dos laberintos disjuntos. La mayoría de los softwares CAD rellenan uno de los laberintos de material sólido y dejan el otro abierto, por lo que para un valor de $C=0$ la porosidad de la celda unitaria es 50%. Pero también es posible por un lado cambiar el valor de C y por el otro lado darle “espesor” a la superficie, lo cual varía los valores de porosidad global y los tamaños de poros al variar la fracción de volumen del espacio vacío (Blanquer, Werner, Hannula, Sharifi, Lajoine, Eglin, Hyttinen, Poot and Grijpma 2017; Yoo 2011b). De esta manera se distingue entre sólidos en red (*network solids*) y en lámina (*sheet solids*) que tienen una SMTP con espesor. Los estudios comparativos utilizando elementos finitos entre ambas estructuras con un mismo nivel de porosidad demostraron que los *sheet* tienen mejores propiedades mecánicas que los *network* en un amplio rango de porosidades (Kapfer et al. 2011). Además, el incremento del espesor disminuye la porosidad y mejora las propiedades mecánicas mientras que el incremento del radio de la superficie (tamaño de poros) aumenta la porosidad pero disminuye el desempeño mecánico (Almeida y Bártolob, 2014).

En cuanto a las propiedades mecánicas, existe evidencia de trabajos muy completos donde se combinan métodos experimentales y computacionales para correlacionar las propiedades mecánicas con la estructura (Maskery et al. 2017; Montazerian et al. 2017; Restrepo et al. 2017). En todos ellos se puede ver que una de las estructuras de mejores propiedades mecánicas es la primitiva (P) de Schwarz.

Estructuras porosas gradadas basadas en SMTP

Las propiedades individuales de las distintas estructuras SMTP pueden combinarse de forma tal que se logre una transición continua en las propiedades morfológicas (porosidad, tamaño y distribución de poros, etc) en una estructura nueva que se ha dado llamar Andamios Funcionalmente Gradados (AFG). En (Maskery et al., 2017) se ha determinado que el mecanismo de deformación básico de la estructura P es mediante estiramiento y pandeo de los filamentos, mientras que en las estructuras G y D el mecanismo es por doblamiento. Asimismo, la estructura P exhibe las mejores propiedades mecánicas de las tres. Una cuestión interesante es el análisis de las propiedades de los andamios al ser funcionalizados con un gradiente de porosidad en la misma estructura (P, D o G) o cuando se combinan varias de ellas y estudiar si se mantienen los mecanismos de deformación de las estructuras gradadas o aparecen otros nuevos.

En este sentido se ha estudiado la gradación lineal de la densidad relativa (porosidad) en andamios con estructura P y D en un rango del 30 al 60 %. A partir de los resultados experimentales y de las simulaciones realizadas en ABAQUS se determinó que los

mecanismos de deformación de estas estructuras gradadas “puras” se mantienen hasta cierto grado de porosidad pero si este aumenta, el mecanismo cambia (Afshar et al., 2016). En otra investigación, se ha comparado el desempeño de una estructura G gradada con otra uniforme en cuanto al mecanismo de compresión con resultados similares (Zhang et al., 2020).

Dos resultados muy interesantes nos permiten combinar varias estructuras SMTP, por ejemplo una P y una G ó una G y una D mediante la combinación de funciones a partir de un código en el software Mathematica. La combinación se hace a partir de una función sigmoide o utilizando la función de base radial Gaussiana para los casos más generales y complicados. En esta metodología es posible variar la forma y tamaño de los poros mediante la manipulación de los parámetros de cada estructura SMTP por separado, es posible establecer un gradiente de porosidad en cada estructura y uno en todo el andamio y es posible empotrar la estructura final dentro de un sólido predefinido (como un cilindro) lo cual es útil para preparar probetas, ya sea para estudios experimentales siguiendo determinada norma ASTM, como para estudios computacionales mediante elementos finitos (Yang et al., 2014; Yang y Zhou, 2014).

CONCLUSIONES

Un andamio poroso para regeneración de tejido óseo debe tener una porosidad en el rango 60-90%, tamaños de poros en el rango 200-400 μm y hasta el doble de estos valores y fabricarse de un material biocompatible y biodegradable que permita adecuadas propiedades mecánicas de acuerdo al tipo de hueso que se desee replicar. La estructura de poros debe ser altamente interconectada con superficies cóncavas de curvatura media nula que imitan las características internas del hueso trabecular.

El PLA es el polímero termoplástico más ampliamente estudiado y empleado en la fabricación de andamios porosos. En nuestro trabajo hemos escogido este material por ser biocompatible, biodegradable y por su disponibilidad en forma de filamento para impresión 3D en nuestro laboratorio.

El método de fabricación aditiva conocido como modelación por deposición fundida (FDM) es uno de los más populares por su relativa facilidad de uso y mantenimiento, su rapidez de impresión, su bajo costo, relativa resolución espacial y capacidad para operar en diferentes condiciones con diversos materiales termoplásticos. Por todas estas razones en esta investigación hemos escogido este método de fabricación que además, está disponible en nuestro laboratorio.

El diseño de andamios porosos basado en superficies minimales triplemente periódicas permite controlar la microestructura interna del andamio desde la fase de diseño mediante funciones matemáticas previamente determinadas.

Las propiedades deseadas en una estructura de andamio para una aplicación específica se pueden conseguir mediante la funcionalización mediante gradientes de porosidad y

combinaciones de celdas unitarias basadas en SMTP que permiten un modelo más cercano a la realidad trabecular del hueso humano.



Monografías 2020
Universidad de Matanzas © 2020
ISBN:

Referencias bibliográficas

ABBASI, N., S. HAMLET, R. M. LOVE AND N.-T. NGUYEN Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2020/03/01/ 2020, 5(1), 1-9.

AFSHAR, M., A. P. ANARAKI, H. MONTAZERIAN AND J. KADKHODAPOUR Additive manufacturing and mechanical characterization of graded porosity scaffolds designed based on triply periodic minimal surface architectures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2016.

AHMADI, S. M., S. A. YAVARI, R. WAUTHLE, B. POURAN, et al. Additively Manufactured Open-Cell Porous Biomaterials Made from Six Different Space-Filling Unit Cells: The Mechanical and Morphological Properties. *Materials*, 2015, 8, 1871-1896.

ALAGOZ, A. S. AND V. HASIRCI 3D printing of polymeric tissue engineering scaffolds using open-source fused deposition modeling. *Emergent Materials*, 2019/09/07 2019.

ALIAS, M. A. AND P. R. BUENZLI Osteoblasts infill irregular pores under curvature and porosity controls: A hypothesis-testing analysis of cell behaviours. *BUSCAR arXiv:1711.08548v2 [q-bio.CB]* 6 Apr 2018, 2018.

ALMEIDA, H. A. AND P. J. BÁRTOLOB Design of tissue engineering scaffolds based on hyperbolic surfaces: Structural numerical evaluation. *Medical Engineering & Physics*, 2014, 36, 1033-1040.

AMIRKHANI, S., R. BAGHERI AND A. ZEHTAB YAZDI Effect of pore geometry and loading direction on deformation mechanism of rapid prototyped scaffolds. *Acta Materialia*, 2012/04/01/ 2012, 60(6), 2778-2789.

ANDERSON, D., H. DAVIS, J. NITSCHKE AND L. SCRIVEN. Periodic surfaces of prescribed mean curvature. In *Physics of amphiphilic layers*. Springer, 1990, p. 130-130.

BABAIE, E. AND S. B. BHADURI Fabrication Aspects of Porous Biomaterials in Orthopedic Applications: A Review. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2018/01/08 2018, 4(1), 1-39.

BANDYOPADHYAY, A., S. VAHABZADEH, A. SHIVARAM AND S. BOSE Three-dimensional printing of biomaterials and soft materials. *MRS Bulletin*, 2015, 40(12), 1162-1169.

BHUSHAN, B. AND M. CASPERS An overview of additive manufacturing (3D printing) for microfabrication. *Microsyst. Technol.*, 2017, 23(4), 1117-1124.

BIDAN, C. M., F. M. WANG AND J. W. DUNLOP A three-dimensional model for tissue deposition on complex surfaces. *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering*, 2013, 16(10), 1056-1070.

BLANQUER, S. B., M. WERNER, M. HANNULA, S. SHARIFI, et al. Surface curvature in triply-periodic minimal surface architectures as a distinct design parameter in preparing advanced tissue engineering scaffolds. *BioFa*, 2017, 9(2), 025001.

BOBBERT, F., K. LIETAERT, A. A. EFTEKHARI, B. POURAN, et al. Additively manufactured metallic porous biomaterials based on minimal surfaces: A unique combination of topological, mechanical, and mass transport properties. *Acta Biomaterialia*, 2017, 53, 572-584.

BOCCACCIO, A., A. E. UVA, M. FIORENTINO, G. MORI, et al. Geometry Design Optimization of Functionally Graded Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Mechanobiological Approach. *PLOS ONE*, 2016, 11(1), e0146935.

BOSE, S., D. KE, H. SAHASRABUDHE AND A. BANDYOPADHYAY Additive manufacturing of biomaterials. *Progress in Materials Science*, 2018/04/01/ 2018, 93, 45-111.

CARMO, M. P. D. *Differential Geometry of Curves and Surfaces*. Edtion ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1976.

CUAN-URQUIZO, E., E. BAROCIO, V. TEJADA-ORTIGOZA, R. B. PIPES, et al. Characterization of the mechanical properties of FFF structures and materials: A review on the experimental, computational and theoretical approaches. *Materials*, 2019, 12(6), 895.

CUAN-URQUIZO, E., S. YANG AND A. BHASKAR 2015. Mechanical characterisation of additively manufactured material having lattice microstructure. In *Proceedings of the IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 2015.

CVIJOVIĆ, D. AND J. KLINOWSKI The T and CLP families of triply periodic minimal surfaces. Part 1. Derivation of parametric equations. *Journal de Physique I*, 1992, 2(2), 137-147.

CHACÓN, J. M., M. A. CAMINERO, E. GARCÍA-PLAZA AND P. J. NÚÑEZ Additive manufacturing of PLA structures using fused deposition modelling: Effect of process parameters on mechanical properties and their optimal selection. *Materials & Design*, 2017/06/15/ 2017, 124, 143-157.

CHANDRA, P. K., S. SOKER AND A. ATALA. Tissue engineering: current status and future perspectives. In R. LANZA, R. LANGER, J.P. VACANTI AND A. ATALA. *Principles of Tissue Engineering*. United States of America: Elsevier Inc., 2020.

CHEAH, C. M., C. K. CHUA, K. F. LEONG AND S. W. CHUA Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 1: Investigation and Classification. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 2003/02/01 2003a, 21(4), 291-301.

CHEAH, C. M., C. K. CHUA, K. F. LEONG AND S. W. CHUA Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 2: Parametric Library and Assembly Program. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 2003/02/01 2003b, 21(4), 302-312.

CHOHAN, J. S., R. SINGH, K. S. BOPARAI, R. PENNA, et al. Dimensional accuracy analysis of coupled fused deposition modeling and vapour smoothing operations for biomedical applications. *Composites Part B*, 2017.

CHUAN, D., R. FAN, Y. WANG, Y. REN, et al. Stereocomplex poly(lactic acid)-based composite nanofiber membranes with highly dispersed hydroxyapatite for potential bone tissue engineering. *Composites Science and Technology*, 2020, 192(108107).

DORATI, R., A. DETRIZIO, T. MODENA, B. CONTI, et al. Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy. *Pharmaceuticals*, 2017, 10(96), 1-21.

DUBINENKO, G. E., A. L. ZINOVIEV, E. N. BOLBASOV, V. T. NOVIKOV, et al. Preparation of Poly(L-lactic acid)/Hydroxyapatite composite scaffolds by fused deposit modeling 3D printing. *Materials Today: Proceedings*, 2019, 22, 228-234.

EHRIG, S., B. SCHAMBERGER, C. M. BIDAN, A. WEST, et al. Surface tension determines tissue shape and growth kinetics. *Science Advances*, 2019, 5(eaav9394), 1-8.

ELTOM, A., G. ZHONG AND A. MUHAMMAD Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 2019.

FARAH, S., D. G. ANDERSON AND R. LANGER Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016/12/15/ 2016, 107, 367-392.

FOGDEN, A. AND S. T. HYDE Parametrization of triply periodic minimal surfaces. II. Regular class solutions. *Acta Crystallographica Section A*, 1992, 48(4), 575-591.

FOROUGHI, F., A. BIGHAM, E. R. GHOMI, M. RAFIENIA, et al. Multifunctional Bone Scaffolds: From Regeneration to Bone Cancer Therapy. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 2020, 27(5).

GANDY, P. J. F., S. BARDHAN, A. L. MACKAY AND J. KLINOWSKI Nodal surface approximations to the P,G,D and I-WP triply periodic minimal surfaces. *Chemical Physics Letters*, 2001/03/16/ 2001, 336(3), 187-195.

GENDVILIENE, I., E. SIMOLIUNAS, S. REKSTYTE, M. MALINAUSKAS, et al. Assessment of the morphology and dimensional accuracy of 3D printed PLA and PLA/HAP scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2020.

GIANNITELLI, S. M., D. ACCOTO, M. TROMBETTA AND A. RAINER Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2014/02/01/ 2014, 10(2), 580-594.

GLEADALL, A., D. VISSCHER, J. YANG, D. THOMAS, et al. Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. *Burns & Trauma*, 2018/07/03 2018, 6(1), 19.

GÓMEZ, S., M. D. VLAD, J. LÓPEZ AND E. FERNÁNDEZ Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2016/09/15/ 2016, 42, 341-350.

GREGOR, A., E. FILOVÁ, M. NOVÁK, J. KRONEK, et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of Biological Engineering*, 2017, 11(31), 1-21.

HAN, L. AND S. CHE An Overview of Materials with Triply Periodic Minimal Surfaces and Related Geometry: From Biological Structures to Self-Assembled Systems. *Advanced Materials*, 2018, 30(17), 1705708.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 2005/07/01 2005, 4(7), 518-524.

JR., F. J. A. *Plateau's problems: an invitation to varifold geometry*. edited by R. GUNNING AND H. ROSSI. Edtion ed. New York: W. A. Benjamin, Inc., 1966.

JUNG, Y. AND S. TORQUATO Fluid permeabilities of triply periodic minimal surfaces. *Physical Review E*, 2005, 72(5), 056319.

KANCZLER, J. M., J. A. WELLS, D. M. R. GIBBS, K. M. MARSHALL, et al. Bone tissue engineering and bone regeneration. In R. LANZA, R. LANGER, J.P. VACANTI AND A. ATALA. *Principles of Tissue Engineering*. United States of America: Elsevier Inc., 2020.

KAPFER, S. C., S. T. HYDE, K. MECKE, C. H. ARNS, et al. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. *Biomaterials*, 2011/10/01/ 2011, 32(29), 6875-6882.

KARCHER, H. The triply periodic minimal surfaces of Alan Schoen and their constant mean curvature companions. *manuscripta mathematica*, 1989/09/01 1989, 64(3), 291-357.



KARCHER, H. AND K. POLTHIER Construction of triply periodic minimal surfaces. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 1996, 354(1715), 2077-2104.

KIM, J. Y., G.-Z. JIN, I. S. PARK, J.-N. KIM, et al. Evaluation of Solid Free-Form Fabrication-Based Scaffolds Seeded with Osteoblasts and Human Umbilical Vein Endothelial Cells for Use In Vivo Osteogenesis. *Tissue Engineering: Part A*, 2010, 16(7), 2229-2236.

KNYCHALA, J., N. BOUROPOULOS, C. J. CATT, O. L. KATSAMENIS, et al. Pore Geometry Regulates Early Stage Human Bone Marrow Cell Tissue Formation and Organisation. *Annals of Biomedical Engineering*, 2013/05/01 2013, 41(5), 917-930.

LEE, J. S., H. D. CHA, J. H. SHIM, J. W. JUNG, et al. Effect of pore architecture and stacking direction on mechanical properties of solid freeform fabrication- based scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, 100(7), 1846-1853.

LU, S.-J., E. A. KIMBREL, Q. FENG, F. LI, et al. Blood Components from Pluripotent Stem Cells. In R. LANZA, R. LANGER AND J.P. VACANTI eds. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, 2014.

MALINAUSKAS, M., E. SKLIUTAS, L. JONUŠAUSKAS, D. MIZERAS, et al. *Tailoring bulk mechanical properties of 3D printed objects of polylactic acid varying internal micro-architecture*. Edition ed.: SPIE, 2015.

MARTÍNEZ, J., J. L. DIÉGUEZ, J. E. ARES, A. PEREIRA, et al. Modelization and Structural Analysis of FDM Parts. *AIP Conf. Proc.*, 2012, 1431, 842-848.

MASKERY, I., L. STURM, A. O. AREMU, A. PANESAR, et al. Insights into the mechanical properties of several triply periodic minimal surface lattice structures made by polymer additive manufacturing. *Polymer*, 2017.

MEEKS III, W. H. The theory of triply periodic minimal surfaces. *Indiana University Mathematics Journal*, 1990, 877-936.

MELCHELS, F. P., K. BERTOLDI, R. GABBRIELLI, A. H. VELDERS, et al. Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography. *Biomaterials*, 2010, 31(27), 6909-6916.

MOHAMED, O. A., S. H. MASOOD AND J. L. BHOWMIK Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. *Advances in Manufacturing*, 2015/03/01 2015, 3(1), 42-53.

MOHAMMED, M. I. AND I. GIBSON Design of Three-Dimensional, Triply Periodic Unit Cell Scaffold Structures for Additive Manufacturing. *Journal of Mechanical Design*, 2018, 140, 071701-071710 : 071701-071710.

MONTAZERIAN, H., E. DAVOODI, M. ASADI-EYDIVAND, J. KADKHODAPOUR, et al. Porous scaffold internal architecture design based on minimal surfaces: A compromise between permeability and elastic properties. *Materials & Design*, 2017.

MORONI, L., J. R. DE WIJN AND C. A. VAN BLITTERSWIJK 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials*, 2006/03/01/ 2006, 27(7), 974-985.

MOTA, R. C. D. A. G., E. O. DA SILVA, F. F. DE LIMA, L. R. DE MENEZES, et al. 3D printed scaffolds as a new perspective for bone tissue regeneration: literature review. *Materials Sciences and Applications*, 2016, 7(8), 430-452.

MURPHY, C. M., M. G. HAUGH AND F. J. O'BRIEN The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2010, 31(3), 461-466.

NAING, M. W., C. K. CHUA, K. F. LEONG AND Y. WANG Fabrication of customised scaffolds using computer- aided design and rapid prototyping techniques. *Rapid Prototyping Journal*, 2005, 11(4), 249-259.

NGO, T. D., A. KASHANI, G. IMBALZANO, K. T. Q. NGUYEN, et al. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B*, 2018, 143, 172-196.

NIKOLOVA, M. P. AND M. S. CHAVALI Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, 2019, 4, 271-292.

NORATO, J. A. AND A. J. W. JOHNSON A Computational and Cellular Solids Approach to the Stiffness-Based Design of Bone Scaffolds. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2011, 133, 091003-091001:8091003-8091001.

OLADAPO, B. I., S. A. ZAHEDI AND A. O. M. ADEOYE 3D printing of bone scaffolds with hybrid biomaterials. *Composites Part B*, 2019, 158, 428-436.

PROVAGGI, E. AND D. M. KALASKAR. 3D printing families: laser, powder, nozzle based techniques. In D.M. KALASKAR ed. *3D Printing in Medicine*. Woodhead Publishing, 2017.

RAJAGOPALAN, S. AND R. A. ROBB Schwarz meets Schwann: Design and fabrication of biomorphic and durataxic tissue engineering scaffolds. *Medical Image Analysis*, 2006, 10, 693-712.

RAMÍREZ, J. A., V. OSPINA, A. A. ROZO, M. I. VIANA, et al. Influence of geometry on cell proliferation of PLA and alumina scaffolds constructed by additive manufacturing. *Journal of Materials Research*, 2019, Invited Paper, 1-9.

RESTREPO, S., S. OCAMPO, J. A. RAMÍREZ, C. PAUCAR, et al. Mechanical properties of ceramic structures based on Triply Periodic Minimal Surface (TPMS) processed by 3D printing. *Journal of Physics: Conference Series*, 2017, 935(012036).

ROCHA, C. R., D. CHÁVEZ-FLORES, N. ZUVERZA-MENA, A. DUARTE, et al. Surface organo-modification of hydroxyapatites to improve PLA/HA compatibility. *Journal of Applied Polymer Science*, 2020, n/a(n/a), 49293.

SAHMANI, S., A. KHANDAN, S. ESMAEILI, S. SABER-SAMANDARI, et al. Calcium phosphate-PLA scaffolds fabricated by fused deposition modeling technique for bone tissue applications: Fabrication, characterization and simulation. *Ceramics International*, 2020/02/01/ 2019, 46(2), 2447-2456.

SAITO, E., H. KANG, J. M. TABOAS, A. DIGGS, et al. Experimental and computational characterization of designed and fabricated 50:50 PLGA porous scaffolds for human trabecular bone applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010/08/01 2010, 21(8), 2371-2383.

SALERNO, A., M. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, J. SAN ROMÁN DEL BARRIO AND C. D. PASCUAL Macroporous and nanometre scale fibrous PLA and PLA–HA composite scaffolds fabricated by a bio safe strategy. *RSC Advances*, 2014, 4(106), 61491-61502.

SALTZMAN, W. M. AND T. R. KYRIAKIDES. Cell interactions with polymers. In R. LANZA, R. LANGER, J.P. VACANTI AND A. ATALA eds. *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, 2020.

SCHOEN, A. Infinite periodic minimal surfaces without self-intersections. Cambridge, MA: 1970. D-5541.

SCHWARZ, K. H. A. *Gesammelte Mathematische Abhandlungen*. In. Berlin: Springer, 1890.

SERRA, T., J. A. PLANELL AND M. NAVARRO High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomaterialia*, 2013/03/01/ 2013, 9(3), 5521-5530.

SHI, J., J. YANG, L. ZHU, L. LI, et al. A Porous Scaffold Design Method for Bone Tissue Engineering Using Triply Periodic Minimal Surfaces. *Special Section On Advanced Signal Processing Methods In Medical Imaging*, 2018, 6, 1015-1022.

SHRIVATS, A. R., P. ALVAREZ, L. SCHUTTE AND J. O. HOLLINGER. Bone Regeneration. In R. LANZA, R. LANGER AND J.P. VACANTI. *Principles of Tissue Engineering*. United States of America: Elsevier Inc., 2014.

SHUAI, C., L. YU, P. FENG, C. GAO, et al. Interfacial reinforcement in bioceramic/biopolymer composite bone scaffold: The role of coupling agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 193(111083).

SOBRAL, J. M., S. G. CARIDADE, R. A. SOUSA, J. F. MANO, et al. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7, 1009–1018.

SOOD, A. K., R. K. OHDAR AND S. S. MAHAPATRA Parametric appraisal of mechanical property of fused deposition modelling processed parts. *Materials & Design*, 2010, 31(1), 287-295.

SOUNESS, A., F. ZAMBONI, G. M. WALKER AND M. N. COLLINS Influence of scaffold design on 3D printed cell constructs. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2017, 00B(00).

TORRADO, A. R. AND D. A. ROBERSON Failure Analysis and Anisotropy Evaluation of 3D-Printed Tensile Test Specimens of Different Geometries and Print Raster Patterns. *J Fail. Anal. and Preven.*, 2016, 16, 154-164.

TURNBULL, G., J. CLARKE, F. PICARD, P. RICHES, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 2017.

VACANTI, J. P. AND C. A. VACANTI. The History and Scope of Tissue Engineering. In R. LANZA, R. LANGER AND J.P. VACANTI. *Principles of Tissue Engineering*. United States of America: Elsevier Inc., 2014.

VALENCIA, A. A. A., N. V. BECERRIL, F. C. V. VÁZQUEZ, T. V. KOUDRIAVTSEV, et al. Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita. *ODOVTOS-International Journal of Dental Sciences*, 2016, 18(3), 39-50.

WANG, X., S. XU, S. ZHOU, W. XU, et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*, 2016/03/01/ 2016, 83, 127-141.

WERNER, M., N. A. KURNIAWAN AND C. V. BOUTEN Cellular geometry sensing at different length scales and its implications for scaffold design. *Materials*, 2020, 13(4), 963.

WU, D., A. SPANOU, A. DIEZ-ESCUADERO AND C. PERSSON 3D-printed PLA/HA composite structures as synthetic trabecular bone: A feasibility study using Fused Deposition Modelling. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2019.

YAMASHITA, T., P. KOLLMANNBERGER, K. MAWATARI, V. VOGEL, et al. 2013. Curvature-induced spontaneous detachment of Vascular smooth muscle cell sheets: Towards vascular self assembly in microchannels. In *Proceedings of the 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Freiburg, Germany 2013.

YAN, D., B. ZENG, Y. HAN, H. DAI, et al. Preparation and laser powder bed fusion of composite microspheres consisting of poly(lactic acid) and nano-hydroxyapatite. *Additive Manufacturing*, 2020, 34(101305), 1-10.

YANG, N., Z. QUAN, D. ZHANG AND Y. TIAN Multi-morphology transition hybridization CAD design of minimal surface porous structures for use in tissue engineering. *Computer-Aided Design*, 2014/11/01/ 2014, 56, 11-21.

YANG, N. AND K. ZHOU Effective method for multi-scale gradient porous scaffold design and fabrication. *Materials Science and Engineering: C*, 2014/10/01/ 2014, 43, 502-505.

YEN, H.-J., C.-S. TSENG, S.-H. HSU AND C.-L. TSAI Evaluation of chondrocyte growth in the highly porous scaffolds made by fused deposition manufacturing (FDM) filled with type II collagen. *Biomed Microdevices*, 2009, 11, 615-624.

YOKOCHI, C., J. W. ROHEN AND E. L. WEINREB *Atlas Fotográfico de Anatomía del Cuerpo Humano*. Edtion ed. Mexico, 1991.

YOO, D.-J. Computer-aided porous scaffold design for tissue engineering using triply periodic minimal surfaces. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 2011/02/01 2011a, 12(1), 61-71.

YOO, D. New paradigms in internal architecture design and freeform fabrication of tissue engineering porous scaffolds. *Medical Engineering & Physics*, 2012/07/01/ 2012, 34(6), 762-776.

YOO, D. J. Porous scaffold design using the distance field and triply periodic minimal surface models. *Biomaterials*, 2011/11/01/ 2011b, 32(31), 7741-7754.

ZADPOOR, A. A. Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry. *Biomaterials Science*, 2014, 1-34.

ZEIN, I., D. W. HUTMACHER, K. C. TAN AND S. H. TEOH Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, 23, 1169-1185.

ZHANG, X.-Y., X.-C. YAN, G. FANG AND M. LIU Biomechanical influence of structural variation strategies on functionally graded scaffolds constructed with triply periodic minimal surface. *Additive Manufacturing*, 2020/03/01/ 2020, 32, 101015.