

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Desarrollo y evaluación de andamios celulares poliméricos
impresos en 3D como posible alternativa de uso para injertos
óseos**

Trabajo de graduación presentado por Nicole Elizabeth Prem Regalado
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Desarrollo y evaluación de andamios celulares poliméricos
impresos en 3D como posible alternativa de uso para injertos
óseos**

Trabajo de graduación presentado por Nicole Elizabeth Prem Regalado
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

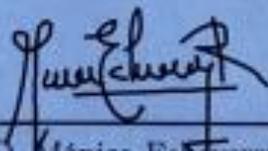
2023

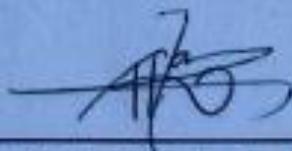
Vo.Bo.:

(f) 
M. Sc. José Andrés Leal Ordoñez

Tribunal Examinador:

(f) 
M. Sc. José Andrés Leal Ordoñez

(f) 
Ph. D. Mónica Esquiverry Rendón

(f) 
M. Sc. Carlos Alberto Esquit Hernandez

Fecha de aprobación: Guatemala, 06 de enero de 2024

Aún recuerdo con tanta facilidad aquel día donde estaba decidida a dejar la ingeniería por medicina, fueron varios días los que pasaron para tomar esa decisión, pues me gustaba la ingeniería, pero quería algo dirigido al sector salud; y fue ese día donde me enteré que se abriría la carrera en la cual pasé mis siguientes 5 años, la Ingeniería Biomédica. Una carrera a la cual siempre le tuve muchas expectativas, y que a pesar de enfrentar algunos retos por ser parte de la primera promoción, el haberlos superado y estar llegando a la recta final me llena de mucha emoción y satisfacción.

Tras haber estudiado varias aplicaciones de la carrera, la Ingeniería de Tejidos fue lo que más me gustó, lo cual me inspiró para hacer el presente trabajo de graduación. Agradezco a Dios por todas sus bendiciones y porque siempre tiene los mejores planes para mí, a mi padre por su inmenso apoyo en todo momento, por siempre creer en mí y en motivarme a siempre seguir mis sueños con esfuerzo y valentía, y a mi madre que siempre me mostró su apoyo y que siempre estuvo para mí a pesar de la distancia. También agradezco a todas las amistades que me acompañaron en este camino, a mi grupo de amigos de miercolitros de estudio, a mis compañeros de carrera y amistades de carreras cercanas como mis compañeros de Ingeniería Mecatrónica, Electrónica, Química Pura e Ing. en Biotecnología Industrial.

Adicionalmente quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron a realizar este trabajo, comenzando con la Dra. Mónica Echeverry Rendón por guiarme, asesorarme en el tema y que de forma personal es un modelo a seguir y que me ha inspirado desde aquella charla que dio en pandemia en el curso de Biomateriales; al Dr. José Andrés Leal por asesorarme todas las semanas y apoyarme dándole seguimiento a la tesis, a los departamentos de Biología, Bioquímica, Química e Ingeniería Civil por brindarme los espacios, equipos y tiempo para poder trabajar y a Cementos Progreso por su apoyo en el uso del Microscopio Electrónico de Barrido.

Fueron varias personas involucradas, pero no quisiera dejar de mencionarlos ya que fueron de gran apoyo: MSc Maria Fernanda Alarcón con quien tuve la primera conversación sobre querer trabajar con células animales y que me motivó a hacerlo dado el nuevo laboratorio en el departamento de Biología, Dr. Luis Diego Archilla por asesorarnos con la compra de las células (que al final no llegaron, pero finalmente resolvimos el tema de ensayos con células), e insumos necesarios para los cultivos celulares, Christha Contreras por darme

la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Bioquímica bajo su supervisión para los ensayos de degradación, MBA Pablo Mazariegos por su apoyo con las impresiones en 3D, MSc Robert Godo y Jairo Prado por brindarme apoyo en los ensayos mecánicos y a Marie Cosenza, PhD Patrizia Lupo y Miguel Santos por su apoyo en realizar los ensayos con células, especialmente a mi pareja del curso de Biología Celular, Andrea Quevedo. Así mismo, agradezco a la Universidad del Valle de Guatemala por formarme como agente de cambio y futura profesional, a mis catedráticos y a la oportunidad de haberme podido desenvolver en Vida Estudiantil.

Finalmente quisiera agradecer especialmente a aquellas personas que nunca han dejado de creer en mí: Juan Rodolfo Prem, Ariana Prem, Lucile Prem, Sandra Recinos, Grecia Castañeda, Ana Cristina Montúfar, Marlies Maldonado, Oscar Valladares y Esteban Leal; su compañía en este camino fue un pilar fundamental para poder terminarlo.

| | |
|--|-----------|
| Prefacio | IV |
| Lista de figuras | IX |
| Lista de cuadros | X |
| Resumen | XI |
| Abstract | XII |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 3 |
| 3. Justificación | 5 |
| 4. Objetivos | 7 |
| 5. Alcance | 8 |
| 6. Marco teórico | 10 |
| 6.1. Huesos | 10 |
| 6.1.1. Tipos de huesos | 10 |
| 6.1.2. Anatomía | 11 |
| 6.1.3. Composición | 12 |
| 6.1.4. Fisiología | 14 |
| 6.1.5. Patologías | 14 |
| 6.1.6. Propiedades mecánicas | 15 |
| 6.2. Ingeniería de tejidos | 16 |
| 6.2.1. Andamios (scaffolds) | 16 |
| 6.2.2. Células | 18 |
| 6.2.3. Señales regulatorias | 18 |
| 6.3. Andamios impresos en 3D para aplicaciones óseas | 19 |
| 6.3.1. Geometría del poro | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3.2. Materiales | 20 |
| 6.4. Pruebas de verificación | 21 |
| 6.4.1. Pruebas mecánicas | 21 |
| 6.4.2. Pruebas de degradación | 24 |
| 6.4.3. Pruebas biológicas | 24 |
| 7. Metodología | 26 |
| 7.1. Diseño de andamios | 26 |
| 7.1.1. Evaluación de macroestructura de los andamios | 28 |
| 7.2. Evaluación mecánica | 30 |
| 7.2.1. Pruebas de tracción | 30 |
| 7.2.2. Pruebas de compresión | 34 |
| 7.3. Evaluación de degradación | 35 |
| 7.4. Evaluación de biocompatibilidad | 38 |
| 8. Resultados | 41 |
| 8.1. Evaluación morfológica de los andamios | 41 |
| 8.1.1. Evaluación por medio de microcopía óptica | 41 |
| 8.1.2. Evaluación por medio de microcopía electrónica de barrido | 45 |
| 8.2. Ensayos mecánicos | 49 |
| 8.2.1. Ensayos de tracción | 49 |
| 8.2.2. Ensayos de compresión | 51 |
| 8.3. Ensayos de degradación | 56 |
| 8.4. Ensayos de biocompatibilidad | 61 |
| 9. Discusión de los resultados | 64 |
| 9.1. Evaluación morfológica de los andamios | 64 |
| 9.2. Ensayos mecánicos | 66 |
| 9.2.1. Ensayos de tracción | 66 |
| 9.2.2. Ensayos de compresión | 67 |
| 9.3. Ensayos de degradación | 67 |
| 9.4. Ensayo de biocompatibilidad | 68 |
| 10. Conclusiones | 70 |
| 11. Recomendaciones | 72 |
| 12. Bibliografía | 73 |
| 13. Anexos | 81 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| 1. Ubicación de los tipos de huesos según su forma. | 11 |
| 2. Anatomía del hueso largo. | 12 |
| 3. Componente celular de los huesos | 13 |
| 4. Organización estructural del hueso esponjoso y el hueso compacto. | 14 |
| 5. Algunas patologías que requieren injerto óseo | 15 |
| 6. Componentes esenciales que componen a la Ingeniería de Tejidos [36] | 16 |
| 7. Definición de porosidad a distintas escalas [39] | 18 |
| 8. Estructuras de andamios basadas en diversos diseños | 20 |
| 9. Ejemplo de curva resultante de los ensayos de compresión [50] | 22 |
| 10. Ejemplo de curva resultante de los ensayos de tensión [50] | 23 |
| 11. Distintas formas de imprimir probetas para ensayos de tracción (a) y compresión (b) [57] | 23 |
| 12. Diagrama del proceso desde la creación hasta la degradación de andamios óseos [6] | 24 |
| 13. Tres formas de realizar un ensayo de biocompatibilidad los componentes que lo conforman: a) forma directa, b) forma indirecta y c) con extracto [47] | 25 |
| 14. Previsualización al quitar perímetros y capas sólidas superiores e inferiores | 27 |
| 15. Previsualización de los patrones de relleno con diversos porcentajes de relleno. Cilindros de $\phi=10\text{mm}$ y $h=2.5\text{mm}$ | 27 |
| 16. Uso del software Image J. | 29 |
| 17. Colocación de las muestras a analizar | 30 |
| 18. Dimensiones de probetas que se prueban para establecer la dimensión final de las probetas para el ensayo de tracción. Unidad de medida: mm | 31 |
| 19. Pre visualización de las primeras probetas a probar en el ensayo de tracción | 31 |
| 20. Iteración en las dimensiones de la probeta tomando como referencia las dimensiones dadas por ISO 5721 1A | 32 |
| 21. Pre visualización de modificación de las dimensiones de la probeta dadas por ISO 5721 con distintos patrones de relleno | 32 |
| 22. Montaje de las probetas de tracción en la máquina de ensayos universales | 33 |
| 23. Dial utilizado para leer la deformación de las probetas | 33 |
| 24. Diseño de la probeta para los ensayos mecánicos de compresión. Unidad de medida: mm | 34 |

| | |
|--|----|
| 25. Previsualización de las probetas que se utilizan para la prueba de compresión con perímetro (cilindros de la derecha de cada imagen) y sin perímetro (cilindros a la izquierda de cada imagen) | 34 |
| 26. Montaje de las probetas de compresión en la máquina de ensayos universales | 35 |
| 27. Montaje del ensayo de degradación de una de las estructuras a estudiar | 36 |
| 28. Especímenes en proceso de secado | 37 |
| 29. Uso del microscopio Milipore para el cálculo automático de la confluencia | 38 |
| 30. Materiales sumergidos en medio completo para el ensayo de biocompatibilidad | 39 |
| 31. Mapa de siembra de células y colocación indirecta de los materiales a distintas concentraciones | 39 |
| 32. Lectura de absorbancias a 570 nm de las células incubadas indirectamente con extractos de materiales y con el ensayo de MTT | 40 |
| 33. Células con MTT posterior a su lectura en el espectrofotómetro | 40 |
| 34. Morfología de andamios impresos en 3D con diversas geometrías y tamaños de poro. Todas las muestras se observan dentro en la totalidad de su diámetro (10 mm) | 42 |
| 35. Morfología de andamios impresos en 3D. Cilindros de 10mm de diámetro y 2.5mm de altura. Escala = 1mm | 43 |
| 36. Partículas analizadas con Image J. Cilindros de 10mm de diámetro y 2.5 mm de altura | 44 |
| 37. Resultados de los análisis de partículas con Image J para cada estructura | 45 |
| 38. Imágenes de barrido electrónico para la muestra Giroide 50 % (G1) sin esterilizar. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones | 46 |
| 39. Imágenes de barrido electrónico para la muestra Giroide 50 % (G1) sometida a esterilización por autoclave. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones | 47 |
| 40. Imágenes de barrido electrónico para la muestra Panal de Abeja 50 % (H1) sin esterilizar. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones | 48 |
| 41. Imágenes de barrido electrónico para la muestra Panal de Abeja 50 % (H1) sometida a esterilización por autoclave. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones | 48 |
| 42. Imágenes de barrido electrónico para la muestra Triangular 50 % (T1) sin esterilizar (a) y sometida a esterilización por autoclave (b y c). Diversos puntos de enfoque y magnificaciones | 49 |
| 43. Pruebas iniciales de tracción. Comparación entre distintas dimensiones de probetas: las utilizadas por Pimentel en 2019 [66] y las establecidas por la ISO 527 1A [65] | 50 |
| 44. Comparación de la resistencia a tracción máxima utilizando las dimensiones de las probetas establecidas por la ISO 527 con el doble del grosor. Comparación entre probetas impresas con y sin perímetros | 51 |
| 45. Comparación de la resistencia a compresión de las probetas con con y sin perímetro utilizando las dimensiones empleadas por Pimentel en 2019 [66]. Probetas con patrón de relleno triangular con densidad del 50 % | 52 |
| 46. Comparación de pruebas de compresión de cada estructura estudiada | 53 |
| 47. Comparación de pruebas de compresión agrupadas según los patrones de relleno | 54 |
| 48. Comparación de pruebas de compresión agrupadas según las densidades de relleno | 55 |

| | |
|---|----|
| 49. Comparación entre el Módulo de Young (a), esfuerzo máximo (b) y deformación máxima (c) de cada estructura estudiada | 56 |
| 50. Comparación de los pesos mojados del ensayo de degradación de todas las estructuras | 57 |
| 51. Comparación de los pesos secos del ensayo de degradación de todas las estructuras | 58 |
| 52. Cambio en el pH de las muestras al sacarlas de PBS | 58 |
| 53. Comparación de los pesos tras sumergir las muestras en etanol al 70% | 59 |
| 54. Comparación de los pesos tras sumergir las muestras en acetona al 99% | 60 |
| 55. Presencia de pellets al fondo de los tubos con andamios sumergidos en acetona | 60 |
| 56. Cambios morfológico en las estructuras T1 y G1 sumergidas en acetona al 99% y tras aplicarle fuerza con pinzas | 61 |
| 57. Cambios en la viabilidad celular al exponer las células LAN-1 indirectamente a distintas concentraciones de los materiales estudiados | 62 |
| 58. Comparación de gráficos de barras de la viabilidad celular a 24h y 72h tras exponer las células LAN1 a distintos polímeros | 63 |
| 59. Probetas utilizadas en el ensayo de tracción luego de hacerles la prueba | 81 |
| 60. Probetas de compresión antes y después de realizar la respectiva prueba | 82 |
| 61. Células LAN 1 antes y después de sembrarlas en la placa de 96 pozos con sus respectivas confluencias | 82 |

Lista de cuadros

| | |
|--|----|
| 1. Algunas patologías que requieren un injerto óseo | 15 |
| 2. Módulo elástico del hueso al soportar fuerzas de tracción y compresión [35] . . | 16 |
| 3. Métodos de fabricación de andamios celulares y materiales utilizados para cada una [3], [38]. | 17 |
| 4. Parámetros de impresión de las estructuras y poros estudiados | 28 |
| 5. Códigos de estructuras según su patrón y porcentaje de relleno | 28 |
| 6. Pesos preliminares de los especímenes para el ensayo de degradación y can- tidad de PBS necesario por cada uno para seguir con la relación 1g:10mL establecida por la norma ISO 10993-13. | 36 |

La Ingeniería de Tejidos es una disciplina de la Ingeniería Biomédica cuyo fin es restaurar, mantener o mejorar la función tisular por medio de la integración de andamios, biomateriales, células y moléculas biológicamente activas. Actualmente no se realizan investigaciones en este campo dentro de la Universidad del Valle de Guatemala ni a nivel nacional, por lo cual el motivo de este proyecto es el de abrir brecha en esta área de conocimiento, con una aplicación específica al tejido óseo, tras ser el hueso el segundo material más comúnmente implantado en el cuerpo humano (después de la transfusión de sangre) pero que su uso se ve limitado por varios factores.

El objetivo de este trabajo de graduación fue el de utilizar la impresión 3D como metodología de fabricación de andamios celulares para posibles aplicaciones en el tejido óseo hechos a base de ácido poliláctico (PLA), filamento comúnmente utilizado en impresión 3D. Se estudiaron diversas estructuras estándar en esta metodología de fabricación: giroide, triangular y panal de abeja, con distintos tamaños de poro, lo cual se logró ajustando la densidad de relleno: 50 %, 75 % y 85 % para fabricar andamios poliméricos. Se determinó la porosidad y tamaño de poro de cada patrón a través de imágenes obtenidas por medio de estereoscopía y se evaluó la homogeneidad microscópica del material en las estructuras hechas con 50 % de densidad de relleno por medio de microscopía electrónica de barrido, en donde también se demostró que el proceso de esterilización por medio de autoclave no produce cambios en la morfología del material ni de las estructuras.

Se hizo un ensayo de compresión para determinar la resistencia de cada estructura escogida en donde se obtuvo que el patrón triangular es el más resistente con resultados que entran en el rango de la resistencia a compresión del hueso trabecular. Se intentaron realizar ensayos de tracción los cuales fueron cancelados por falta de equipo especializado en ensayos mecánicos para polímeros. También se estudió la estabilidad y degradación hidrolítica a diez semanas en condiciones levemente parecidas a las fisiológicas (pH, temperatura y iones) con PBS, en donde se obtuvo que la degradación no depende del tamaño ni geometría de los poros; mismo resultado que se obtuvo tras estudiar la degradación en distintos tiempos en etanol al 70 % y a cuatro semanas en acetona al 99 %. Finalmente, se demostró que el material utilizado es biocompatible por medio de un ensayo indirecto *in vitro* con células de neuroblastoma (LAN1) a través de una prueba con MTT a 24 y 72 horas.

Tissue engineering is a discipline of biomedical engineering that aims to restore, maintain, or improve tissue function through the integration of scaffolds, biomaterials, cells, and biologically active molecules. Currently, no research is being conducted in this field at the University of Valle de Guatemala or at a national level, which is why the purpose of this project is to open a gap in this field of knowledge, with a specific application to bone tissue, being bone the second most commonly implanted material in the human body (after blood transfusion) but whose use is limited by several factors.

The objective of this graduation work was to use 3D printing as a manufacturing methodology for cellular scaffolds for possible applications in bone tissue made from polylactic acid (PLA), a filament commonly used in 3D printing. Various standard structures used in this manufacturing methodology were studied: gyroid, triangular, and honeycomb, with different pore sizes, which was achieved by adjusting the infill density: 50 %, 75 %, and 85 % to manufacture polymeric scaffolds. The porosity and pore size of each pattern were determined through images obtained by stereoscopy and the microscopic homogeneity of the material was evaluated in the structures made with 50 % infill density through scanning electron microscopy, where it was also demonstrated that the process of sterilization by autoclave does not produce changes in the morphology of the material or the structures.

A compression test was performed to determine the strength of each chosen structure where it was found that the triangular pattern is the most resistant with results that fall within the range of the compressive strength of trabecular bone. Attempts were made to perform tensile tests which were canceled due to lack of specialized equipment for mechanical tests for polymers. The stability and hydrolytic degradation at ten weeks in slightly similar physiological conditions (pH, temperature, and ions) with PBS was also studied, where it was found that the degradation does not depend on the size or geometry of the pores; the same result was obtained after studying the degradation over time in 70 % ethanol and at four weeks in 99 % acetone. Finally, it was demonstrated that the material used is biocompatible through an indirect *in vitro* test with neuroblastoma cells (LAN1) through a test with MTT at 24 and 72 hours.

La Ingeniería de Tejidos es una rama de la Ingeniería Biomédica cuyo fin es poder restaurar, mantener o mejorar la función tisular por medio de la integración de andamios, biomateriales, células y biomoléculas. Los andamios son estructuras tridimensionales porosas que pueden estar hechos de diversos tipos de materiales cuya función es brindar un soporte celular para que en la integración con biomoléculas las células puedan proliferar y aportar a la regeneración tisular. La porosidad es un factor importante a tomar en cuenta en los andamios, ya que al alterar el tamaño o la geometría del poro, se obtienen diversas propiedades y a la vez distintos resultados en su aplicación. Además, los andamios se pueden realizar con diversas técnicas mediante metodologías convencionales o de prototipado rápido, esta segunda es de gran utilidad por la capacidad que se tiene en poder establecer características específicas del poro, tras poder diseñar los andamios mediante diseño asistido por computadoras (CAD).

La impresión 3D es una tecnología que pertenece a la metodología de prototipado en la cual se encuentra la metodología de modelado por deposición fundida (FDM) la cual se basa en depositar el material en presentación de filamento capa por capa, siguiendo un camino pre establecido en tres dimensiones de un diseño hecho en software de modelado en 3D. Antes de comenzar con la impresión, se deben establecer distintos parámetros de impresión tales como el patrón de relleno, la densidad de relleno, la altura de la capa, el grosor de los perímetros inferiores y superiores, material de soporte, entre otros; y cada uno de estos parámetros tiene un efecto en las propiedades y por lo tanto en la aplicación final de las piezas impresas, lo cual es de relevancia si en el uso se requieren propiedades mecánicas especiales.

El objetivo de este trabajo fue el de estudiar la porosidad y la estructura de andamios de ácido poliláctico (PLA) impresos en 3D para una posible aplicación en el tejido óseo dependiendo de su desempeño a nivel mecánico, de degradación y de biocompatibilidad. Se estudiaron tres distintos tipos de geometrías comúnmente utilizadas en impresión 3D como patrones de relleno y con tres distintas dimensiones, las cuales se variaron con el porcentaje de relleno dentro de la aplicación de las impresoras 3D disponibles en el Makerlab

de la Universidad del Valle de Guatemala. Para cada tipo de geometría se realizó una caracterización mecánica mediante pruebas compresión, una prueba de degradación a diez semanas en PBS y en etanol al 70 % y acetona al 99 % pero a menos tiempo y finalmente se probó la biocompatibilidad del material utilizado por medio de un ensayo *in vitro* con células de Neuroblastoma (LAN1) a través de la prueba con MTT.

En los capítulos 2 al 5 del presente documento se presentan los antecedentes, la motivación y la justificación del trabajo realizado, los objetivos y el alcance, en el capítulo 6 se describen los fundamentos teóricos sobre el trabajo realizado, en el siguiente se describe la metodología y en los últimos capítulos se presentan los resultados obtenidos, discusión, conclusiones y recomendaciones.

La Ingeniería de Tejidos es una disciplina de Ingeniería Biomédica que integra la biología con ingeniería para crear tejidos o productos celulares fuera del cuerpo y estudiar cómo poder reparar tejidos dañados fuera del cuerpo [1]. Esta rama evolucionó del estudio de biomateriales haciendo énfasis en andamios, células y moléculas biológicamente activas en tejidos funcionales. Los andamios celulares, también llamados *scaffolds* por su nombre en inglés, sirven como base estable para el crecimiento de cultivos celulares y dependiendo del área donde se desean implementar pueden ser fabricados a la medida para facilitar la integración con el tejido [2].

Existen distintos métodos para la fabricación de andamios celulares, los cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos, la fabricación convencional y la fabricación por prototipado rápido. Algunas técnicas de fabricación convencional son fundición por disolventes y lixiviación de partículas, liofilización, separación de fases inducida térmicamente, separación con gases y electrohilado. Y del lado de prototipado rápido existen técnicas que engloban a la impresión 3D como la estereolitografía, deposición fundida por modelado (FDM), sinterización selectiva por laser (SLS), impresión de inyección de tinta, biopresión asistida por láser y fabricación aditiva [3].

Hablando específicamente de la impresión 3D como método de fabricación de andamios celulares, en los últimos años se han estudiado las propiedades óptimas de impresión de los andamios para que desempeñen una función deseada. Estos parámetros pueden ser modificados en la impresora como la presión aplicada, la viscosidad del polímero, la distancia de la boquilla de impresión a la plataforma y la velocidad de movimiento de la boquilla; y pueden ser optimizados para imprimir estructuras específicas. Estas modificaciones han demostrado tener influencia directa tanto en las propiedades mecánicas de los andamios como en la integración celular, particularmente en el uso como implantes óseos [4].

Los parámetros específicos de la fabricación de cada andamio, como la estructura interna, la porosidad y el material también han demostrado tener una gran influencia en sus propiedades mecánicas y compatibilidad celular. Varios estudios han demostrado que el uso de filamentos disponibles comercialmente como el ácido poliláctico (PLA) [5], la policapro-

lactona (PCL) [4] y el poliéter cetona (PEEK) [6] pueden ser utilizados para la impresión de andamios celulares con un alto grado de integración con células óseas. La integración celular y la estabilidad de los andamios depende directamente del grado de porosidad y el tipo de relleno de impresión utilizado. Estos materiales abren las puertas al desarrollo de tejido artificial óseo de forma rápida, efectiva y de bajo costo [5].

El hueso es el segundo material más comúnmente implantado en el cuerpo humano después de la transfusión de sangre [7]. Condiciones de infección, trauma o cáncer de hueso, frecuentemente requieren tratamientos especializados para reemplazar el tejido dañado como injertos óseos autólogos (obtenido del mismo paciente), alogénicos (obtenido de células madre, tejidos u órganos de un donante) o cadavéricos, así como cementos óseos acrílicos o cerámicos [8]. Usualmente, los injertos alogénicos presentan inconvenientes por el suministro limitado de donantes, morbilidad del sitio del donante (complicaciones como dolor, debilidad o hasta fracturas del hueso donante) y posible rechazo al tejido. Los autoinjertos no presentan estos problemas y son altamente biocompatibles, sin embargo, están limitados a injertos menores a 2.5 cm de longitud debido a las propiedades endógenas de regeneración ósea [9].

Típicamente los autoinjertos son implementados en el tratamiento de patologías y procedimientos como osteotomías [10], fracturas multifragmentarias [11], pseudoartrosis [12], no uniones [13], fracturas por osteopenia u osteoporosis [14], cáncer de hueso y fracturas por degeneración ósea [15].

La incidencia de este tipo de patologías es muy común y afecta a un gran número de personas a nivel global. La osteoporosis (i.e., pérdida de densidad ósea) es una de las causas principales de fracturas en el mundo, estimándose una frecuencia de una fractura osteoporótica cada 3 segundos en el mundo. Esto es aún más grave en personas de edades avanzadas y en mujeres [16]. Por otro lado, el cáncer de hueso también tiene una prevalencia significativa, presentándose en aproximadamente 4000 personas al año (USA) conllevando a la muerte en el 53% de los casos [17]. A estas enfermedades se deben de sumar las fracturas provocadas por accidentes, donde se estima que una de cada cinco caídas provoca una fractura [18].

La alta prevalencia de enfermedades que debilitan al sistema óseo y pueden requerir un injerto en combinación con las limitantes asociadas a injertos biológicos, conllevan a una necesidad tangible de alternativas biomédicas capaces de resolver estos problemas. La ingeniería de tejidos es una disciplina de ingeniería biomédica que busca reemplazar, restaurar

o mejorar los tejidos dañados en el cuerpo humano, por medio de soluciones tecnológicas y biológicas, presentando una alternativa terapéutica viable para el tejido óseo [1]. Uno de los pilares en la ingeniería de tejidos es el uso de estructuras artificiales llamadas andamios celulares, los cuales son fabricados con el propósito de permitir el crecimiento celular y facilitar la integración entre tejido artificial y el objetivo biológico a tratar. De este modo se permite que haya una unión y un apropiado crecimiento celular en tejidos que no tienen esta propiedad o que la han perdido a lo largo del tiempo [5].

Existen diversos métodos para la fabricación de andamios celulares como la impresión 3D, la estereolitografía, el electrospinning, el sinterizado por laser, la bioimpresión y muchos más [3]. Todos estos métodos pueden implementar materiales biocompatibles, moléculas bioactivas y células con la finalidad de generar un material artificial capaz de reemplazar el tejido u órgano deseado [19]. Dentro de los métodos de fabricación empleados, la impresión 3D presenta un método de prototipado rápido que es capaz de generar andamios celulares con diversos materiales de bajo costo, con alta versatilidad en diseño y relleno de las impresiones, lo que permite modificar sus propiedades estructurales [20].

Los materiales que se pueden utilizar en este método de fabricación pueden ser poliméricos, biocerámicas, compuestos o metales degradables. Tomando especial atención a los polímeros, estos tienen la ventaja de que pueden ser fáciles de preparar, biocompatibles, bioabsorbibles y biodegradables. En el mercado se pueden conseguir fácilmente filamentos de materiales ya estudiados en este campo como lo son el ácido poliglicólico (PGA), polieterecetona (PEEK) (aprobado por la FDA para su aplicación biomédica), ácido poliláctico (PLA), ácido poli-L-láctico (PLLA, policaprolactona (PCL), entre otros [20].

La ingeniería de tejidos presenta un campo con rápido crecimiento económico a nivel mundial, con una gran cantidad de beneficios en medicina regenerativa. Actualmente se invierte mucho dinero a nivel mundial en investigación con el fin de resolver los problemas previamente mencionados. Lamentablemente en Guatemala no se han realizado investigaciones al respecto aún. Actualmente la impresión 3D tiene aplicación en diversas áreas de investigación del país como en la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) [21] y algunos emprendimientos como la empresa Creativo3D donde venden impresoras 3D y filamentos para imprimir. Sin embargo, aún no se investigan aplicaciones específicas al campo de la ingeniería de tejidos, por lo que se considera altamente necesario iniciar este tipo de estudios para establecer tecnologías de alto impacto y beneficio al país en el futuro.

4.1 Objetivo general

Diseñar, fabricar y estudiar las propiedades mecánicas y biológicas de andamios celulares de PLA impresos en 3D como alternativa de injerto óseo.

4.2 Objetivos específicos

- Diseñar andamios celulares de PLA para imprimir en 3D con distintas geometrías internas y tamaños utilizando parámetros análogos al hueso humano.
- Caracterizar las propiedades de compresión de los andamios celulares y compararlas con el hueso humano.
- Verificar la estabilidad e integridad a largo plazo de los andamios poliméricos al ser sujetos a estrés químico.
- Establecer un método de esterilización para el material elegido para los andamios y realizar pruebas de biocompatibilidad con células.

El presente trabajo de investigación consiste en estudiar patrones utilizados en impresión 3D para su uso en andamios celulares y posible aplicación en regeneración de tejido óseo. Como principal parámetro se varió el tipo de patrón de relleno y la densidad del mismo. Los patrones escogidos fueron triangular, giroide y panal de abeja y con densidades de relleno del 50 %, 75 % y 85 %. Estos patrones se seleccionaron en base a demostraciones previas en la literatura donde se ha demostrado que todos presentan un buen balance entre estabilidad mecánica y biocompatibilidad celular [22], [23], [24], [25], [26], [27]. Con esos parámetros constantes, se dejarán fijos los demás parámetros de impresión como la altura de capa, temperatura de extrusión, temperatura de cama, diámetro de extrusor, etc., variables que no se estudiaron ya que quedan fuera del alcance del estudio. Además, las estructuras internas serán desarrolladas en base a las limitaciones de las impresoras en 3D y modificarlas a escala microscópica para ajustar el número de poros internamente también queda fuera del alcance.

Se planea estudiar estas estructuras a partir de diseños y dimensiones estándar para su posible aplicación en andamios personalizados, los cuales se pueden realizar a partir de imágenes diagnósticas y así tener un andamio a la medida. Realizar andamios con dimensiones personalizadas queda fuera del alcance de este estudio.

Las propiedades mecánicas serán evaluadas en pruebas de tracción y compresión y los resultados se compararán con valores conocidos del hueso humano. No se espera que los resultados obtenidos sean comparables con la estabilidad mecánica del hueso humano debido a que esto depende de la integración celular, lo cual no se alcanzará en este trabajo. Todas las pruebas serán realizadas con dispositivos de medición mecánica disponibles en el departamento de ingeniería civil en la UVG. Estos dispositivos están diseñados principalmente para mediciones en materiales de construcción. Realizar otro tipo de pruebas como las pruebas de flexión y de corte quedan fuera del alcance del estudio.

La degradación a largo plazo se realizará en un lapso de 10 semanas, lo cual dará primeros indicios sobre la degradación y estabilidad, sin embargo, estos resultados no son definitivos y requieren métodos más extensos a futuro para considerarse envejecimiento acelerado. La degradación se evaluará con la pérdida de peso y se hará con solución PBS, evaluar la

degradación de degradación enzimática y determinar los resultados por medio de productos de degradación, el cambio de la porosidad y cambio en las propiedades mecánicas, queda fuera del alcance de este trabajo de graduación.

Las pruebas de biocompatibilidad con células serán limitadas al tipo de células existentes y disponibles en UVG. No se espera realizar pruebas con el tipo de células oseas adecuadas debido a las dificultades de obtener estas líneas celulares en corto tiempo. La biocompatibilidad consistirá en pruebas simples para evaluar la citotoxicidad del material en células mediante una prueba indirecta. Realizar pruebas directas para verificar la adhesión celular queda fuera del alcance del estudio dado que no se cuenta con el equipo necesario para realizarlo.

6.1. Huesos

El sistema óseo está formado por huesos, cartílagos, ligamentos y tendones. Cada persona cuenta con 206 huesos de distintas formas y estructuras los cuales desempeñan distintas funciones. Los huesos comprenden el 15 % del peso corporal en una persona con peso ideal, tienen una composición específica, se pueden clasificar dependiendo el tipo de hueso y tienen propiedades mecánicas características de este tipo de tejido [28].

6.1.1. Tipos de huesos

Los huesos se pueden clasificar a partir de su forma, en donde cada forma está relacionada con una función. Las cuatro clases principales de huesos son largos, cortos, planos e irregulares, de los cuales también pueden clasificarse como neumatizados, sesamoideos y accesorios, a continuación se describe cada uno de ellos, los cuales se muestran en la Figura 1a detallando dónde pueden encontrarse [29].

- Huesos largos: tienen forma cilíndrica, contienen médula ósea y en adultos también médula grasa. Son más largos que anchos y son principalmente de hueso compacto.
- Huesos cortos: tienen forma cúbica, siendo su largo, ancho y grosor de longitudes similares. Brindan estabilidad, apoyo, movimientos limitados y está principalmente compuesto por hueso esponjoso.
- Huesos planos: tienen un ancho delgado y su forma suele ser curva. Son puntos de unión para los músculos y brindan protección a algunos órganos internos.
- Huesos irregulares: no se adaptan a ninguna categoría de las anteriores dado que no tienen una forma característica. Son principalmente hueso esponjoso.

- Huesos sesamoideos: es pequeño y se forma en los tendones donde se genera una alta presión articular, brindando protección a los tendones.
- Huesos neumatizados: contienen espacios revestidos por mucosa y llenos de aire.
- Huesos accesorios: no están presentes en todas las personas como la fabela y el hueso trígono (hueso adicional en el astrágalo). [29]

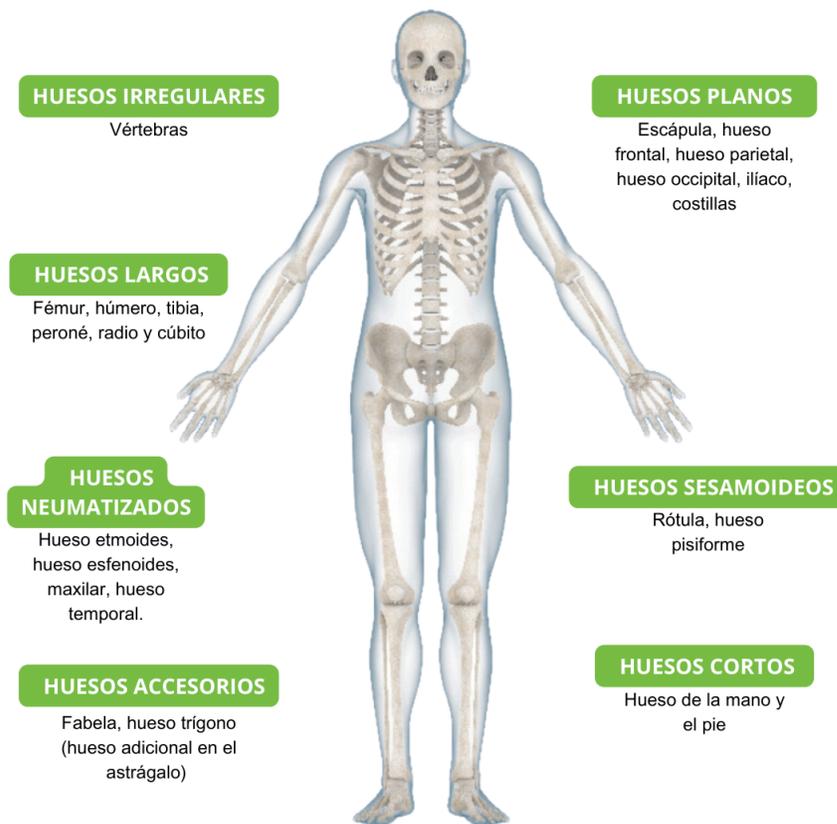


Figura 1: Ubicación de los tipos de huesos según su forma.

Imagen adaptada [29]

6.1.2. Anatomía

Los huesos largos tienen dos regiones principales: la diáfisis y la epífisis, están compuestas por subunidades (Figura 2a).

- Diáfisis: porción central del hueso, dentro de ella se encuentran la cavidad medular que contiene médula ósea amarilla y sus paredes, conocidas como cortex, están compuestas por hueso compacto.

- Epífisis: es la sección más ancha del hueso y está compuesta por hueso esponjoso en donde se puede encontrar médula ósea roja.

El espacio entre la diáfisis y la epífisis se denomina metáfisis donde ocurre la elongación de los huesos largos en la placa epifisaria hasta los 18-21 años. En el interior del hueso adyacente a la cavidad medular se encuentra una capa de células llamada endostio las cuales hacen que el hueso crezca, se repare y se remodela a lo largo de la vida. En el exterior del hueso se encuentra una capa de células llamada periostio, el cual tiene la misma función que el endostio pero en la parte de afuera; contiene vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos [30](#).

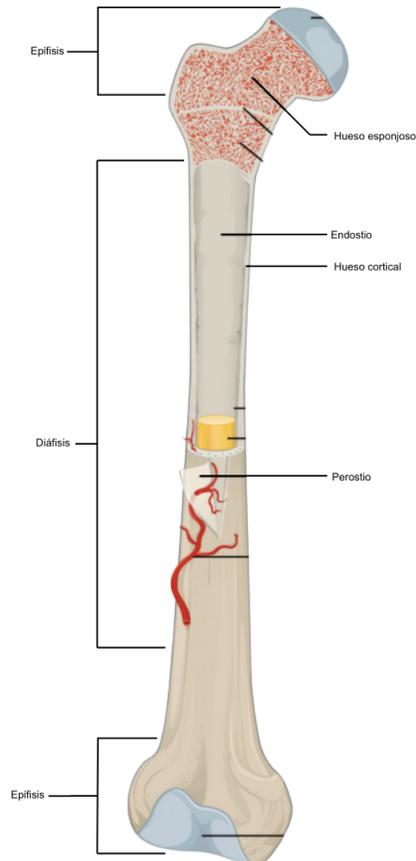


Figura 2: Anatomía del hueso largo.

Imagen adaptada [30](#)

6.1.3. Composición

El hueso tiene dos componentes esenciales: células y matriz extracelular. El componente celular se puede clasificar entre la línea osteoformadora y la línea osteodestructura (Figura [3](#)). La línea osteoformadora contiene osteoblastos y osteocitos. Los osteoblastos se encuentran en la superficie ósea, forman el componente orgánico de la matriz ósea y sintetiza el osteoide; y los osteocitos (que se forman a partir de osteoblastos), mantienen la homeostasis del calcio y fósforo celular, constituyen el 90-95 % del componente celular y tienen prolongaciones citoplasmáticas grandes que se extienden desde las osteonas hasta los canalículos. La línea osteodestructora está compuesta por osteoclastos, participantes en la resorción del hueso (proceso de remodelación en el cual el hueso es destruido), son células

grandes y multinucleadas [30].

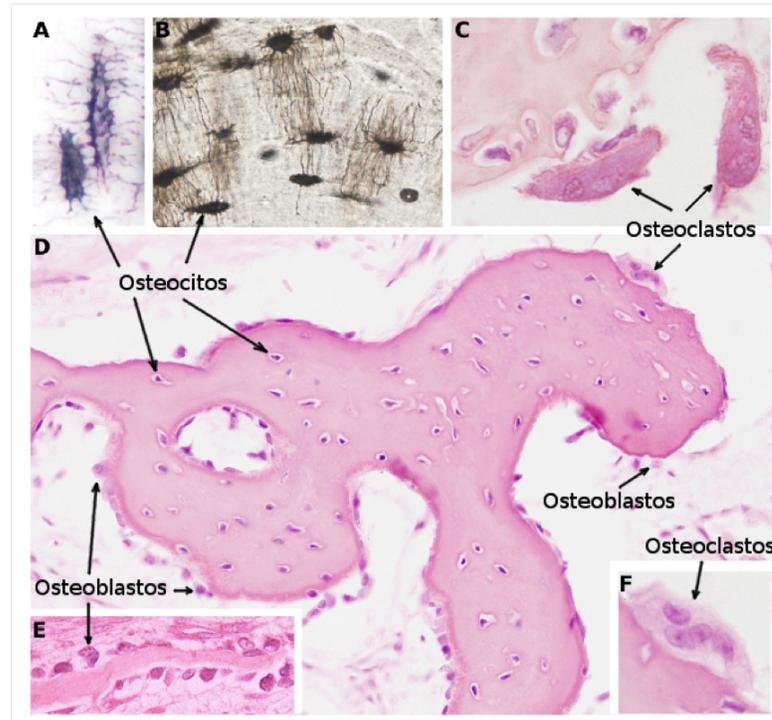


Figura 3: Componente celular de los huesos

La matriz extracelular del hueso está compuesta por una parte orgánica y una inorgánica. La parte orgánica compone al 30 % del hueso y está constituida por sustancia proteica (90 %) y los grupos celulares mencionados anteriormente. La parte inorgánica constituye el 50-70 % de la composición del hueso y está compuesta principalmente por hidroxiapatita, la cual se compone de fosfato tricálcico, carbonato cálcico y numerosas impurezas [30].

La organización de dichos componentes esenciales depende de la parte del hueso a la cual se está refiriendo, al hueso esponjoso o al hueso compacto (Figura 4a). El hueso esponjoso o también llamado trabecular se encuentra en los extremos de los huesos largos y en el interior de huesos planos, está compuesto de trabéculas, las cuales contienen osteocitos y están cubiertas por el endostio; tiene apariencia de redes aleatorias que dirigen fuerzas hacia el hueso compacto y su función es hacer más ligeros los huesos para que los músculos puedan moverlos fácilmente. El hueso trabecular o también llamado cortical se encuentra en la parte exterior de los huesos largos y cortos, está compuesto por osteonas, las cuales tienen forma de círculos concéntricos, en donde cada capa de círculos está hecha de colágeno y matriz calcificada llamada lamela, y entre las lamelas se pueden encontrar osteocitos. El centro de las osteonas están recubiertas por endostio, el cual permite la remodelación y reconstrucción del hueso. El centro de cada osteona se denominan canal de Havers, el cual contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios [30].

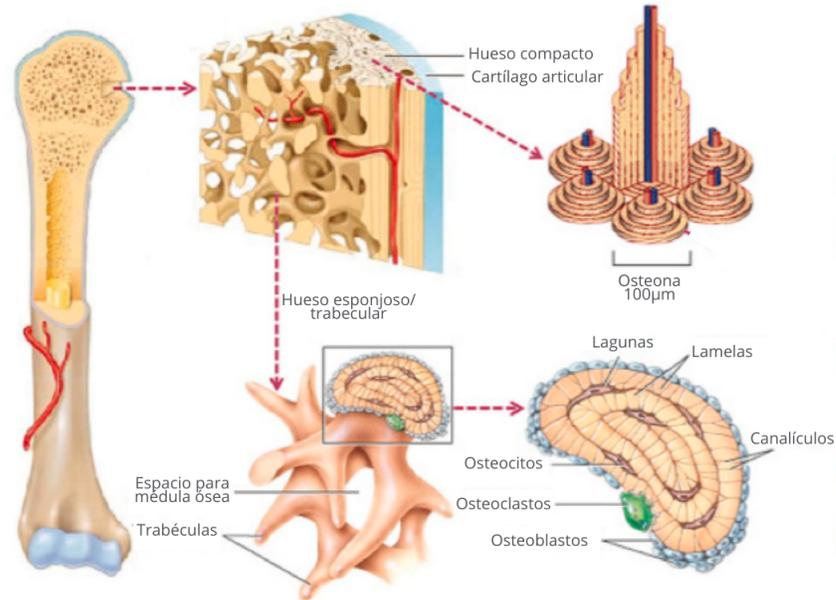


Figura 4: Organización estructural del hueso esponjoso y el hueso compacto.
 Figura adaptada [22]

6.1.4. Fisiología

Los huesos abarcan diversas funciones, la función principal es de sostener al cuerpo, facilitar el movimiento y proteger órganos blandos del cuerpo. Los huesos y cartílagos componen la estructura que soportan al resto del cuerpo. Se dice que facilitan el movimiento porque sirven como puntos de unión para los músculos y protege órganos blandos así como las costillas protegen a los pulmones y el corazón, las vértebras protegen la médula espinal y los huesos del cráneo protegen al cerebro. A nivel metabólico los huesos también desempeñan varias funciones: formación de células sanguíneas y almacenamiento de minerales y grasas. En el interior de los huesos se encuentra el único tejido conectivo del tejido óseo: la médula ósea, la cual puede ser médula ósea roja o amarilla. La médula ósea roja contiene células madre de la sangre y la amarilla tejido adiposo y triglicéridos guardados en adipocitos, con el fin de almacenar energía. También es un depósito de minerales importantes para el funcionamiento del cuerpo, especialmente calcio y fósforo; por ejemplo, el calcio es esencial para las contracturas musculares y están involucrados en la transmisión de impulsos nerviosos [30].

6.1.5. Patologías

Los trastornos óseos son muy comunes, pueden derivarse de distintas formas y los tratamientos pueden ser diversos [15]. El presente estudio pretende proponer una posible solución con biomateriales (ver sección 6.2) para aquellas patologías requieren un procedimiento quirúrgico en el cual se necesite colocar un injerto óseo, algunas de estas patologías se describen en el Cuadro [1] y se representan gráficamente algunas de ellas en la Figura [5].

Cuadro 1: Algunas patologías que requieren un injerto óseo

| Patología | Descripción | Cita |
|------------------------------|--|--------|
| Fracturas multifragmentarias | Lesiones de alta energía asociadas a condiciones potencialmente mortales en pacientes politraumatizados. Pueden ser fracturas abiertas (el hueso roto traspasa la piel) o cerradas (opuesto a las cerradas) (Figura 5a). El tratamiento gold standard es el enclavado intramedular (unión de fracturas por medio de un clavo que atraviesa la médula ósea) pero se ha demostrado un buen desempeño de fijación por medio de placas biometálicas con aloinjertos para corregir la falta de hueso, proveer mayor estabilidad y una mejor unión de la fractura. | 11 |
| Fracturas por osteoporosis | La osteoporosis es un trastorno metabólico que vuelve a los huesos más porosos y frágiles (Figura 5b). Las fracturas osteoporóticas representan una de las causas más comunes de discapacidad. Ocurren en sitios esqueléticos con propiedades biomecánicas particulares como en la cadera o vértebras. Son complejas, tienen un lento proceso de cicatrización y una compleja osteofijación. Cuando es necesaria una cirugía se utilizan injertos óseos para mejorar el potencial de curación de las fracturas osteoporóticas | 15, 14 |
| No uniones | Una no unión es una fractura no consolidada que tiene entre seis y nueve meses sin signos de curación, lo cual puede ser causa de un movimiento excesivo en el sitio de fractura. En estos casos los injertos óseos son una buena alternativa ya que aumentan la curación gracias a sus mecanismos osteoinductivos, osteoconductores y osteogénicos (Figura 5c). | 13 |
| Pseudoartrosis | Es un tipo de no unión que se produce cuando un hueso no se cura bien luego de una fractura, en este caso, se forma un tejido fibroso o cicatricial que no tiene la misma fuerza que un hueso normal. El tratamiento gold standard es un colocar un injerto óseo autólogo dadas sus propiedades de curación pero es un tratamiento que presenta restricciones como la limitada cantidad de hueso que se puede extraer del paciente y la morbilidad del sitio donante. | 12 |

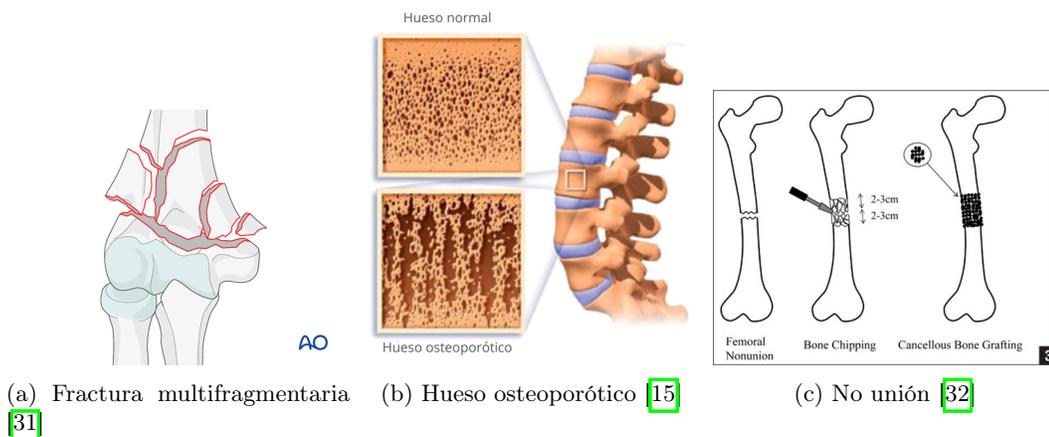


Figura 5: Algunas patologías que requieren injerto óseo

6.1.6. Propiedades mecánicas

El hueso, al desempeñar una función estructural, soporta diversas cargas tanto internas (como soportar el peso del mismo el cuerpo), así como fuerzas externas; por lo tanto, posee propiedades mecánicas características del hueso como lo son la resistencia, rigidez, elasticidad y tenacidad [15]. Estas propiedades son diferentes dependiendo de los tipos de huesos y varían conforme la edad y si hay presencia de patologías que afectan a los huesos como la osteoporosis. Además, es importante recalcar que el hueso es anisotrópico, es decir, que presenta distintas propiedades en diferentes dimensiones, por lo cual sus propiedades cambian si

una fuerza se ejerce de forma longitudinal o transversal [33] [34]. A continuación se muestra una tabla con algunas propiedades mecánicas estándar del hueso cortical y esponjoso.

Cuadro 2: Módulo elástico del hueso al soportar fuerzas de tracción y compresión [35]

| Tipo de hueso | Ensayo | Módulo Elástico (GPa) | Carga de Ruptura (MPa) |
|---------------|------------|-----------------------|------------------------|
| Cortical | Tracción | 11.4-19.1 | 107-146 |
| | Compresión | 15.1-19.7 | 156-212 |
| Esponjoso | Tracción | 0.2-5 | 3-20 |
| | Compresión | 0.1-3 | 1.5-50 |

6.2. Ingeniería de tejidos

La Ingeniería de Tejidos es una disciplina de la Ingeniería Biomédica que integra la biología con la ingeniería para restaurar, mantener o mejorar la función tisular por medio de la integración de tres pilares: andamios hechos de biomateriales, células y moléculas biológicamente activas en tejidos funcionales, (Figura 6). Es una ciencia que trabaja de la mano con la medicina regenerativa y que actualmente está en crecimiento, la mayoría de sus aplicaciones se encuentran en fases de investigación o estudios clínicos de los cuales se pueden mencionar como ejemplo vejigas suplementarias, arterias pequeñas, injertos de piel, cartílago y otros órganos como tejido cardíaco, pulmonar y hepático [2]. A continuación se describen los pilares de esta disciplina.

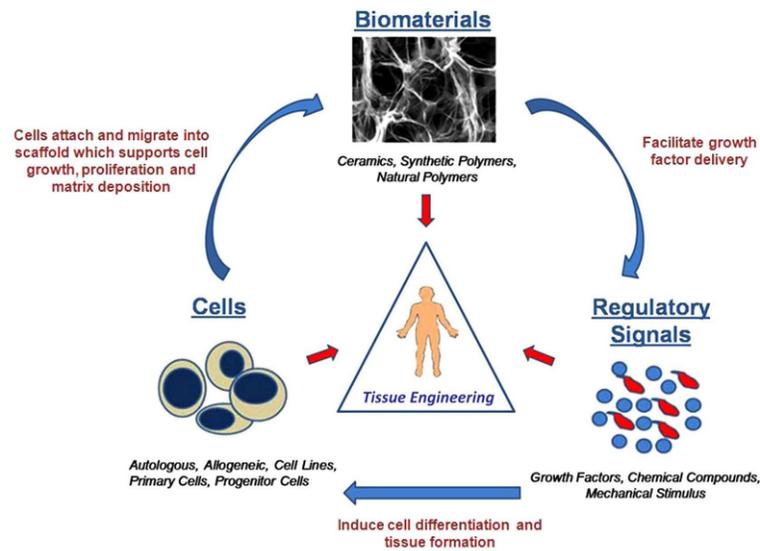


Figura 6: Componentes esenciales que componen a la Ingeniería de Tejidos [36]

6.2.1. Andamios (scaffolds)

La matriz extracelular (MEC) son productos de soporte celular compuesta por proteínas estructurales, glúcidos y glicoproteínas; es específica para cada tipo de tejido y cuando estos se dañan, la MEC deja de ser producida. Los andamios, o también llamados *scaffolds* por

su nombre en inglés, son estructuras de soporte que son parte de la Ingeniería de Tejidos para actuar como una MEC en el tejido que se desea estudiar [2], actuando como un molde de soporte que permite el óptimo suministro de factores necesarios para la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células [3].

Los andamios se pueden fabricar de distintos materiales y formas. Para la selección de materiales se pueden escoger de cualquier familia de materiales: metálicos, poliméricos, cerámicos o compuestos [37]. Los métodos convencionales y prototipado rápido son los dos grandes grupos de métodos de fabricación. Los métodos convencionales se usan para diseñar andamios con poros y formas específicas pero su uso se limita cuando se trata de conectividad y arquitectura interna específica; lo cual se resuelve con los métodos de prototipado rápido (o también llamados por fabricación aditiva) los cuales se utilizan para fabricar andamios utilizando modelos de diseño asistido por computadora (CAD) lo cual además permite producir andamios personalizados o específicos para los pacientes [3].

Para la fabricación de los andamios también es de gran importancia la selección de los materiales o biomateriales a utilizar, estos pueden ser naturales o sintéticos y su selección depende del tejido que se desea regenerar. Por ejemplo, los polímeros rígidos se utilizan para tejidos duros como el hueso, los polímeros maleables para tejidos blandos como nervios y polímeros flexibles para tejidos elásticos como la piel o vasos sanguíneos [3]. Además de los polímeros, se pueden utilizar materiales metálicos, cerámicos o compuestos y dependiendo del tipo de fabricación se pueden usar en presentación laminar, líquidos o en polvo [3]. Es importante mencionar que el material utilizado debe ser biocompatible y dependiendo de su aplicación biodegradable. En el Cuadro 3 se mencionan algunos métodos de fabricación convencionales y de prototipado rápido así como los materiales comúnmente utilizados; cada metodología tiene ventajas y desventajas tales como el precio, el tamaño de poro posible a alcanzar, el control de la porosidad y el tamaño, tiempo de fabricación, la cantidad de energía que requieren y la viabilidad de los materiales y solventes [38].

Cuadro 3: Métodos de fabricación de andamios celulares y materiales utilizados para cada una [3], [38].

| Metodología | Técnica | Familia de materiales comúnmente utilizados |
|--------------------|--|---|
| Convencional | Fundición de solventes y lixiviación de partículas | Polímeros y compuestos poliméricos |
| | Separación de fases inducidas térmicamente | Polímeros termoplásticos |
| | Sol-gel | Metales, alcóxidos metálicos, cerámicos y vidrios |
| | Electrospinning | Polímeros |
| Prototipado rápido | Estereolitografía | Polímeros fotosensibles |
| | Sinterización selectiva por láser | Metales y cerámicos (en presentación de polvo fino) |
| | Modelado por deposición fundida | Polímeros y compuestos cerámicos |
| | Bioimpresión asistida por láser | Células e hidrogeles poliméricos |

Hablando específicamente de la porosidad en un andamio, esta se define como los espacios vacíos o cavidades presentes en la estructura, es decir, a una macro escala. No obstante, al hablar de porosidad, se pueden mencionar tres tipos: macro, micro y meso. La macro porosidad se refiere a cuando el poro es mayor a $100\ \mu\text{m}$, la micro porosidad a cuando es menor a $10\ \mu\text{m}$ y la meso porosidad a cuando es menor a $100\ \text{nm}$, esto se ilustra en la Figura 7. Además, cabe resaltar las funcionalidades de cada escala: la macroporosidad sirve de soporte celular para promover la proliferación y estabilidad celular, la micro porosidad sirve para la vascularización y difusión de nutrientes y la meso porosidad funciona para la adhesión y diferenciación celular [39].

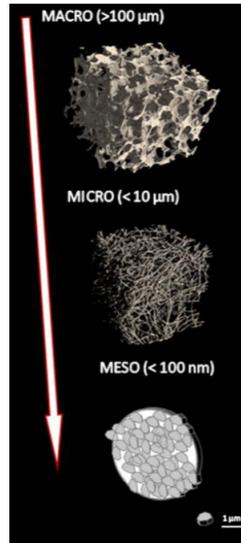


Figura 7: Definición de porosidad a distintas escalas [39]

6.2.2. Células

El uso de células es otro de los pilares de la Ingeniería de Tejidos y se pueden utilizar de distintas formas: implantación de células aisladas, en combinación con andamios o *in situ* para regenerar células nativas [36]. También se utilizan para realizar diversos cultivos celulares para estudiar la biocompatibilidad, citotoxicidad y adherencia a los materiales o también pueden ser materia prima para las bioimpresoras [3]. La implementación de células aisladas se refiere a aislar células, expandirlas *ex vivo* y reimplantarlas con una mayor viabilidad celular. Utilizarlas en combinación de andamios conlleva beneficios de biocompatibilidad (en el caso de usar células autólogas). Y la aplicación *in situ* combina el campo de la liberación controlada de fármacos mediante biomateriales personalizados y modular el reclutamiento y la diferenciación de progenitores por medio de terapias génicas [34].

6.2.3. Señales regulatorias

El comportamiento celular se ve influenciado por diversos factores biológicos y señales bioquímicas y biofísicas de la MEC para inducir y regular la formación del tejido ya sea *in*

vitro o *in vivo*. Los estímulos bioquímicos modulan los procesos de señalización celular que regulan la migración, la adhesión, la diferenciación y la supervivencia celular; los factores de crecimiento, citoquinas y proteínas reguladoras son algunos ejemplos que funcionan de forma local o sistémica para esta aplicación [36]. En cuanto a las señales biofísicas se refiere a estímulos físicos o mecánicos que implican fuerzas, movimientos o cambios del entorno físico de las células que pueden aportar a conseguir respuestas celulares y procesos biológicos esperados. El estiramiento mecánico y el cambio de flujo de fluidos mediante el uso de biorreactores y el uso de estímulos eléctricos y térmicos son algunos ejemplos de señales biofísicas que se utilizan en esta aplicación [38].

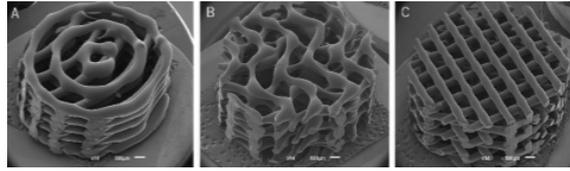
6.3. Andamios impresos en 3D para aplicaciones óseas

El hueso tiene la capacidad de repararse por sí mismo, pero existen defectos que impiden que el hueso pueda hacerlo como fracturas, tumores, remoción de hueso por algún procedimiento quirúrgico o accidentes. Actualmente, los injertos óseos autólogos o alogénicos junto con placas de fijación ósea son el “gold standard” para el tratamiento de tales defectos de gran tamaño. Sin embargo, estos tratamientos presentan limitaciones como la falta de disponibilidad de hueso donante, riesgo de infección y falta de coincidencia con la geometría ósea del sitio del defecto. Estas desventajas han motivado a los investigadores a desarrollar andamios celulares de biomateriales porosos impresos en 3D para promover potencialmente la regeneración ósea [20], ya que esta tecnología tiene un alto grado de automatización, buena precisión y reproducibilidad [39] y ha sido aplicada en numerosos sectores, siendo el campo de la medicina uno de ellos aunque con un bajo porcentaje de aplicación (0.973 % para el 2018) pero que tiene un pronóstico de aumento (18.2 % para el 2026) [40]. Actualmente se estudian diversas variables en los andamios para esta aplicación y con esta metodología de fabricación, dentro de las cuales la geometría y tamaño de poro, la porosidad y los materiales son unas de ellas.

6.3.1. Geometría del poro

Una variedad de estructuras porosas pueden promover la adhesión, diferenciación y proliferación celular para permitir una mejor integración del implante con propiedades físicas cada vez mejores [41]. Los métodos convencionales de fabricación de andamios se ven limitados por la baja capacidad de poder controlar características de los poros tales como tamaño, geometría, interconectividad, distribución espacial y distribución espacial de la rigidez del material. Es por ello que las metodologías de fabricación aditiva o técnicas de impresión 3D muestran potencial para la fabricación de andamios [20]. Los diseños de andamios celulares en 3D son ilimitados, pueden ser de distintas geometrías basadas en la naturaleza como las estructuras de panal (honeycombs), inspirados en geometrías de formas geométricas estándar como las rectangulares y circulares o de geometrías personalizadas. Cada estructura tiene distintas propiedades las cuales varían con la porosidad y a medida que avanzan los estudios, se tiene una mejor comprensión en sobre los mejores parámetros para esta aplicación. Además, se ha demostrado que para el proceso en impresión 3D tienen efecto los parámetros de impresión como la temperatura de impresión, la velocidad de impresión o el grosor de la cubierta [20]. En la Figura 8 se muestran algunos ejemplos de estructuras que se utilizan en

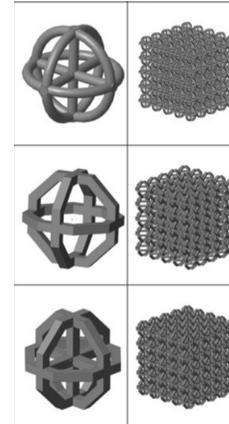
este campo de estudio inspiradas en figuras geométricas convencionales [8a](#), inspiradas en la naturaleza [8b](#) y a partir de estructuras totalmente personalizadas [8c](#).



(a) Diseño estándar: circular, sinusoidal y ortogonal [24](#)



(b) Diseño inspirado en la naturaleza [23](#)



(c) Diseño personalizado [42](#)

Figura 8: Estructuras de andamios basadas en diversos diseños

Se ha demostrado que la porosidad óptima de un andamio celular es aquella entre el 40 y 70 %, esta porosidad permite el crecimiento celular y el intercambio de nutrientes en los andamios óseos. Los poros más pequeños pueden inhibir la proliferación celular o dar lugar a una vascularización y transporte de nutrientes insuficiente, mientras que los poros más grandes pueden disminuir la capacidad de carga del andamio y tener un mayor efecto sobre la vida útil de la fatiga [24](#).

6.3.2. Materiales

Además de escoger la estructura de los andamios es importante realizar una buena selección del material a utilizar. Para esta aplicación se buscan algunas características especiales:

- **Propiedades mecánicas:** se debe escoger un material apropiado para el hueso y que el soporte fuerzas estáticas y cíclicas *in vivo* y que a la vez pueda mantener una alta porosidad para facilitar el crecimiento óseo, la vascularización y el transporte de nutrientes. Esta propiedad se puede modificar al realizar cambios de concentración en algunos materiales como en el Ácido Poli(D,L-Láctico) (PDLLA) [43](#) o modificando el tamaño o geometría de los poros del andamio [44](#), además, la resistencia a compresión debe ser comparable con la del hueso cortical, la cual está en un rango de 100 a 150 MPa [33](#).

- **Propiedades biológicas y biocompatibilidad:** el material no debe ser tóxico para que las células puedan crecer y reproducirse, así como promover una interacción celular, diferenciación y migración adecuada. En cuanto a la biocompatibilidad, el material no producir respuestas locales o sistémicas perjudiciales para el cuerpo [45].
- **Biodegradable:** se refiere a la degradación gradual de un biomaterial mediada por una actividad biológica específica ya sea por hidrólisis, degradación enzimática o ambos. Para esta aplicación, el biomaterial debe tener la capacidad de degradarse ya que el andamio no es un implante permanente sino que debe degradarse media vez se produzca la propia matriz extracelular [45].

Otras propiedades que vale la pena mencionar son la resistencia a la corrosión, la estabilidad térmica, la estabilidad química y la facilidad que tengan para imprimirse [46]. En impresión 3D la familia de los polímeros son los materiales más utilizados; actualmente se pueden encontrar biomateriales en forma de filamento para aplicaciones biomédicas o se puede optar por hacer un filamento propio de otro polímero. El ácido poliláctico (PLA), el poliéter éter cetona (PEEK), la policaprolactona (PCL) y el ácido poliláctico de L-enantiómero (PLLA) son filamentos usualmente utilizados en ingeniería de tejidos óseos y se pueden utilizar con refuerzos de biomateriales en distintas concentraciones como lo son la hidroxiapatita, el ácido poliglicólico (PGA), el fosfato tricálcico (TCP), el hierro y el silicato de calcio (CaSiO₃) [20] [47].

6.4. Pruebas de verificación

Para estudiar las características de los andamios y poder probar si tienen potencial para su uso se realizan pruebas de verificación específicas para evaluar su uso según el tipo del tejido en el cual se quiera aplicar; en cuanto al hueso, se realizan pruebas que verifiquen que el andamio pueda soportar un ambiente parecido al que experimentan los huesos, lo cual se logra con pruebas mecánicas de tensión y compresión [20]. Además, es de gran utilidad saber si el material es biocompatible, bioactivo, biodegradable y esterilizable [48]. A continuación se describen algunos ensayos de utilidad para evaluar las propiedades de los andamios poliméricos impresos en 3D.

6.4.1. Pruebas mecánicas

Las principales pruebas a desarrollar en andamios con aplicaciones óseas son las pruebas de tracción y compresión, las cuales se pueden desarrollar con equipo especializado en pruebas mecánicas y se debe seguir un procedimiento que de preferencia sea estándar.

Ensayo de compresión Este ensayo consiste en aplicar fuerzas de compresión a un material (en este caso a los andamios) y medir su respuesta. Durante la prueba se coloca la muestra de material en una máquina especializada para este ensayo la cual comprime la muestra entre dos placas. La máquina aplica una carga que va en aumento gradual y que a la vez deforma y reduce el tamaño de la muestra. Si se utiliza una máquina de ensayos digital, esta guarda los resultados, los cuales son una curva de esfuerzo-deformación, la cual

explica el comportamiento del material bajo este tipo de fuerza. Si al contrario, la máquina es análoga, se deben tomar los datos de fuerza y deformación, convertir estos parámetros a esfuerzo y deformación total, respectivamente, y realizar la gráfica de esfuerzo-deformación. La gráfica de esfuerzo-deformación nos arroja una variedad de resultados [49]:

- Fuerza compresiva: indica el valor máximo de fuerza a compresión que soportó el material sin fallar ni deformarse significativamente.
- Límite elástico: el límite elástico se alcanza cuando el material comienza a deformarse plásticamente, es decir, que no volverá a su forma original cuando se retire la carga.
- Módulo de Young: también llamado módulo de elasticidad, es la medida de rigidez de un material o su resistencia a la deformación elástica bajo carga. En la gráfica de esfuerzo-deformación se puede calcular a partir de la pendiente de la región lineal inicial de la curva.

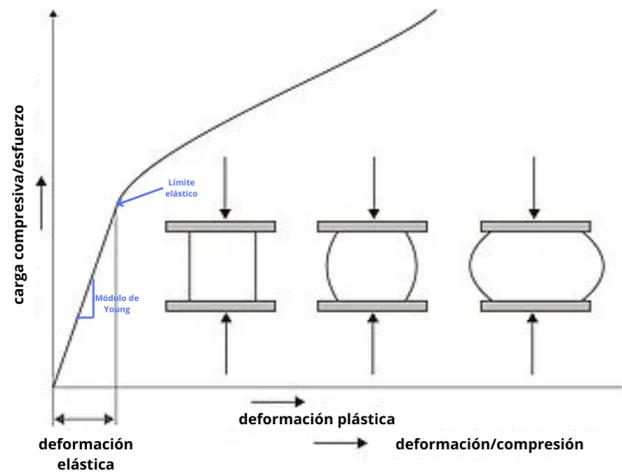


Figura 9: Ejemplo de curva resultante de los ensayos de compresión [50]

Ensayo de tracción Consiste en aplicar una fuerza de tracción axial en una probeta estandarizada, promoviendo la deformación del material en la dirección del esfuerzo, el cual tiende a alargar la probeta hasta la fractura. Al igual que con la prueba de compresión, en esta prueba también se obtiene una curva resultante de tensión-deformación en la cual además del módulo de Young, se puede identificar lo siguiente [51]:

- Límite elástico del material: punto en el cual el material puede volver a su forma original cuando se elimine la tensión. Luego de este punto se produce una deformación permanente.
- Punto de rendimiento: marca el final de la región elástica y el comienzo de la región plástica. En este punto el material experimenta una deformación más profunda la cual le impide volver a su forma original.
- Resistencia última a la tracción: es la tensión máxima que el material puede soportar antes de que ocurra una deformación localizada y es el punto más alto en la curva.

- Punto de fractura: es el punto en el cual el material se rompe.

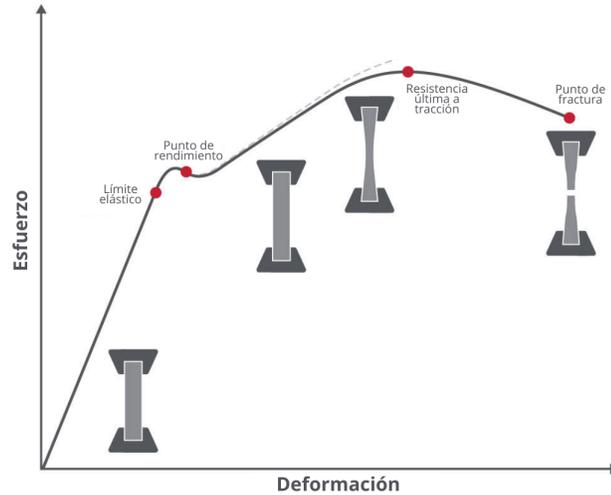


Figura 10: Ejemplo de curva resultante de los ensayos de tensión [50]

Para ambos tipos de pruebas existen probetas estandarizadas con dimensiones específicas para que este parámetro no influya en los resultados. En ambas pruebas existen protocolos estándar dados por la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales (ASTM) para garantizar coherencia y confiabilidad. Por mencionar algunos ejemplos para la prueba de tracción en polímeros se pueden utilizar las normas la ISO6603 [52], ASTM D695 [53] o ASTM D1621 [54] y para los ensayos de tracción ISO 527-1, ISO 527-2 [55] o ASTM 638-14 [56].

Con los resultados de estas dos pruebas se puede analizar si las propiedades son parecidas a las del tejido de interés, en este caso del hueso, (ver Cuadro 2). Un parámetro importante a tomar en cuenta al momento de realizar pruebas mecánicas es la orientación de impresión, ya que se ha demostrado que hay diversas formas de imprimir probetas y que las diferencias son significativas [57], las distintas formas de imprimir las probetas para estos ensayos se muestran en la Figura 11.

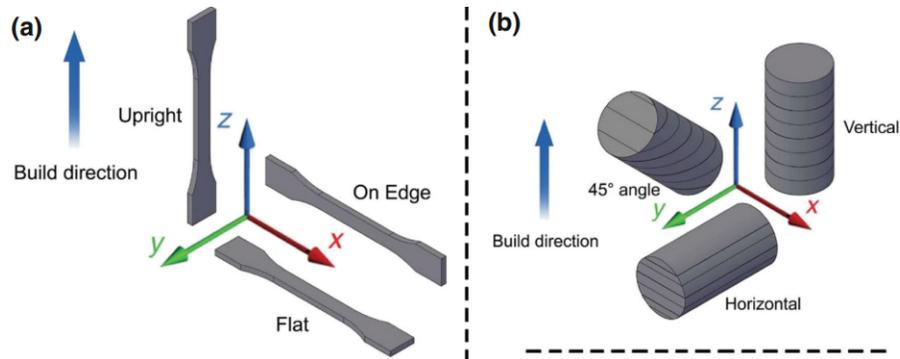


Figura 11: Distintas formas de imprimir probetas para ensayos de tracción (a) y compresión (b) [57]

6.4.2. Pruebas de degradación

Al hablar de un andamio óseo hecho a partir de un material polimérico, se espera que este pueda ser absorbido por el cuerpo tras la formación de nuevo tejido, con su correspondiente morfología y función en el proceso de degradación gradual. Dicho de otra forma, al ser un dispositivo temporal y no permanente, el andamio eventualmente se fusiona con hueso nuevo (Figura 12) [58]. Con esto en mente, se puede decir que este tipo de materiales son biodegradables, lo cual significa que son materiales que tienen la capacidad de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua, compuestos inorgánicos y biomasa [59]. Los modos de degradación se pueden dividir de varios tipos: degradación hidrolítica y enzimática, degradación superficial y masiva o degradación por escisión de cadena final y aleatoria [6]. En el caso de polímeros sintéticos como el PLA o el PCL, su degradación ocurre por el mecanismo de hidrólisis de la cadena principal con enlaces éster, y los productos de degradación pueden ser ácido láctico monomérico u oligonómeros de ácido láctico. Al estudiar la degradación de andamios de forma in vitro se ha demostrado de que está relacionado con la temperatura, pH [59], morfología (e.g. peso molecular) y topología (tamaño y forma del poro) [60]. Además, al igual que en las propiedades mecánicas, existen pruebas estandarizadas para verificar la degradación en un biomaterial polimérico, así como la norma ISO 10993-13 [61].

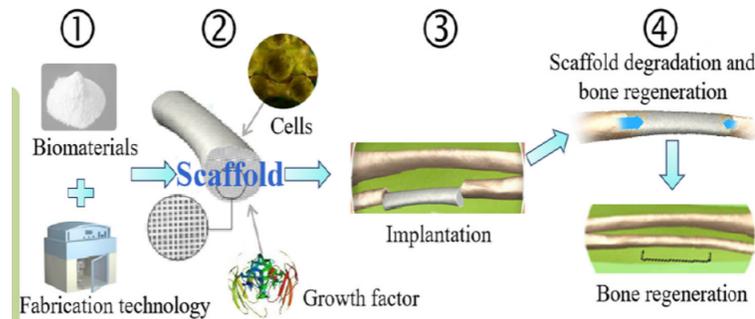


Figura 12: Diagrama del proceso desde la creación hasta la degradación de andamios óseos [6]

6.4.3. Pruebas biológicas

La biocompatibilidad (i.e. capacidad de un material o dispositivo médico para interactuar de forma segura y eficaz en un entorno biológico sin causar daño, reacciones adversas o efectos tóxicos significativos) es otro parámetro importante a tomar al momento de seleccionar materiales para su uso en andamios [40]. Esta siempre comprueba con el uso de líneas celulares y puede ser de las siguientes tres formas según la norma ISO 10993-5: con extracto, de forma indirecta o de forma directa [62] (Figura 13). Los ensayos con extracto consisten en incubar el material de interés por un tiempo determinado en un medio que luego se pone en contacto con células, se incuba y luego se mide cuantitativamente la viabilidad celular. El ensayo de forma indirecta se logra colocando el material de forma indirecta a las células para verificar la interacción de los productos lixiviables y luego medir la viabilidad celular; y el ensayo de forma directa consiste en colocar el material directamente en cultivo con las células, lo cual se incuba y luego se evalúa cualitativamente con microscopía para visualizar la interacción física (así como la adherencia) de las células y el material y verificar la viabilidad celular [47]. La viabilidad se puede medir con reactivos como el MTT

(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), [62], resazurina [40], XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) [47], y a partir de los resultados de la viabilidad celular de las células que contienen materiales con respecto al control, se puede determinar si el material es tóxico o no, a partir de una viabilidad celular $>70\%$ se puede considerar que el material no es tóxico [63].

Para este tipo de ensayo se debe considerar contar con un laboratorio con un nivel de bioseguridad adecuado para cultivos celulares, trabajar bajo condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar y con herramientas y soluciones estériles (e.g. puntas de pipetas y micropipetas, medio de cultivo, placas o pozos de cultivo, etc.), una incubadora de CO₂ utilizada únicamente para cultivos celulares, microscopio invertido, cámara de Neubauer etc.

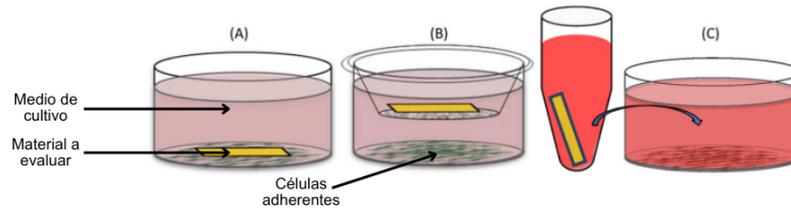


Figura 13: Tres formas de realizar un ensayo de biocompatibilidad los componentes que lo conforman: a) forma directa, b) forma indirecta y c) con extracto [47]

Se realizan las siguientes pruebas utilizando filamento de ácido poliláctico (PLA) marca ESUN 1.75mm de color blanco (Cold white) para la impresora 3D que utiliza la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) marca Prusa MK3S+ (Prusa Research, Praga, Republica Checa)

7.1. Diseño de andamios

Para los andamios investigados en este trabajo, se utilizan geometrías de patrones de relleno estándar en impresión 3D: triángulos, giroide y panal de abeja (honeycomb) [25], [64], [27] y con distinto tamaño de poro, lo cual se logra variando la densidad de relleno en el software de impresión, las cuales se son de del 20 %, 50 %, 75 %, 85 % y 95 %. Luego de inspeccionar las estructuras óptimamente con un estereoscopio marca AMSCOPE AM-SM-3TZ-54S-10M (AmScope, CA, USA), se delimitan el resto de pruebas dentro de este trabajo a los porcentajes de relleno del 50, 75 y 85 %.

Para visualizar estas estructuras se diseña un cilindro en el software Inventor Pro 2022 (Autodesk, CA, USA) de $\phi=10\text{mm}$ y $h=2.5\text{mm}$ y se crean archivos para impresión 3D (STLs) los cuales se modifican en el programa PrusaSlicer 2.6.0. (Prusa Research, Praga, Republica Checa) removiendo los perímetros y capas superiores y colocando los patrones y densidades de relleno mencionadas anteriormente (Figura 14). Estos cambios a una impresión 3D estándar se realizan con el fin de facilitar la observación y análisis de las estructuras. Para ello se debe seleccionar el objeto al cual se desea remover dichos parámetros, dar click derecho y hacer click en la propiedad “capas y perímetros”; seguidamente se abre dicha ventana y en las variables “perímetros” y “capas sólidas superiores e inferiores” se coloca el número 0. Para colocar los patrones y densidades de relleno se selecciona el objeto y en la misma ventana de configuración de impresión se colocan los patrones y densidades de relleno

giroide, panal de abeja y triangular, con densidades de relleno del 50, 75 y 85 % (Figura 15).

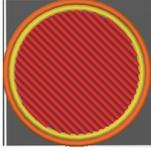
| Parámetro | Previsualización |
|---|--|
| Con perímetros y capas sólidas superiores e inferiores |  |
| Sin capas sólidas superiores e inferiores |  |
| Sin perímetros ni capas sólidas superiores e inferiores |  |

Figura 14: Previsualización al quitar perímetros y capas sólidas superiores e inferiores

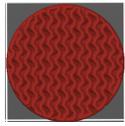
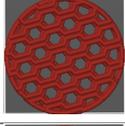
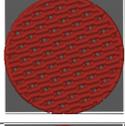
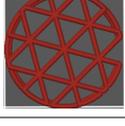
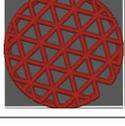
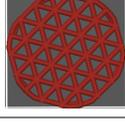
| Patrón | Porcentaje de relleno | | |
|----------------|---|--|---|
| | 50 % | 75 % | 85 % |
| Giroide |  |  |  |
| Panal de abeja |  |  |  |
| Triangular |  |  |  |

Figura 15: Previsualización de los patrones de relleno con diversos porcentajes de relleno. Cilindros de $\phi=10\text{mm}$ y $h=2.5\text{mm}$

Al tener los objetos listos se exporta el código G y se manda a imprimir en 3D por medio de modelado de deposición fundida (FDM) en una impresora Prusa MK3S+ (Prusa Research, Praga, República Checa) disponible en el laboratorio Makerlab dentro de la Universidad del Valle de Guatemala con los parámetros de impresión que se indican en el Cuadro 4 para cada patrón y % de relleno escogido.

Cuadro 4: Parámetros de impresión de las estructuras y poros estudiados

| Parámetros | Valores |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Temperatura de extrusor | 205-215 °C |
| Temperatura de la cama | 60°C |
| Boquilla del extrusor | 0.4 mm |
| Altura de capa | 0.1 mm |
| Patrones de relleno | Triangular, giroide y panal de abeja |
| Capas sólidas inferiores | 0 |
| Perímetros | 0 |
| Capas sólidas superiores | 0 |

Se tiene un total de nueve parámetros establecidos los cuales serán referenciados con un código específico a lo largo de este documento (Cuadro 5).

Cuadro 5: Códigos de estructuras según su patrón y porcentaje de relleno

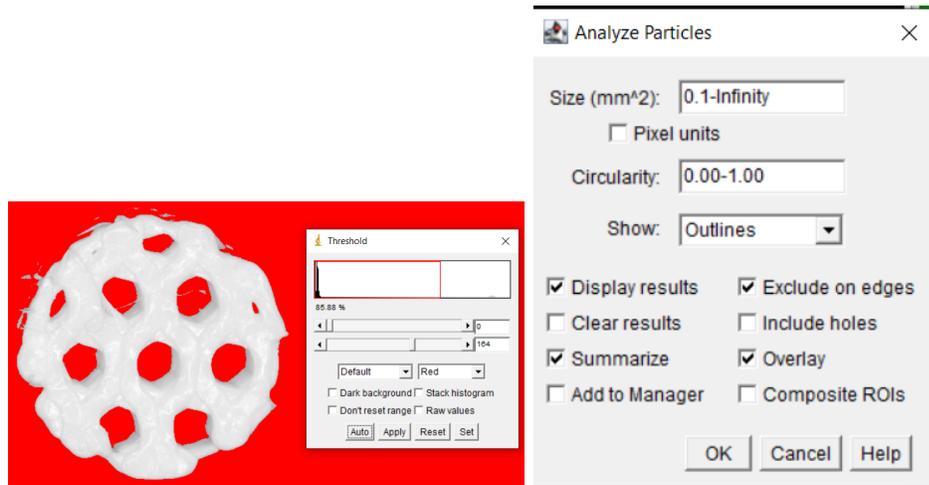
| Código | Patrón de relleno | Porcentaje de relleno (%) |
|--------|-------------------|---------------------------|
| G1 | Giroide | 50 % |
| G2 | Giroide | 75 % |
| G3 | Giroide | 85 % |
| H1 | Panal de abeja | 50 % |
| H2 | Panal de abeja | 75 % |
| H3 | Panal de abeja | 85 % |
| T1 | Triangular | 50 % |
| T2 | Triangular | 75 % |
| T3 | Triangular | 85 % |

7.1.1. Evaluación de macroestructura de los andamios

Las muestras impresas se analizan por medio de microscopía óptica con un estereoscopio y con microscopía electrónica de barrido. Se utiliza el estereoscopio AMSCOPE AM-SM-3TZ-54S-10M (AmScope, CA, USA) con cámara para obtener fotografías por medio del programa AmScope (AmScope, CA, USA), antes de tomar las fotografías se calibran los aumentos con una regla de calibración de micrómetro de microscopio contenida en un kit de microscopio digital Jilusion Wifi (Jilusion, SZ, China) y en cada fotografía obtenida se coloca una barra de escalas en la esquina inferior derecha. Las imágenes obtenidas se analizan en el software ImageJ (National Institute of Mental Health, MD, USA) para determinar el tamaño de poro promedio y la porosidad.

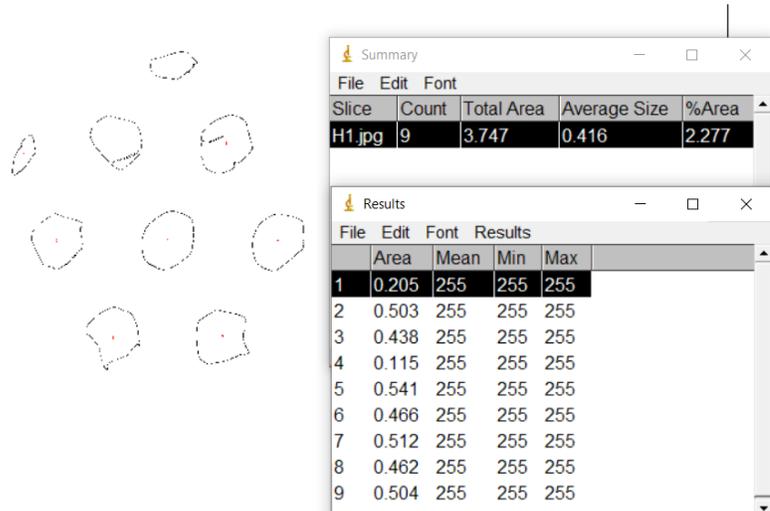
Para el análisis de las imágenes en ImageJ se realiza un análisis de partículas en donde se debe seguir con los siguientes pasos: se establece la escala colocando una línea en la escala presente y se define la dimensión, se establece que el tipo de imagen es de 8-bit, se ajusta y se aplica el threshold a manera de dejar los poros coloreados (Figura 16a), se realiza un análisis de partículas en donde se establece que analice las partículas de tamaños a partir de 0.1mm para que no cuente otras partículas que se pueden generar en los bordes con los filamentos de al rededor, se establece que muestren las partículas analizadas colocando 'overlay mask' en la sección se 'show', también se coloca que se muestren los resultados y un resumen en donde se excluyen los bordes y se incluye un overlay (Figura 16b), se procede a dar click en ok y se muestra el resultado por poro y el resumen de toda la superficie con los poros

coloreados (Figura 37)



(a) Ajuste del threshold en ImageJ

(b) Parámetros establecidos para analizar las partículas



(c) Resultados que se obtienen al realizar el análisis de partículas

Figura 16: Uso del software Image J

Para la evaluación con microscopía electrónica de barrido se utiliza el microscopio JSM-IT500 (Jeok, TK, Japón) ubicado en el Centro de Investigación y Desarrollo (CID) de Cementos Progreso S.A. (Guatemala, Guatemala). Se obtienen fotografías únicamente de las estructuras con 50% de densidad de relleno para evaluar las diversas estructuras microscópicas y verificar si al esterilizar con autoclave los andamios provoca alguna diferencia morfológica (se llevan muestras previamente esterilizadas con autoclave); para ello se colocan las muestras en la platina del microscopio en donde se identifica la posición de cada muestra (Figura 17). Se toman fotografías a diversos aumentos y hasta el aumento más grande que el material pueda soportar, pues este se comienza a desintegrar en aumentos demasiado grandes por la temperatura que emiten los electrones.



Figura 17: Colocación de las muestras a analizar

7.2. Evaluación mecánica

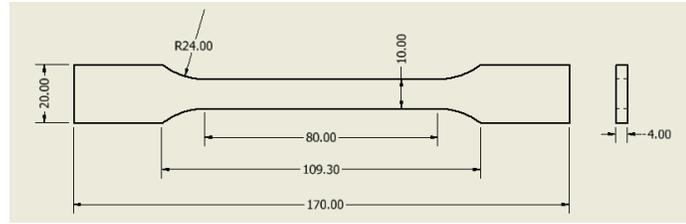
Se realizan ensayos de tracción y de compresión en la Máquina de Ensayos Universales marca Versa Tester (Instron Corporation, MA, USA) presente en el laboratorio de Materiales 1 del departamento de Ingeniería Civil de la Universidad del Valle de Guatemala. Los ensayos se intentan apegar a los estándares ISO 527-2:2012 y ASTM D695 para las pruebas de tracción y compresión, respectivamente, ensayos estandarizados para polímeros los cuales indican dimensiones estándar de las probetas; sin embargo, dado a que la máquina no es específica para polímeros y es especializada en materiales mucho más resistentes (i.e. materiales de construcción) se realizan modificaciones en las dimensiones a las probetas y se ajusta el perímetro de las mismas con el objetivo de tener precisión en los resultados, pues el fabricante indica que por el tiempo de uso ha perdido precisión y se recomienda no hacer ensayos con bajos valores de fuerza (recomendable que sean materiales que resistan fuerzas mayores a 1,000 lbs).

Se diseñan y se iteran versiones de probetas con las dimensiones lo más apegadas a las normativas y con modificaciones dado lo mencionado anteriormente, se imprimen según los distintos tipos de patrón y porcentaje de relleno mostradas en el Cuadro 5 cada prueba se realiza en triplicado con el objetivo de tener mayor robustez estadística. Se realizan tres probetas de cada geometría (9 distintas geometrías), lo cual da como resultado 27 probetas para cada ensayo, con un total de 54 probetas en total.

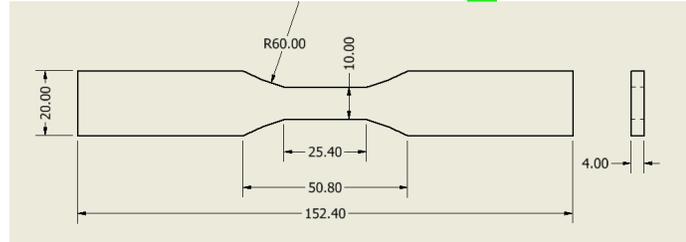
7.2.1. Pruebas de tracción

Se intenta apegarse al estándar ISO 527-2:2012 1A [65], el cual sugiere las dimensiones de la probeta que se muestran en la Figura 18a, y también se diseñan las probetas utilizadas por Pimentel en 2019 [66] con las dimensiones que se muestran en la Figura 18b, dichas probetas se fabrica en Inventor Pro 2022. Se diseñan las probetas con estas dos dimensiones para verificar cuál tiene el mejor desempeño y que se adapte a las limitaciones de la máquina de ensayos.

Luego imprimen tres probetas con perímetro (Figura 19a) y sin perímetro (Figura 19b) con las dimensiones utilizadas por Pimentel 2019 y tres con perímetro (Figura 19c) con las dimensiones dadas por ISO 5721 1A con el objetivo de establecer si el perímetro aporta



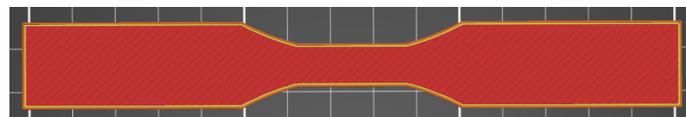
(a) Según ISO 5721 1A [65]



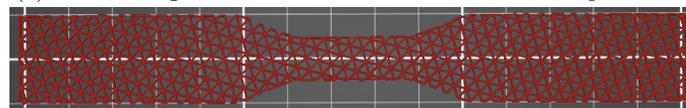
(b) Según Pimentel 2019 [66]

Figura 18: Dimensiones de probetas que se prueban para establecer la dimensión final de las probetas para el ensayo de tracción. Unidad de medida: mm

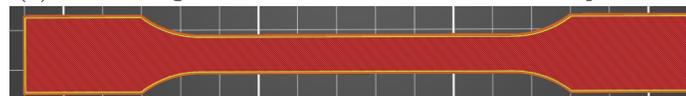
resistencia en la tracción y qué dimensiones de las probetas son las más adecuadas. Para este primer ensayo se trabaja con el patrón de relleno triangular al 50% y los valores de perímetro son de 5 capas inferiores, 0.1 de altura de capa, 2 perímetros superiores y 6 capas sólidas superiores.



(a) Probeta según dimensiones de Pimentel 2019 con perímetro



(b) Probeta según dimensiones de Pimentel 2019 sin perímetro



(c) Probeta según dimensiones de ISO 5721 1A con perímetro

Figura 19: Pre visualización de las primeras probetas a probar en el ensayo de tracción

Se realizan modificaciones en la probeta dada por ISO 5721 1A las cuales se muestran en la Figura 20 en donde se aumenta únicamente grosor para que estas resistan más, se trabaja con los tres patrones de relleno establecidos con una densidad del 50% (ver Figura 21) y se mandan a imprimir sin perímetros. Al tener resultados no satisfactorios dado a que tienen la falla a una fuerza relativamente pequeña establecida por el proveedor de la máquina de ensayos, se procede a realizar otra iteración de la probeta con las mismas dimensiones establecidas anteriormente pero esta vez con perímetros y se valida que tenga más resistencia, de lo contrario, se cancela el ensayo de tracción ya que no se recomienda realizar modifica-

ciones en las dimensiones y es difícil obtener estos resultados en la máquina disponible, pues presenta limitaciones.

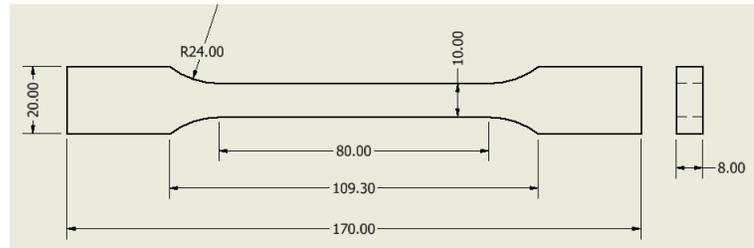


Figura 20: Iteración en las dimensiones de la probeta tomando como referencia las dimensiones dadas por ISO 5721 1A

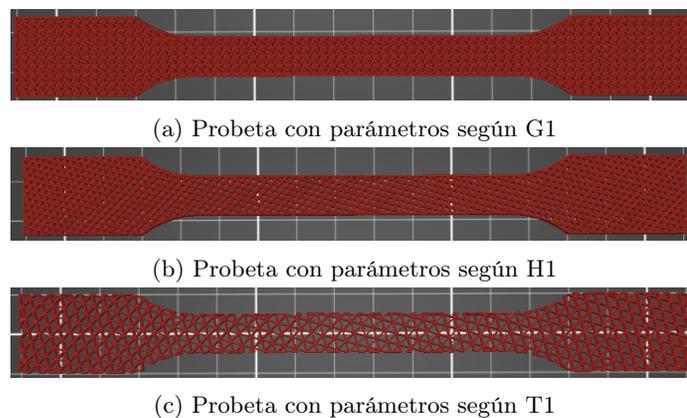


Figura 21: Pre visualización de modificación de las dimensiones de la probeta dadas por ISO 5721 con distintos patrones de relleno

Para realizar las pruebas en la máquina de ensayos universales se monta la máquina para realizar la prueba de tracción, en donde se ajustan unas mordazas según la altura de las probetas. Al estar montada la probeta (Figura 22) se configura la máquina para que ejerza fuerza de tracción de forma lineal y se toman los datos de deformación de forma manual cada 25lbs. Los datos de deformación se leen con dial marca CDI Chicago (CDI Chicago, IL, USA) con una resolución de 0.001 pulgadas (Figura 23)



Figura 22: Montaje de las probetas de tracción en la máquina de ensayos universales



Figura 23: Dial utilizado para leer la deformación de las probetas

Al tener los resultados de la fuerza y deformación, estos datos se procesan para obtener el esfuerzo y la elongación mediante las Ecuaciones [1](#) y [2](#), respectivamente.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

Esfuerzo ejercido hacia de la probeta, donde F es la fuerza aplicada axialmente al objeto dada en Newtons (N) (se realiza la conversión de Lbs a N) y A es el área de la sección transversal de la probeta donde se aplica la fuerza dada en metros cuadrados (m^2). En el caso de las probetas diseñadas, el área transversal es de 40 mm^2 y en el caso de la probeta que se le aumenta el grosor es de 80 mm^2 .

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L} \quad (2)$$

Deformación de la probeta, donde ΔL es el cambio de longitud en mm (se debe hacer la conversión de in a mm) y L la longitud original del objeto, que en el caso de las probeta diseñadas son de 109.3mm y 25.4mm según las dimensiones establecidas por la ISO 5721 1A y las utilizadas por Pimentel en 2019, respectivamente. Al tener los resultados de esfuerzo y deformación, se realizan distintas gráficas en el software Matlab (Mathworks, MA, USA) para visualizar el efecto del patrón, porcentaje de relleno y perímetro; y se identifican los parámetros que dan los resultados más bajos y altos por patrón y de forma global mediante una gráfica de barras. También se obtiene el módulo de Young para cada resultado con las gráficas generadas solo si las probetas sí se apegaron a la limitación establecida por el fabricante.

7.2.2. Pruebas de compresión

Para las pruebas de compresión se utilizan las dimensiones utilizadas por Pimentel en 2019, las cuales sí son aptas a las condiciones de la máquina de ensayos universales, las dimensiones se muestran en la Figura 24 y al igual que las probetas de tracción, se mandan a imprimir con perímetros y sin perímetros únicamente con el patrón de relleno triangular y con una densidad del 50% para establecer si el perímetro le aporta una mayor resistencia, en la Figura 25 se muestra una previsualización de estas probetas las cuales se imprimen en triplicado.

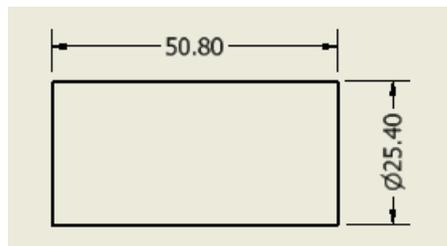


Figura 24: Diseño de la probeta para los ensayos mecánicos de compresión. Unidad de medida: mm

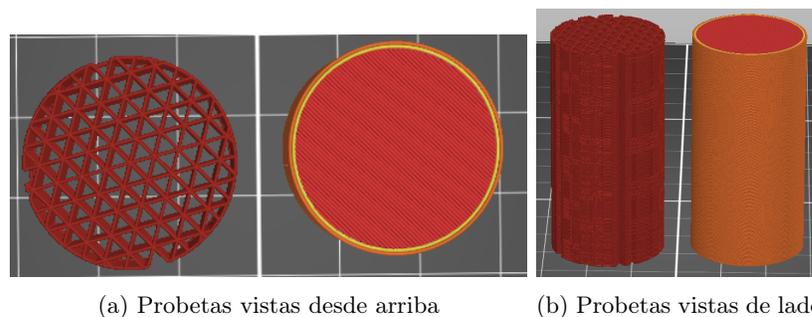


Figura 25: Previsualización de las probetas que se utilizan para la prueba de compresión con perímetro (cilindros de la derecha de cada imagen) y sin perímetro (cilindros a la izquierda de cada imagen)

Para realizar esta prueba se configura la máquina de ensayos universales para pruebas de compresión (Figura 26), ajustando el puente móvil que ejerce la fuerza hacia la probeta de tal forma que quede bien colocada la probeta; se comienza a ejercer la fuerza y se toman datos de deformación forma manual cada 200 lbs con ayuda del mismo sensor analógico (dial) usado para las pruebas de tracción.



Figura 26: Montaje de las probetas de compresión en la máquina de ensayos universales

Al tener los resultados, se procesan para obtener el esfuerzo y la deformación igual que en la prueba de tracción (ecuación 1 y 2). En este caso, el área de la sección transversal de la probeta es de 50.6 cm^2 . Al tener estos datos, al igual que con las pruebas de tracción, se realizan gráficas en Matlab de las probetas con perímetro y sin perímetro. Dados los buenos resultados de las probetas con y sin perímetro de en esta prueba, no se hacen iteraciones en cuanto a las dimensiones de las mismas y se establece trabajar con perímetros. Se procede a mandar a imprimir las probetas con los mismos parámetros de impresión y por temas de optimización de tiempo y material, se mandan a imprimir con altura de capa de 0.2 mm (según estudios no existe una diferencia significativa entre la compresión de muestras con alguna de capa de 0.1 mm y 0.2 mm [67], [68]). Se procede a realizar el ensayo para todos los parámetros de estudio y se establece cuál soporta una mayor carga, cuál tiene la mayor deformación y cuál tiene un mayor módulo de Young mediante gráficas de barras que se realizan en Matlab.

7.3. Evaluación de degradación

Para la evaluación de la degradación de las estructuras se sigue con la normativa ISO 10993-13 [69] para evaluar la degradación de cada estructura a 10 semanas y para los resultados se evalúa el cambio del peso en porcentaje, dicho documento es proporcionado por Ph.D. Mónica Echeverry Rendón. La experimentación consiste en realizar especímenes que quepan en tubos Eppendorf y que cumplan con el requisito de relación peso:volumen de la norma: 1g:10mL. Las dimensiones de los especímenes diseñados son cilindros de $\phi=6 \text{ mm}$ y $h=2.5 \text{ mm}$ que se mandan a imprimir sin perímetro para cada geometría estudiada, se obtiene el peso preliminar el software de PrusaSlicer y se calcula la cantidad del líquido

de incubación a utilizar para tener una idea de cuánto solicitar, el líquido de incubación es buffer fosfato salino (PBS) al 100 %; estos cálculos se pueden observar en el Cuadro 6

Cuadro 6: Pesos preliminares de los especímenes para el ensayo de degradación y cantidad de PBS necesario por cada uno para seguir con la relación 1g:10mL establecida por la norma ISO 10993-13.

| Código | Peso preliminar (g) | PBS necesario (mL) |
|--------|---------------------|--------------------|
| G1 | 0.05 | 0.5 |
| G2 | 0.06 | 0.6 |
| G3 | 0.07 | 0.7 |
| H1 | 0.06 | 0.6 |
| H2 | 0.07 | 0.7 |
| H3 | 0.08 | 0.8 |
| T1 | 0.04 | 0.4 |
| T2 | 0.07 | 0.7 |
| T3 | 0.07 | 0.07 |

El ensayo se realiza a 10 semanas y en duplicado, por lo cual se imprimen 20 especímenes por estructura. Los 20 especímenes por estructura se pesan previamente en la balanza analítica marca Precisa ± 0.0001 g (PRECISA S.r.l., BS, Italia) ubicada en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología (C-105) de la Universidad del Valle de Guatemala. Los pesos se anotan y los andamios se colocan en tubos previamente etiquetados. Antes de colocarlas con PBS se sumergen durante 10 minutos en etanol al 70 % para esterilizar, se lava con PBS y luego se sumerge en los tubos finales en los cuales se incuban a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 semanas, Figura 27.

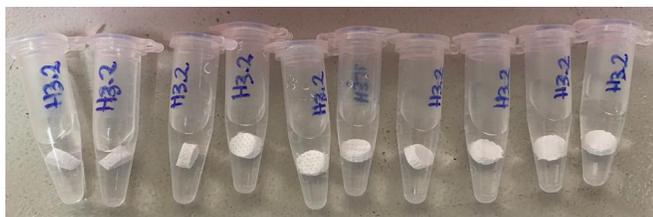


Figura 27: Montaje del ensayo de degradación de una de las estructuras a estudiar

Semana a semana se retira una muestra para evaluar la degradación por medio del cambio en peso de la siguiente manera: se mide el pH del PBS con papel indicador, se retira la muestra, se lava con agua destilada, se seca con papel y se toma el peso mojado. Luego se deja secando en un desecador y se mide el peso cada día hasta que no se observe cambios de peso de un día para otro menor o igual al 0.1 %, eso solo se hace para las muestras de la primera semana y con ello se establece el tiempo de secado para las siguientes semanas. Se establece que las muestras se dejarán secando durante una semana. En la Figura 33 se muestran los especímenes en el desecador con sílica gel, la cual fue secada una vez antes de empezar con el ensayo se la siguiente manera: se seca durante 5h en un horno a 70°C y se supervisaba cada media hora en donde se mueve ligeramente y se observa el cambio de color anaranjado (indicador de que la sílica está mojada) a azul (indicador de que la sílica está seca).

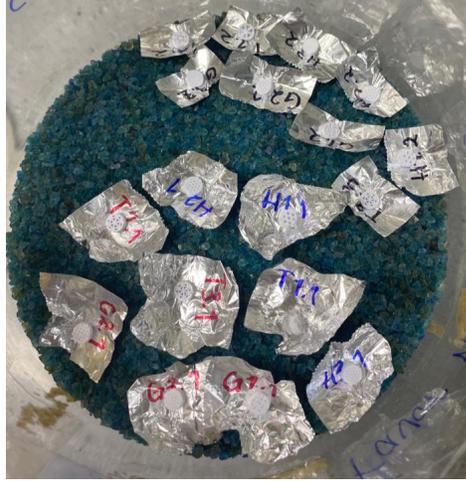


Figura 28: Especímenes en proceso de secado

Al tener el peso final en seco, este se anota y se calcula la absorción del agua con el peso mojado con la ecuación 3 y el cambio de peso final con el peso seco como se muestra en la ecuación 4, ambos cambios en la evolución en peso se grafican en Matlab al tener los resultados de las 10 semanas para verificar si la degradación cambia según la morfología y tamaño del poro.

$$\Delta W_w(\%) = 100 + \frac{W_w - W_0}{W_0} * 100 \quad (3)$$

Absorción de agua de las muestras al recién sacarlas de su tiempo de incubación, donde W_w es el peso mojado y W_0 es el peso inicial, ambos pesos en gramos.

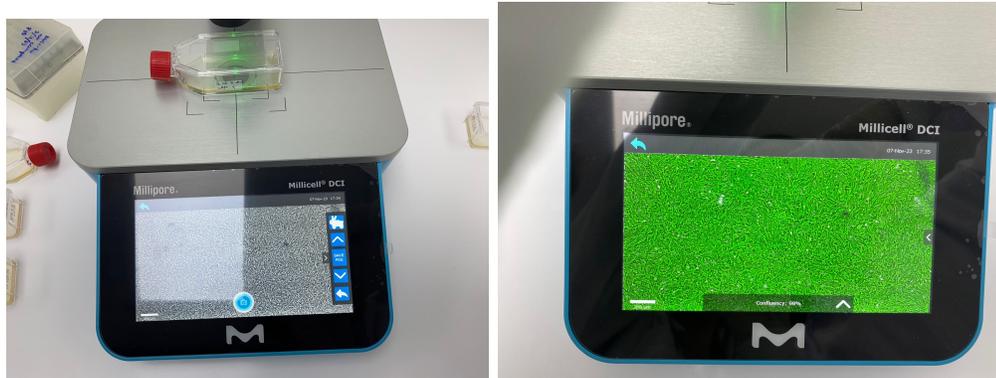
$$\Delta W_d(\%) = 100 + \frac{W_d - W_0}{W_0} * 100 \quad (4)$$

Cambio del peso final donde W_0 es el peso inicial y W_d es el peso en seco luego del período de degradación, ambos pesos en gramos.

Además de realizar este experimento en PBS, este se realiza a corto y mediano plazo con etanol al 70% evaluando la degradación en peso a 15 minutos, 1 hora, 24 horas y 4 semanas para determinar si este método de esterilización afecta a las estructuras en algún punto. También se realiza a mediano plazo durante cuatro semanas en acetona como control positivo y se saca una muestra cada semana. Para las muestras sumergidas en las soluciones mencionadas se toma el peso mojado y seco (luego de secar por una semana) y se realizan los cálculos de cambio en peso según las ecuaciones mencionadas anteriormente. Finalmente, se grafican los resultados del cambio en el porcentaje de peso mojado y seco para cada tipo de estructura.

7.4. Evaluación de biocompatibilidad

En esta experimentación se sigue con el protocolo brindado por Ph.D. Mónica Echeverry Rendón, el cual no se encuentra publicado y se realiza en el Laboratorio de Cultivos Celulares (II-314) ubicado en la Universidad del Valle de Guatemala. Se utilizan células de neuroblastoma de la línea celular LAN1 dado a que son células adherentes y se realiza una prueba indirecta de materiales. Se utiliza el PLA utilizado para las pruebas mencionadas anteriormente y otros dos polímeros disponibles a modo de tener polímeros para comparar esta propiedad (TPU y NinjaFlex, disponibles en el laboratorio D-Hive de la Universidad del Valle de Guatemala). Se comienza haciendo un cultivo inicial a partir de un cultivo previo. El cultivo previo se saca de la incubadora de CO_2 el cual se encuentra en un flask T25, se mide la confluencia en el microscopio Milipore Millicell DCI (Merck, Frankfurt am Main, Alemania) (Figura 29) y si esta es mayor al 80 % se realiza un subcultivo comenzando por el proceso de tripzinización: se retira el medio anterior, se agrega 1 mL de tripsina estéril previamente descongelada, se incuba durante 10 minutos a $37^\circ C$, se agregan 3 mL de medio completo para inactivar la tripsina, se mezcla por pipeteo para retirar las células, se transfiere todo el contenido a un tubo cónico de 15 mL, se saca una alícuota de 1 mL en un tubo Eppendorf y se centrifuga el tubo cónico a 1500 rpm durante 15 minutos con la centrifuga balanceada correctamente.



(a) Colocación del flask en el microscopio Milipore

(b) Cálculo automático de la confluencia

Figura 29: Uso del microscopio Milipore para el cálculo automático de la confluencia

A partir de la alícuota del tubo Eppendorf se realiza un conteo celular con azul de tripano con un factor de dilución de 2: se mezclan $10\ \mu L$ del contenido con células con $10\ \mu L$ de azul de tripano y de esta mezcla se transfieren $10\ \mu L$ en la cámara de Neubauer (la cual se debe limpiar previamente con etanol al 70 % y Kimwipes), se coloca un portaobjetos y se cuenta en el microscopio invertido. Se realiza un conteo celular en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer con ayuda de un contador manual de cuatro dígitos, se realiza un promedio y se calcula la cantidad de células totales según la Ecuación 5, en donde se multiplica por 2 por el factor de dilución y por 10^4 por el total en un mL (factor estándar).

$$CélulasTotalesPorML = PromedioDeLos4Cuadrantes * 2 * 10^4 \quad (5)$$

A partir del conteo celular se calcula la cantidad de células necesarias para sembrar en

un frasco T75 siguiendo la convención de Thermo Fisher Scientific de cultivos celulares [70]: sembrar 2.1×10^6 células con 8-15 mL de medio de cultivo completo (medio de cultivo + 10 % de suero fetal bobino). Se dejan incubando durante 72 horas a 37°C en la incubadora de CO₂. A la vez, se dejan incubando muestras de materiales los materiales analizados en esta prueba (PLA, TPU y NinjaFlex) las cuales se diseñan previamente con un área de 6x5mm y un espesor de 8mm y se imprimen con una densidad de relleno del 100 % con el patrón de líneas, esto para tener un cubo lo más concentrado del material; las muestras se colocan en tubos Eppendorf con 1 mL de medio completo durante 72 horas 37°C en la incubadora de CO₂.



Figura 30: Materiales sumergidos en medio completo para el ensayo de biocompatibilidad

Transcurridas las 72 horas se sacan las células, se hace el procedimiento anterior de tripsinización y conteo celular y se calcula lo necesario para sembrar 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos en dos placas, sembrando las células en los pozos donde se colocarán las células en contacto con los materiales y en los controles y en el resto colocar PBS y medio, siguiendo la convención de la Figura [31], esto se realiza dos veces (dos placas de 96 pozos) y ambas se incuban durante 24 horas. En los pozos de control se colocan células con medio completo y en los pozos de blanco únicamente medio sin células. En cuanto a los materiales incubados, estos se retiran, se descartan y se almacena el medio a 4°C para utilizarlo posteriormente.

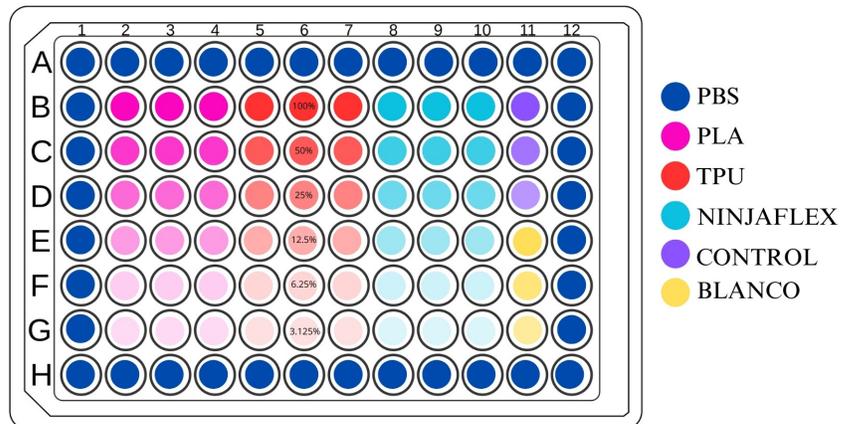


Figura 31: Mapa de siembra de células y colocación indirecta de los materiales a distintas concentraciones

Previo a cumplirse las 24 horas se realiza una dilución seriada de los medios con extracto de materiales en tubos Eppendorf y utilizando medio completo como solución para diluir y obtener distintas concentraciones: 100 %, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 % y 3.125 %. Al transcurrir las 24 horas se retira el medio de ambas placas y se colocan 150 μL de cada extracto siguiendo la convención de la Figura 31. Ambas placas se colocan en la incubadora de CO_2 a 37°C y una se incuba a 24 horas y otra a 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación de cada placa, se observa la morfología de las células en el microscopio Milipore, se retira el medio de todas las células y se colocan 100 μL de medio completo y 10 μL de MTT, para ello se prepara lo necesario en un tubo cónico y se colocan 110 μL de esa solución. Se tapa la placa de 96 pozos con aluminio y se incuba durante 3 horas en la incubadora de CO_2 a 37°C . Transcurrido el tiempo se realiza una lectura de la absorbancia a 570 nm (Figura 32) en el espectrofotómetro BioTek (BioTek Instruments, Inc., VT, USA) y se calcula la viabilidad celular según la Ecuación 6, lo cual se procede a graficar en una gráfica de barras en Matlab y se concluye si los materiales son tóxicos si la viabilidad celular es menor al 70 %.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0,091 | 0,056 | 0,049 | 0,051 | 0,049 | 0,044 | 0,046 | 0,046 | 0,048 | 0,047 | 0,047 | 0,047 |
| B | 0,06 | 1,114 | 1,145 | 1,56 | 0,974 | 0,961 | 0,979 | 1,234 | 1,013 | 0,99 | 1,051 | 0,044 |
| C | 0,066 | 0,929 | 0,959 | 1,092 | 0,993 | 0,978 | 1,027 | 1,268 | 1,11 | 1,074 | 1,132 | 0,046 |
| D | 0,048 | 1,047 | 1,551 | 0,985 | 1,286 | 1,003 | 1,049 | 1,07 | 1,139 | 1,037 | 1,063 | 0,048 |
| E | 0,129 | 1,166 | 0,995 | 1,308 | 1,279 | 1,074 | 1,005 | 1,093 | 1,085 | 1,041 | 1,039 | 0,047 |
| F | 0,083 | 0,958 | 1,06 | 1,128 | 1,044 | 1,154 | 1,058 | 1,041 | 1,048 | 0,982 | 1,023 | 0,116 |
| G | 0,065 | 1,128 | 1,263 | 0,999 | 1,284 | 0,972 | 0,971 | 0,934 | 1,552 | 0,967 | 1,03 | 0,062 |
| H | 0,043 | 0,047 | 0,047 | 0,046 | 0,044 | 0,046 | 0,044 | 0,046 | 0,044 | 0,05 | 0,056 | 0,109 |

Figura 32: Lectura de absorbancias a 570 nm de las células incubadas indirectamente con extractos de materiales y con el ensayo de MTT

$$ClulasVivas = \frac{DensidadpticaDeClulasConElExtracto * 100\%}{DensidadpticaDeLasClulasDelControl} \quad (6)$$



Figura 33: Células con MTT posterior a su lectura en el espectrofotómetro

8.1. Evaluación morfológica de los andamios

8.1.1. Evaluación por medio de microcopía óptica

Inicialmente se establecieron tres distintas geometrías de poro y con cinco distintos, las muestras se imprimieron en cilindros de 10mm de diámetro, 2.5mm de altura y con propiedades de impresión sin bordes, sin tapa superior y con tapa inferior. Las geometrías que se muestran son la geometría giroide, panal de abeja y triangular, las cuales fueron escogidas con base en las diversas formas que tienen y según lo investigado en la literatura.

El patrón giroide presenta principalmente geometrías circulares y ovaladas en densidades de relleno bajas y en densidades de relleno altas parece más tener una forma sinusoidal capa a capa, pues ya no es posible tener la morfología descrita para densidades de relleno bajas. El patrón de panal de abeja son hexágonos con sus aristas bien definidas en densidades de relleno bajas y a medida que sube la densidad de relleno parece ser una morfología más circular que hexagonal. Finalmente, el patrón triangular presenta, como lo indica su nombre, triángulos bien definidos en todas las densidades de relleno, siendo una geometría cuyas paredes son rectas en todo momento sin presencia de figuras circulares como en las anteriores.

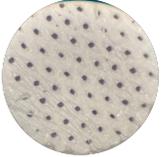
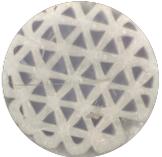
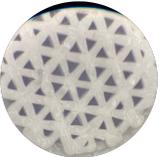
| Patrón | Porcentaje de relleno | | | | |
|----------------|---|---|--|---|---|
| | 25 % | 50 % | 75 % | 85 % | 95 % |
| Giroide |  |  |  |  |  |
| Panal de abeja |  |  |  |  |  |
| Triangular |  |  |  |  |  |

Figura 34: Morfología de andamios impresos en 3D con diversas geometrías y tamaños de poro. Todas las muestras se observan dentro en la totalidad de su diámetro (10 mm)

Al analizar los resultados del cuadro anterior, se decidió descartar las densidades de relleno del 25 % y del 95 %, pues son morfologías con un poro muy grande en el caso del porcentaje de relleno del 25 % en donde muy posiblemente no habrá crecimiento celular y se tendrá baja resistencia mecánica, y en el caso del porcentaje de relleno del 95 % los poros son tan pequeños que no parece haber mayor interconectividad para que las células puedan proliferen. Luego de descartar las densidades de relleno del 25 % y del 95 % se realizó una segunda versión de los cilindros, pero esta vez sin ningún tipo de perímetro, esto con el deseo de poder identificar correctamente los poros que presenta cada geometría para poder describirlos cuantitativamente con el uso de ImageJ.

Con las densidades de relleno delimitadas se procedió a realizar un análisis más profundo de las estructuras escogidas en donde las muestras no presentaran ningún tipo de perímetro. Dichas muestras se observaron en un estereocopio y se obtuvieron fotografías de alta calidad con una escala incluida para su posterior análisis en ImageJ, dichas fotografías se muestran en la Figura 35. Para el patrón giroide se observa que existen más poros en la densidad de relleno del 50 % y que en las otras densidades casi no hay presencia de poros en la superficie. En cuanto a los patrones de panal de abeja y triangular sí hay presencia de poros para todas las densidades de relleno y a simple vista parece que el número de poros es directamente proporcional a la densidad de relleno y que el tamaño de poro es inversamente proporcional a esta misma variable.

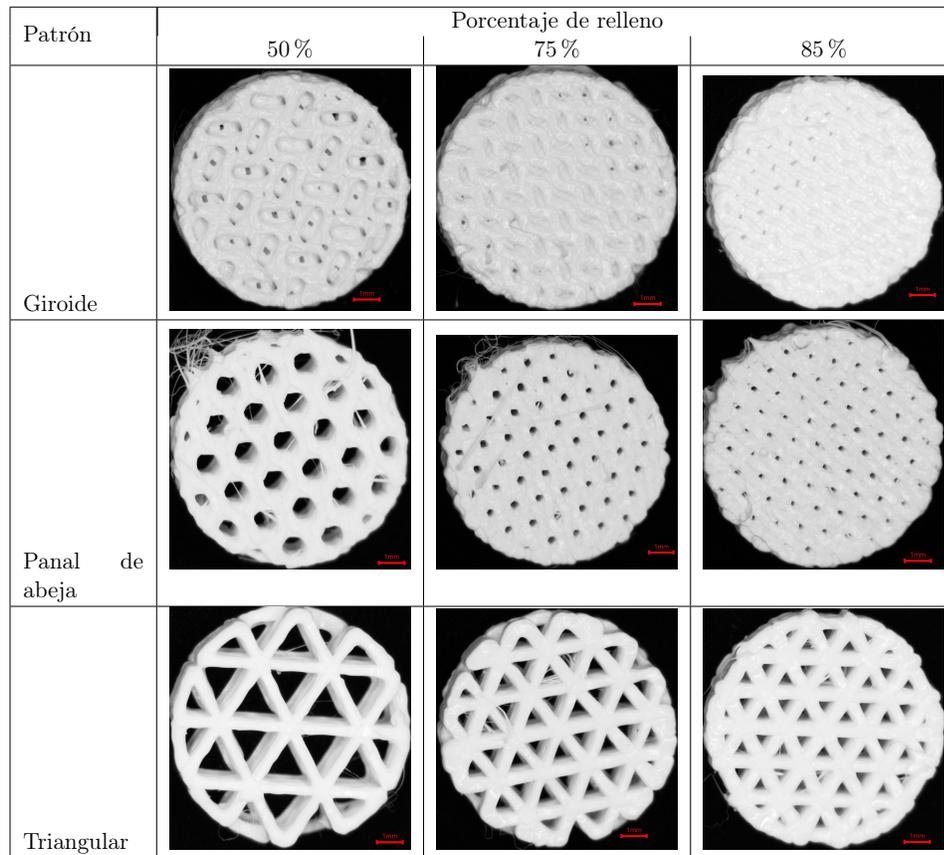


Figura 35: Morfología de andamios impresos en 3D. Cilindros de 10mm de diámetro y 2.5mm de altura. Escala = 1mm

Al obtener las imágenes del cuadro anterior, se procedió a hacer un análisis de partículas y poder describir cuantitativamente los poros de cada tipo de geometría en el software Image J. En la Figura 36 se muestran las partículas reconocidas y analizadas para cada estructura y en la Figura 37 se muestran los resultados para la cantidad de poros contados, el tamaño de poro promedio y la porosidad de cada estructura. Se puede observar que el patrón que tiene una mayor cantidad de poros es el patrón de panal de abeja con densidad de relleno de 85 %, seguido por el patrón giroide con densidad de relleno de 50 % y el tercero con más número de poros es el patrón triangular con una densidad de relleno del 85 %; además, para este parámetro se puede observar que el patrón giroide no presenta una tendencia como los otros patrones, en los cuales se observa que a medida que aumenta la densidad de relleno también aumenta el número de poros presentes (Figura 37a). En cuanto a los tamaños de poro, se puede observar que el patrón triangular con la densidad de relleno de 50 % presenta el mayor tamaño, seguido del patrón de panal de abeja con este mismo porcentaje de densidad de relleno y el tercer patrón con el poro más grande es el triangular con densidad de relleno del 75 %; además, se muestra una clara tendencia en que en los patrones de panal de abeja y triangular el tamaño de poro es inversamente proporcional a la densidad de relleno y que nuevamente el patrón giroide no presenta ninguna tendencia (Figura 37b). Finalmente, para la porosidad, se puede observar que el patrón de panal de abeja con densidad de relleno del 50 % presenta la mayor porosidad, seguido por el patrón giroide con porosidades del 75 % y

85 %, asimismo se puede observar que para este parámetro únicamente el patrón de panal de abeja presenta una tendencia inversamente proporcional con la densidad de relleno (Figura 37c).

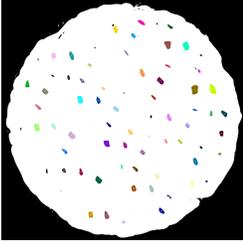
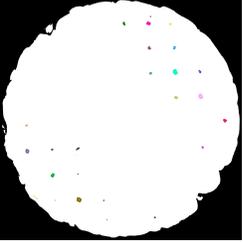
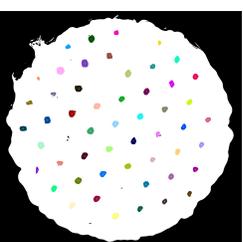
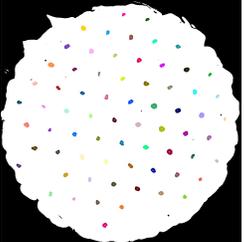
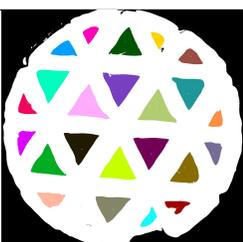
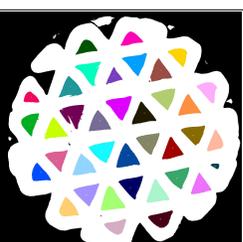
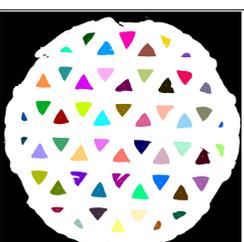
| Patrón | Porcentaje de relleno | | |
|----------------|--|---|--|
| | 50% | 75% | 85% |
| Giroide |  |  |  |
| Panal de abeja |  |  |  |
| Triangular |  |  |  |

Figura 36: Partículas analizadas con Image J. Cilindros de 10mm de diámetro y 2.5 mm de altura

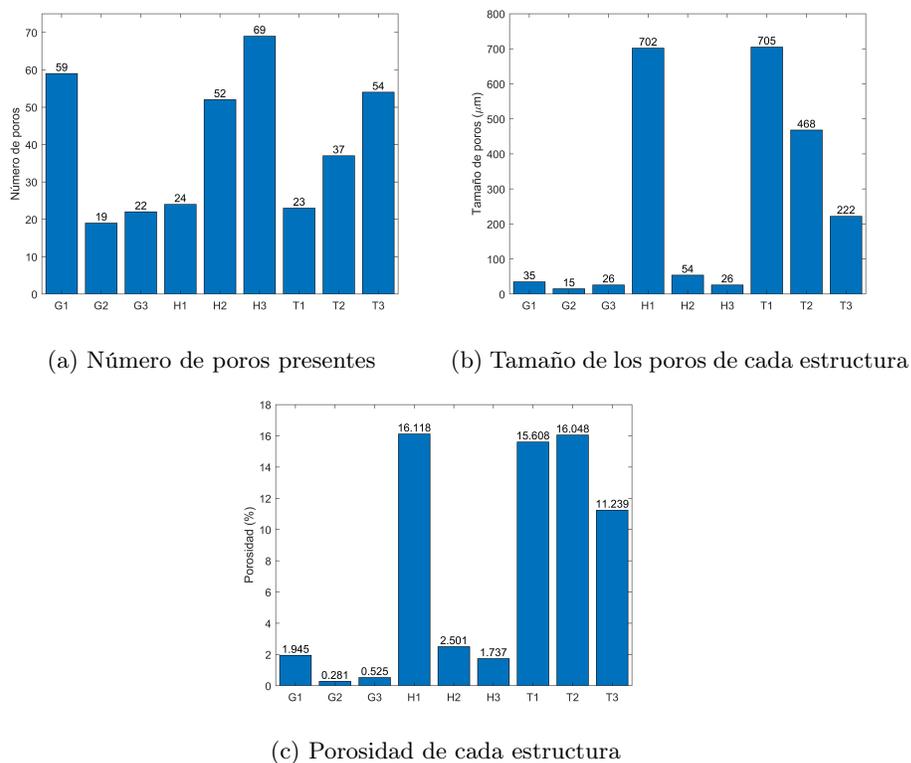


Figura 37: Resultados de los análisis de partículas con Image J para cada estructura

8.1.2. Evaluación por medio de microcopía electrónica de barrido

Para verificar la existencia de porosidad a escala microscópica, posibles errores estructurales en los andamios y cuantificar algunas de las dimensiones de las aristas y poros de los andamios, se realizó un análisis con microscopía electrónica de barrido. Con este análisis también se comprobó que el proceso de esterilización en autoclave no produce cambios estructurales ni químicos relevantes en el material. Estas evaluaciones se realizaron con las tres distintas estructuras analizadas, únicamente con la densidad de relleno de 50%. En cada una de las figuras mostradas a continuación, se muestra una imagen del andamio a nivel macro, a nivel de poro y a nivel de fibra, y en algunas se muestran mediciones.

En las Figura 38 y 39 se muestran las imágenes obtenidas para el patrón de relleno giroide no estéril y estéril, respectivamente, en las cuales se puede observar a nivel macro que los poros son producto de la unión semicírculos y que se crean óvalos grandes pero que no se clasifican como poros porque no se crean a lo largo de la estructura (Figuras 38a, 39a); además, se puede observar esta diferencia entre los poros y óvalos según las mediciones de la Figura 39b. En la Figura 38b se puede observar uno de los poros a una escala mayor, en donde se muestra que la superficie de los bordes que lo conforman es totalmente lisa y no se identifica una porosidad a micro escala. También se identifica la presencia de fibras que no forman parte de la estructura, las cuales posiblemente son producto de la impresión 3D (Figuras 38d y 39d) y la presencia de agujeros en uno de los bordes, lo cual se puede clasificar como una imperfección en el material (Figura 38c)

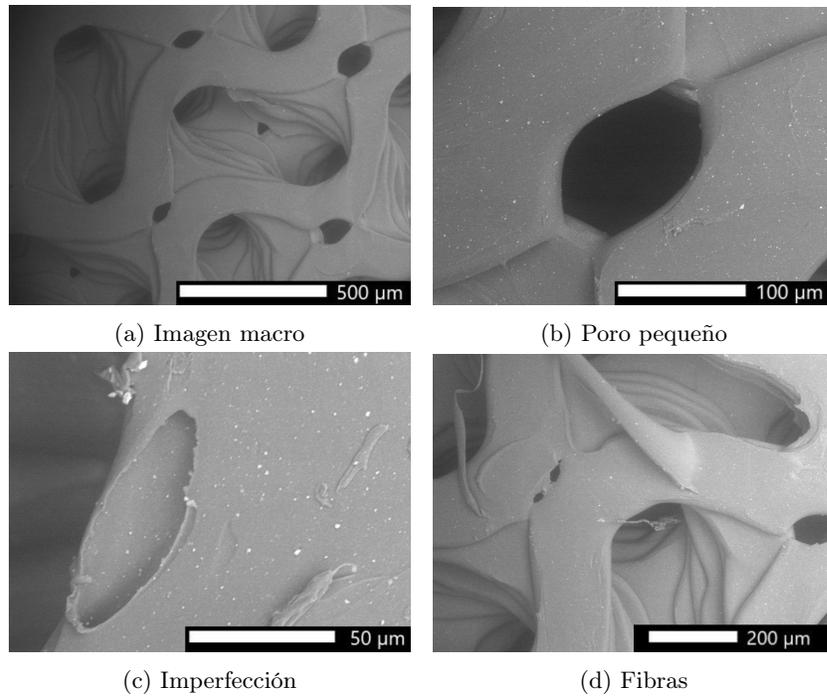


Figura 38: Imágenes de barrido electrónico para la muestra Giroide 50% (G1) sin esterilizar. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones

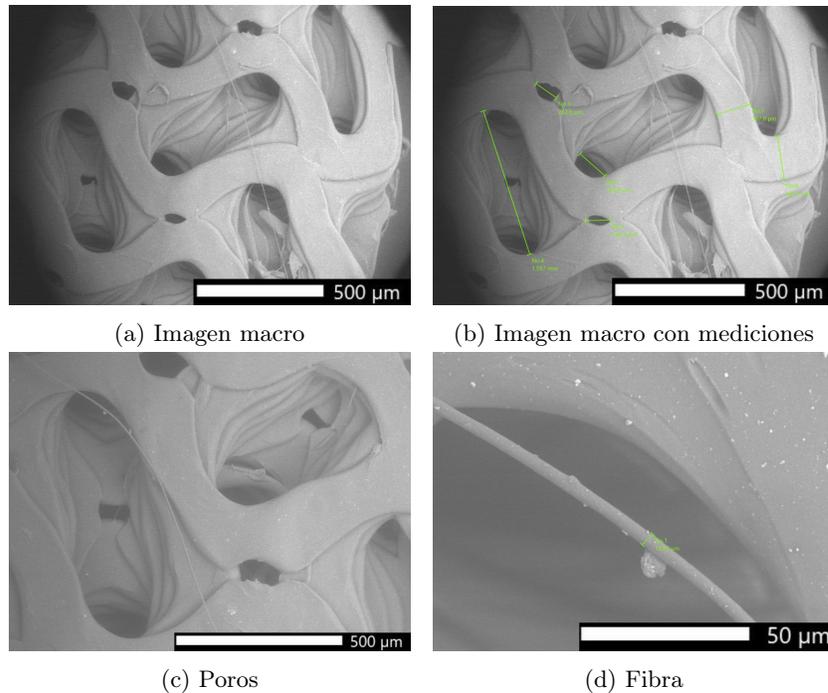


Figura 39: Imágenes de barrido electrónico para la muestra Giroide 50% (G1) sometida a esterilización por autoclave. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones

En las Figuras 41 y 41 se muestran las imágenes obtenidas para el patrón de panal de abeja no estéril y estéril, respectivamente. Para estos patrones también se visualiza la estructura a escala macro (Figuras 40a y 41a), se cuantifican algunas propiedades del tamaño de poro y de las paredes (Figuras 40a y 41b), se muestran fibras (Figura 40c) y el espacio entre las uniones de las paredes de cada patrón (Figura 41c). Además, en este patrón se realizó un análisis con mayor aumento (Figura 40d) en donde fue posible observar algunas microfibras y microporos; también se demostró que al momento de querer observar el material a un mayor aumento, el material comienza a disociarse por los efectos de la temperatura de los electrones del microscopio (Figura 41d).

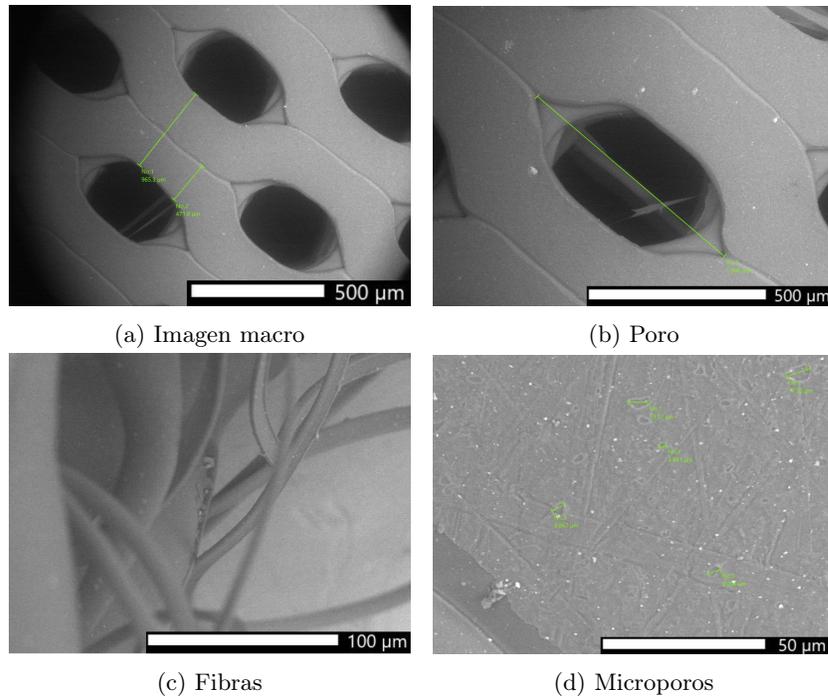


Figura 40: Imágenes de barrido electrónico para la muestra Panal de Abeja 50 % (H1) sin esterilizar. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones

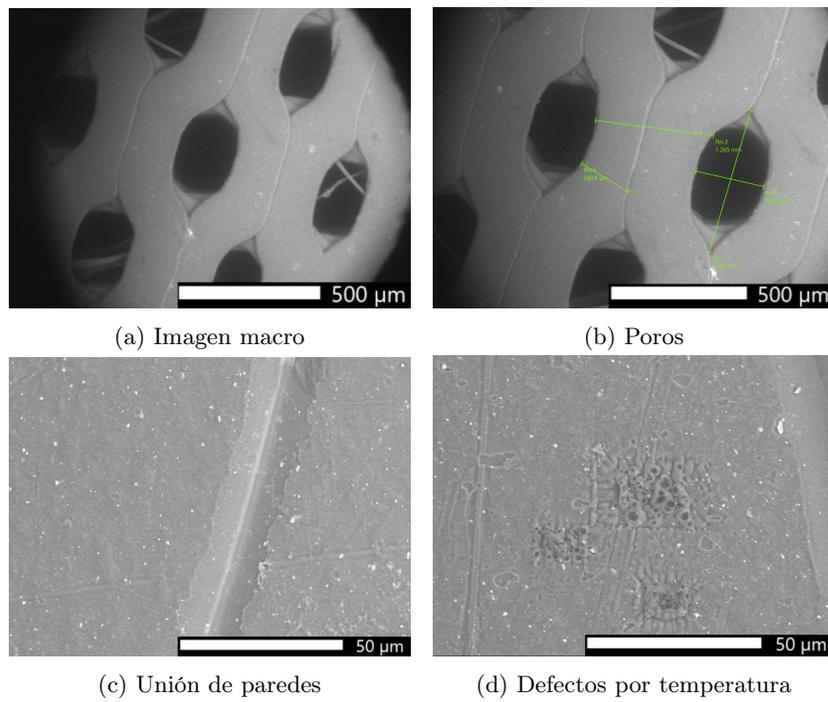


Figura 41: Imágenes de barrido electrónico para la muestra Panal de Abeja 50 % (H1) sometida a esterilización por autoclave. Diversos puntos de enfoque y magnificaciones

En la Figura 42 se muestran las imágenes obtenidas para el patrón triangular no estéril

y estéril, por motivos de tiempo, no se realizó un análisis tan profundo como en las estructuras anteriores, pero se pudo observar que no existe ninguna diferencia estructural entre la muestra no estéril [42a](#) y la estéril [42b](#); lo único que vale la pena mencionar es que hay un pequeño incremento del grosor de las aristas de la muestra estéril con respecto a la no estéril. Además, fue posible observar pequeños microporos en la arista central de esta muestra [42c](#).

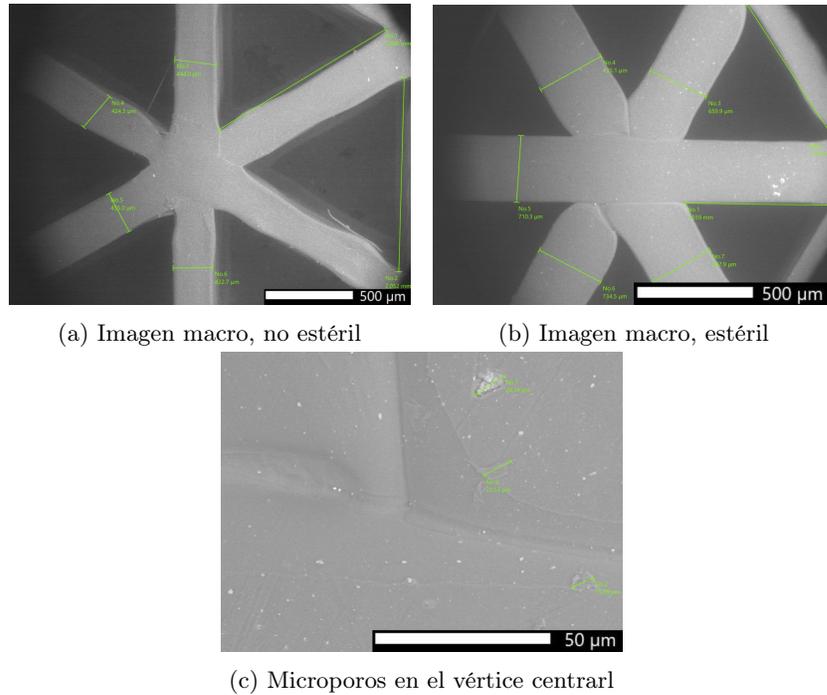


Figura 42: Imágenes de barrido electrónico para la muestra Triangular 50 % (T1) sin esterilizar (a) y sometida a esterilización por autoclave (b y c). Diversos puntos de enfoque y magnificaciones

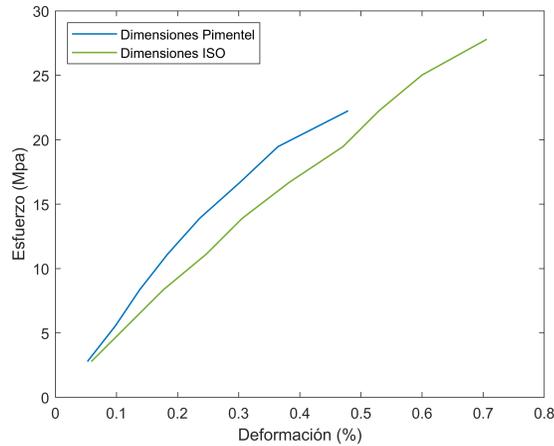
8.2. Ensayos mecánicos

Inicialmente se realizaron pruebas para determinar si el tamaño de las probetas establecidas funcionaban adecuadamente en la máquina disponible en la Universidad y, a la vez, se evaluó si existía diferencia alguna en realizar las probetas impresas con o sin perímetros; esta prueba inicial se realizó con el patrón triangular con 50 % de densidad de relleno tanto en las pruebas de tracción y compresión. Luego, al tener las dimensiones adecuadas de las probetas se procedió a realizar las pruebas para todas las estructuras estudiadas.

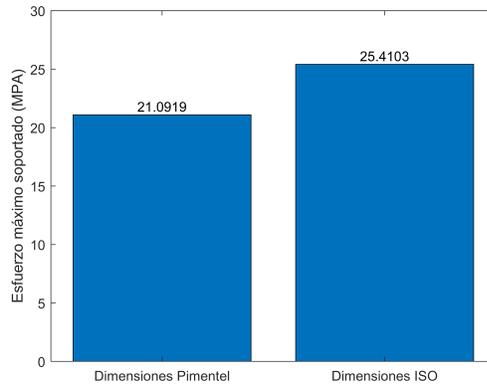
8.2.1. Ensayos de tracción

Para las primeras pruebas de tracción, se compararon las dimensiones de las probetas utilizadas por Pimentel en 2019 [66](#) y las establecidas por la ISO 527 1A [65](#), esto con el motivo de establecer qué probeta funcionaba y se adaptaba mejor para la máquina disponible en la Universidad (Figura [43](#)). En esta Figura [43a](#) se pueden observar los resultados para cada dimensión, en donde se muestra que las probetas con dimensiones establecidas por la

ISO 527 son más resistentes y también presentan una mayor deformación, y en la Figura 43b se muestran los resultados del esfuerzo máximo soportado en cada probeta antes del quiebre, en donde la probeta establecida por la ISO 527 es la que soportó más. A pesar de que la probeta con las dimensiones establecidas por la ISO 527 soportaron más que las utilizadas por Pimentel en 2019, estas no lograron cumplir con el mínimo de fuerza para realizar ensayos en la máquina según el fabricante (>1000 lbs lo cual son 111 MPa para estas probetas), por esta razón se aumentó el grosor de las siguientes probetas a analizar.



(a) Comparación entre probetas con distintas dimensiones



(b) Comparación del esfuerzo máximo soportado antes del quiebre entre probetas con distintas dimensiones

Figura 43: Pruebas iniciales de tracción. Comparación entre distintas dimensiones de probetas: las utilizadas por Pimentel en 2019 [66] y las establecidas por la ISO 527 1A [65]

También se intentó hacer el ensayo utilizando las dimensiones de Pimentel en 2019 utilizando probetas sin perímetros, esto para comprobar únicamente la resistencia del patrón de relleno y sin tener algún factor que aportara más estabilidad (en este caso el perímetro). Los resultados para esta prueba fueron insatisfactorios, pues tenían tan baja resistencia que provocaba que al momento de realizar el montaje en la máquina de ensayos, las probetas se rompieran sin comenzar a ejercer fuerza alguna. Por esta razón, se volvió a hacer este análisis con las dimensiones de las probetas establecidas por la ISO 527 (tras demostrar que estas

resisten más) y se aumentó también su grosor. Finalmente, se hizo un análisis comparativo entre las probetas con y sin perímetro para los tres patrones de relleno estudiados y todos con una densidad de relleno del 50 % (Figura 44). En esta Figura se puede observar una clara diferencia entre las probetas impresas con perímetro que las impresas sin perímetro, en donde las primeras tienen una mayor resistencia. A pesar de los cambios en las dimensiones, las probetas siguieron sin cumplir con el mínimo de esfuerzo establecido por el fabricante de la máquina de ensayos. Tras estas iteraciones de intentar establecer dimensiones de las probetas para este ensayo y resultando todas insatisfactorias por no cumplir con el mínimo de fuerza requerido establecido por el fabricante, se canceló el ensayo de tracción. Otra razón por la cual se canceló el ensayo fue porque no se recomienda cambiar las dimensiones de probetas estandarizadas, pues los resultados ya no son comparables con otros ensayos al rededor del mundo.

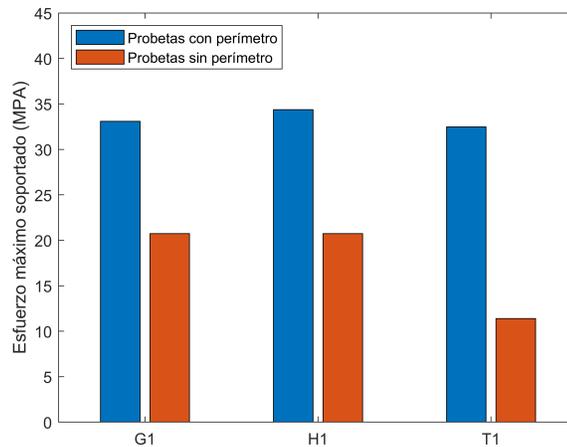


Figura 44: Comparación de la resistencia a tracción máxima utilizando las dimensiones de las probetas establecidas por la ISO 527 con el doble del grosor. Comparación entre probetas impresas con y sin perímetros

8.2.2. Ensayos de compresión

Para la prueba de compresión se utilizaron las dimensiones utilizadas por Pimentel en 2019, y para las primeras pruebas también se comprobó si el perímetro brindaba una mayor resistencia a compresión, los resultados para esta hipótesis se muestran en la Figura 45, en donde se muestra que las probetas con perímetro tienen levemente una mayor resistencia pero los resultados son casi los mismos para las probetas con perímetro y sin perímetro, lo cual también lo refleja el valor p.

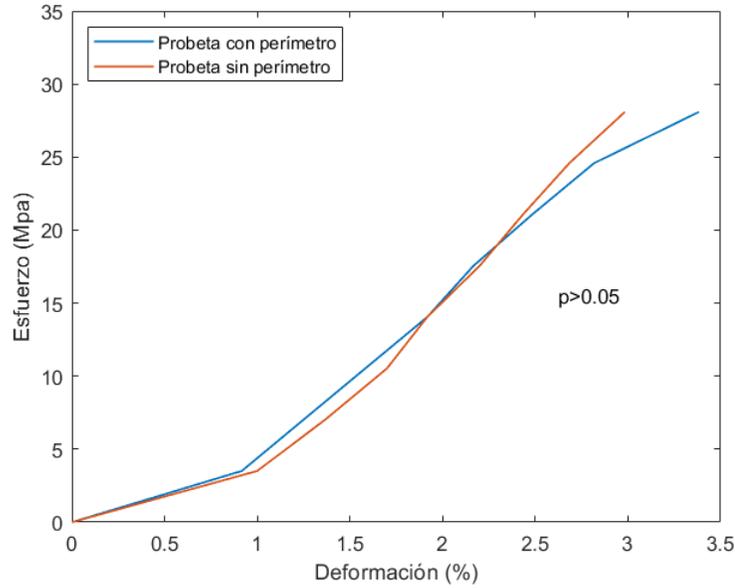


Figura 45: Comparación de la resistencia a compresión de las probetas con con y sin perímetro utilizando las dimensiones empleadas por Pimentel en 2019 [66]. Probetas con patrón de relleno triangular con densidad del 50 %

Tras establecer que el perímetro no tiene mayor influencia en las pruebas de tracción se realizaron las pruebas de compresión para todos los parámetros estudiados en el presente estudio con probetas con perímetro (Figura 46). Como estas pruebas se hicieron en triplicado, se realizó un promedio de la deformación para cada estructura antes de llegar al esfuerzo máximo alcanzado y de tal forma que se tuviera la misma cantidad de datos para cada muestra; esta deformación se muestra graficada en azul en la Figura 46. Para los esfuerzos máximos no se realizó un promedio de cada uno, pues estos tenían distintos valores en ambos ejes, por lo cual se representan graficados con asteriscos (*) en cada una de las sub gráficas de dicha figura. Esta gráfica presenta los mismos ejes en x y en y con el objetivo de poder hacer una comparación en general, en donde se puede observar que la muestra G1 es la que resiste menos esfuerzo, que la muestra T1 es la que tiene menor deformación, que la muestra T3 es la que más esfuerzo resiste y que la muestra H1 es la que presenta una mayor deformación.

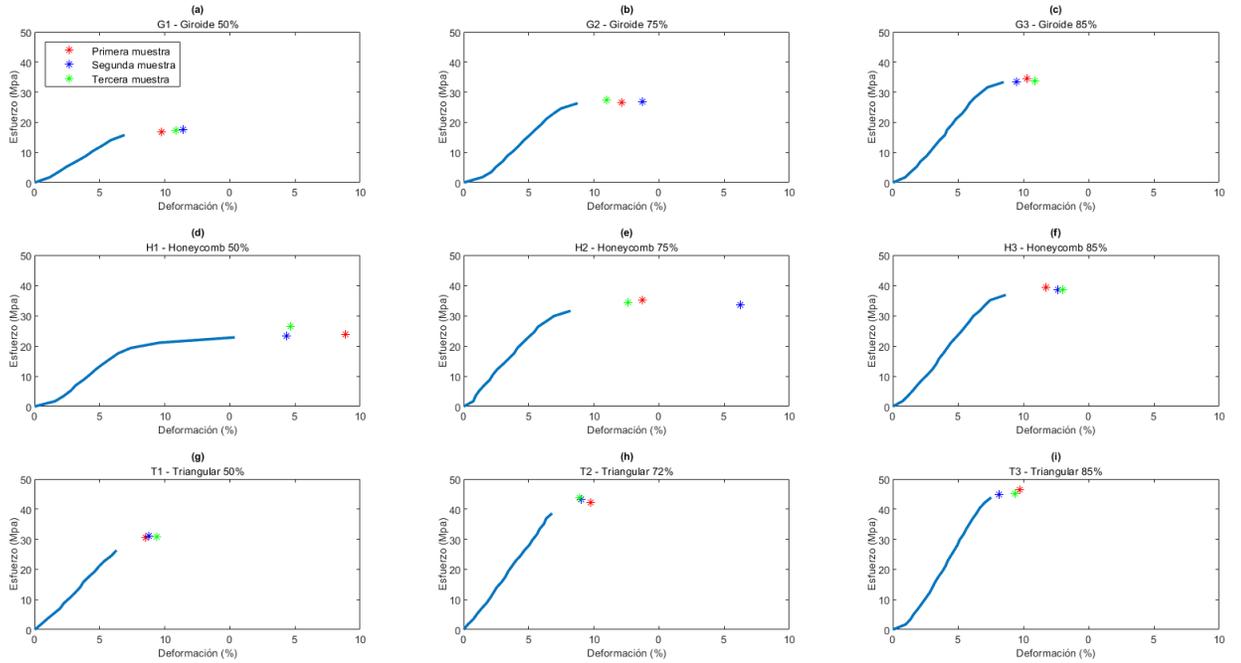


Figura 46: Comparación de pruebas de compresión de cada estructura estudiada

Para poder observar una comparación más cercana a las zonas elásticas y entre patrones de relleno, se realizó la Figura 47, en donde se puede observar que en todos los patrones de relleno, la densidad de relleno del 50% es la menos resistente, que en el patrón giroide la densidad de relleno de 75% es significativamente menor que con la densidad de relleno de 85% y que en los patrones panel de abeja y triangular con densidades del 75% y 85% no se observa una diferencia tan significativa.

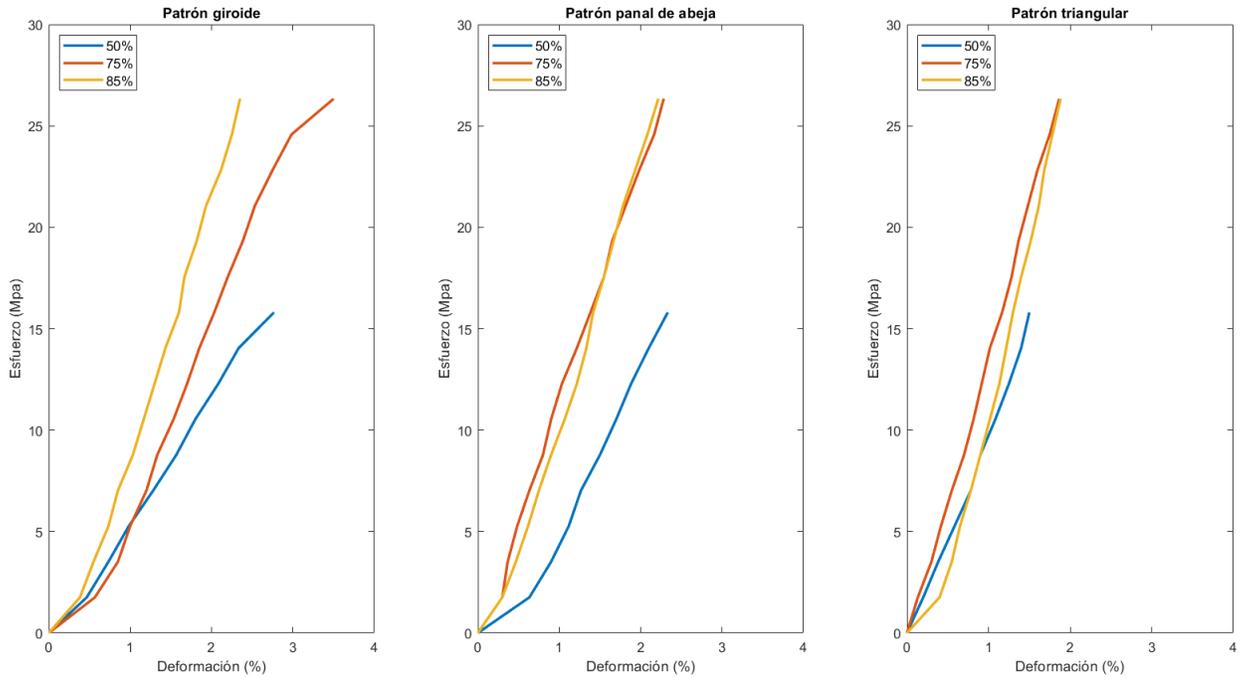


Figura 47: Comparación de pruebas de compresión agrupadas según los patrones de relleno

También se puede observar una comparación entre las densidades de relleno en la Figura 48, en donde se puede observar nuevamente el hecho de que los tres patrones a una densidad de relleno del 50% presentaron menor resistencia y que en todos los casos el patrón triangular tiene una menor deformación, seguido por el patrón de panal de abeja y finalmente el patrón giróide presenta la mayor deformación en todos los casos de densidades de relleno.

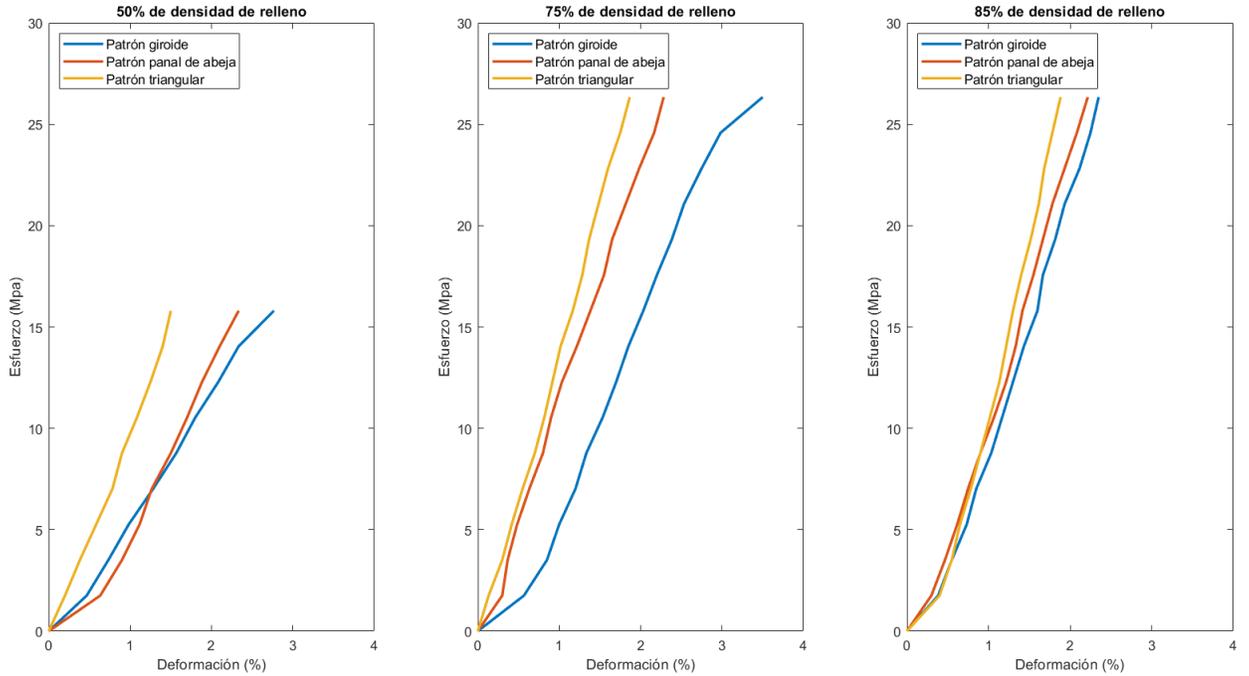
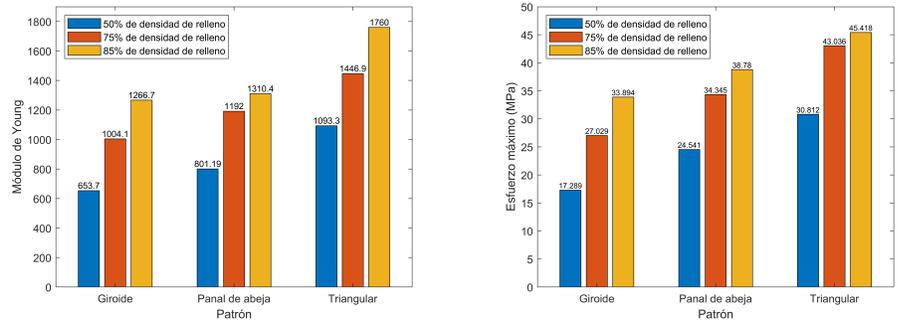
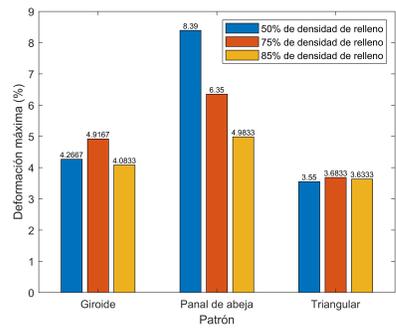


Figura 48: Comparación de pruebas de compresión agrupadas según las densidades de relleno

Para finalizar con esta prueba se realizaron varias gráficas de barras para realizar una comparación entre el Módulo de Young, esfuerzo máximo soportado y deformación máxima para cada estructura (Figura 49). En cuanto al Módulo de Young y esfuerzo máximo soportado, se puede observar que hay una clara relación directamente proporcional entre estas variables y el porcentaje de relleno y que en ambas variables el patrón triangular presenta un mayor desempeño, seguido por el patrón panel de abeja y que el patrón giroide tiene los resultados más bajos (Figuras 49a) y 49c). En cuanto a la deformación máxima los patrones giroide y triangular permanecieron levemente en el mismo rango mientras que para el patrón panel de abeja se muestra un comportamiento inversamente proporcional entre la deformación y la densidad de relleno.



(a) Comparación entre Módulos de Young (b) Comparación del esfuerzo máximo promedio soportado



(c) Comparación de la deformación máxima promedio

Figura 49: Comparación entre el Módulo de Young (a), esfuerzo máximo (b) y deformación máxima (c) de cada estructura estudiada

8.3. Ensayos de degradación

En la prueba de degradación se estudió si la degradación era distinta según la geometría y el tamaño del poro de los andamios (patrón de relleno y porcentaje de relleno, respectivamente). En este ensayo se obtuvieron dos cambios en el porcentaje del peso, el cambio de peso al recién sacar las muestras sumergidas en PBS (Figura 50) y el cambio de peso al dejar secar las muestras por una semana (Figura 51). Como el ensayo se realizó en duplicado, en ambas figuras se muestran sub figuras con dos gráficas en cada plano cartesiano, las cuales pertenecen a la primera muestra y a la segunda (muestra duplicada). También se muestra una porción en ambas figuras de una línea punteada, la cual representan dos semanas que no fue posible obtener resultados debido a falta de acceso al laboratorio por motivos políticos en el país.

Al observar detenidamente la Figura que muestra los pesos mojados (Figura 50) se puede notar que en todos los casos hay una notable absorción de agua. Se identifican casos en los cuales la absorción de agua de las primeras semanas le da un aumento igual o mayor del 10% del peso a los andamios G1, G2, H1 y H2. En los casos de G3, H3 y T1 la absorción de agua las primeras semanas se mantuvo en el rango de aumento de peso entre el 5% y 10% y en los casos de T2 y T3 la absorción de agua significó un aumento en peso menor al 5%.

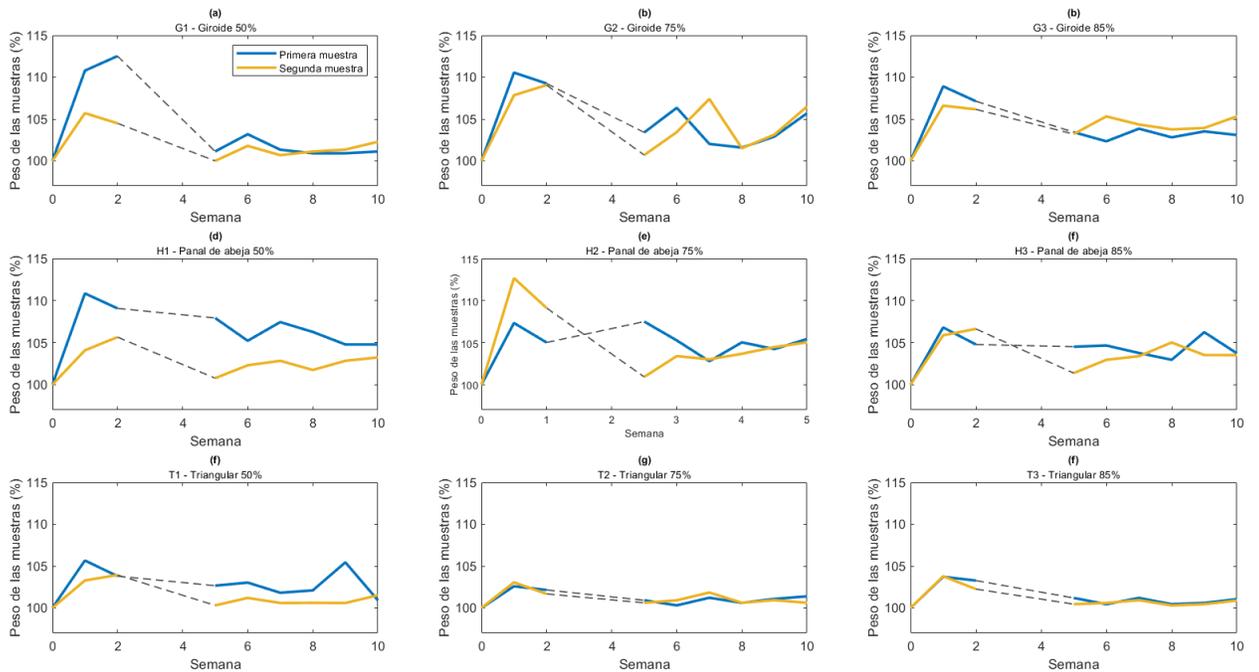


Figura 50: Comparación de los pesos mojados del ensayo de degradación de todas las estructuras

En cuanto al cambio de peso de las muestras cuando estas se han secado tras haberlas sacado de la incubación en PBS se puede observar que en casi todos los casos no hubo pérdida de peso sino que una ganancia. En los únicos casos donde se observa una ligera pérdida de peso fueron en la muestra duplicada de G1, en G2, en G3 y en las últimas semanas de T1 y T3, no obstante, estos cambios no representan ni el 2% de cambio en peso. En los demás casos se observa que el peso permanece estable, sin mayor evolución en peso. También se puede observar que el caso de H3 fue el más estable.

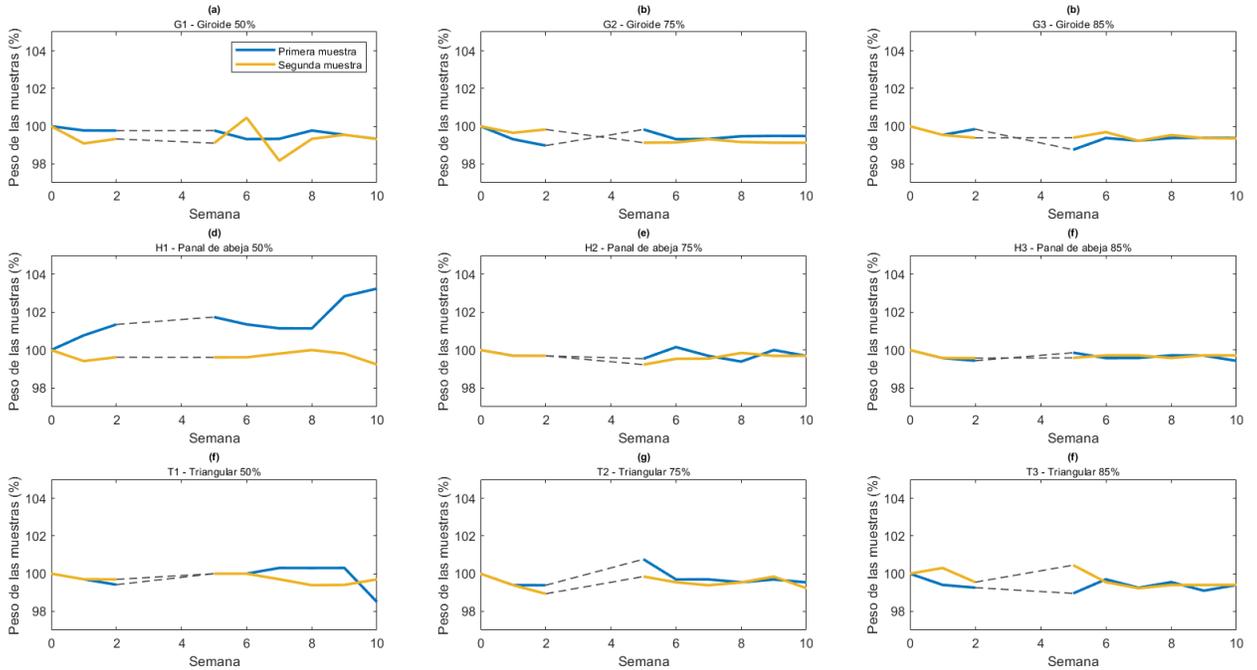


Figura 51: Comparación de los pesos secos del ensayo de degradación de todas las estructuras

Al sacar las muestras de PBS se midió el el pH de la solución para verificar si la degradación produce cambios en este parámetro. El pH medido fue igual para todas las muestras en las diez semanas (Figura 52).

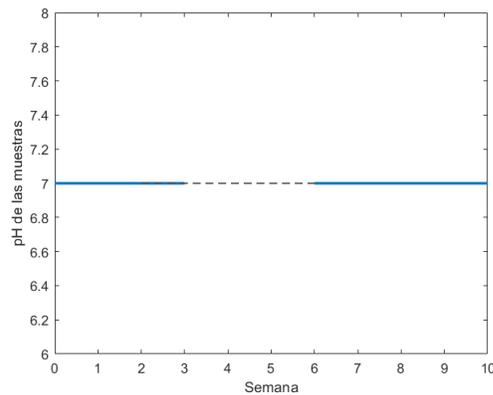


Figura 52: Cambio en el pH de las muestras al sacarlas de PBS

Para verificar si tras sumergir los andamios en etanol al 70% (lo cual es útil para esterilizar las muestras) ocurre alguna especie de degradación, se sumergieron los andamios durante 15 minutos, 1 hora, 24 horas y 4 semanas (Figura 53). En esta figura se muestra el cambio del peso en porcentaje de los andamios al sacar las muestras sumergidas (líneas azules) y al ponerlas a secar durante una semana (líneas rojas). En todos los casos se puede observar que el peso mojado es mayor que el peso seco, que los aumentos de peso más grandes ocurren en G2 (15 minutos), G3 (24 h) y H1 (15 minutos). También se puede observar que

para todos los casos, a excepción de G2, el peso final permanece estable a las 24h de estar sumergido en etanol y que este aumenta levemente (menos del 2 %) a las cuatro semanas de estar sumergido en esta solución.

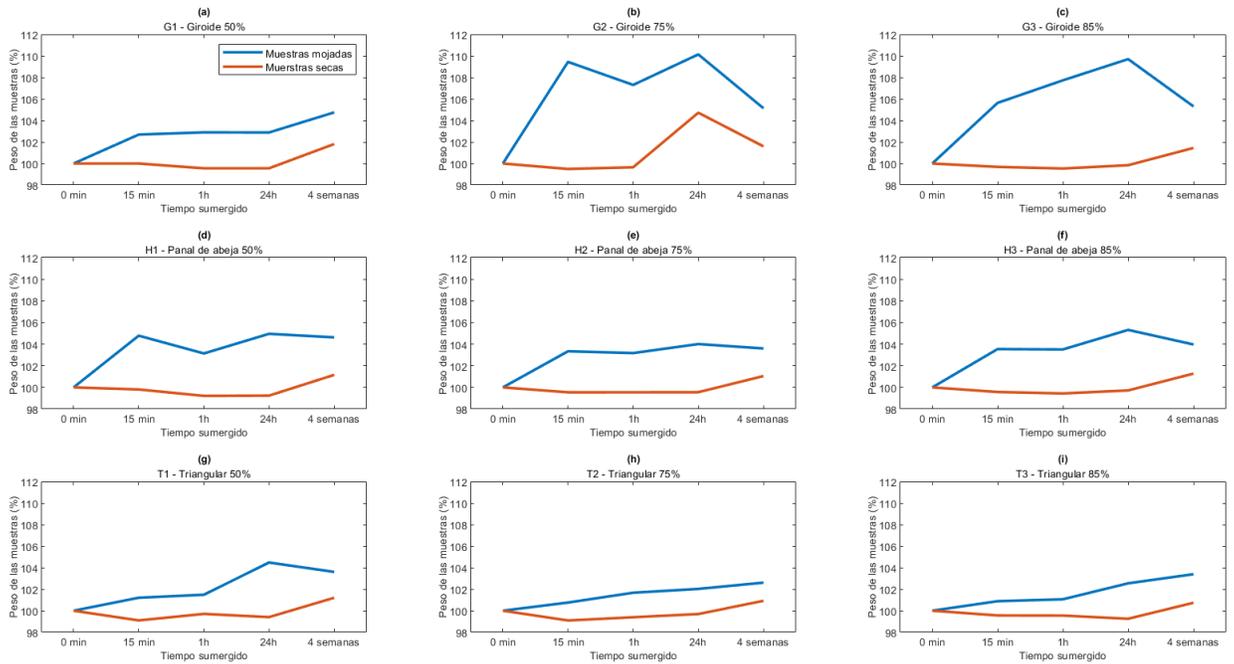


Figura 53: Comparación de los pesos tras sumergir las muestras en etanol al 70 %

A modo de tener un control positivo, se sumergieron los andamios en acetona durante cuatro semanas y se evaluó la evolución en peso cada semana (Figura 54). En esta Figura se puede observar, al igual que al sumergirlas en etanol y en PBS, que al sacar las muestras de la solución hay un aumento del peso con respecto al peso original (peso mojado), también se puede observar que el mayor cambio en aumento de peso ocurre la primera semana y en las siguientes semanas este peso tiene un comportamiento decreciente. En cuanto a los pesos de las muestras secas se puede observar que en todos los casos el peso permanece estable y sin algún cambio relevante.

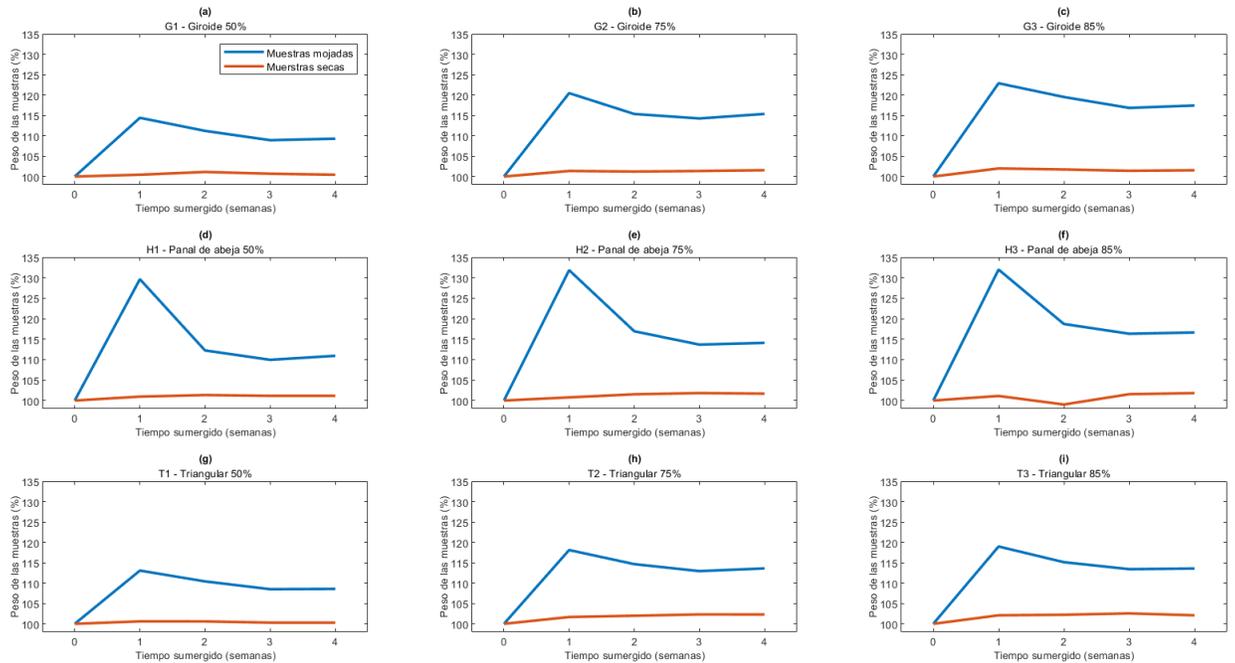


Figura 54: Comparación de los pesos tras sumergir las muestras en acetona al 99%

A pesar de que las muestras sumergidas en acetona no presentaron un cambio en el peso, al momento de sacar las muestras de esta solución a partir de la segunda semana se observó un pellet al fondo de los tubos Eppendorf que parecía ser restos de degradación de las muestras (Figura 55). También se identificaron muestras que al sacarlas con las pinzas y aplicarles una mequeña fuerza, estas se deformaban (Figura 56).



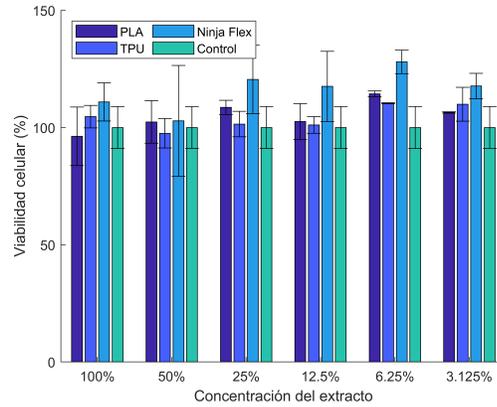
Figura 55: Presencia de pellets al fondo de los tubos con andamios sumergidos en acetona



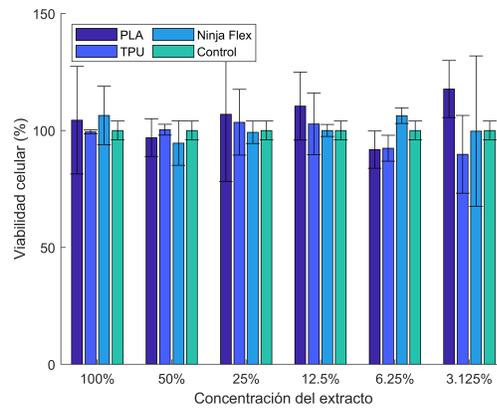
Figura 56: Cambios morfológico en las estructuras T1 y G1 sumergidas en acetona al 99% y tras aplicarle fuerza con pinzas

8.4. Ensayos de biocompatibilidad

Para el ensayo de biocompatibilidad se expuso la línea celular LAN1 indirectamente a tres distintos polímeros para impresión 3D, incluido el PLA; se incubó y se midió la absorbancia a 24h y 72h para finalmente verificar si los materiales son biocompatibles o no. En la Figura 57 se muestra que tras incubar las células indirectamente con los materiales no se produce una muerte celular significativa o preocupante ($>70\%$) y que al contrario, se produce una mayor viabilidad celular en casi todos los casos tras compararlo con el control. En esta figura también se muestran las desviaciones estándar de la viabilidad celular para cada material, la cual es mayor en el ensayo a 72h.



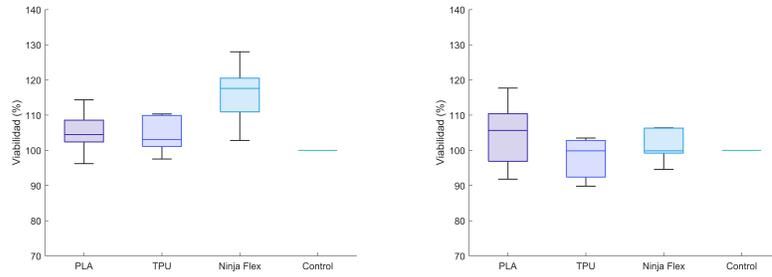
(a) Viabilidad celular a 24h



(b) Viabilidad celular a 72h

Figura 57: Cambios en la viabilidad celular al exponer las células LAN-1 indirectamente a distintas concentraciones de los materiales estudiados

Para verificar si existe alguna diferencia entre la viabilidad celular a 24h y 72h se realizó una gráfica de barras para estos dos tiempos (Figura 58). En esta Figura se puede observar que la media de la viabilidad celular del PLA y del TPU en ambos tiempos permanece relativamente igual, a diferencia de la media de la viabilidad celular con el NinjaFlex, la cual cambia en aproximadamente un 20%.



(a) Gráfico de caja de la viabilidad celular a 24h

(b) Gráfico de caja de la viabilidad celular a 72h

Figura 58: Comparación de gráficos de barras de la viabilidad celular a 24h y 72h tras exponer las células LAN1 a distintos polímeros

Discusión de los resultados

Se realizaron andamios hechos de ácido poliláctico (PLA) con diversas geometrías y tamaños de poro mediante impresión 3D, específicamente por medio de modelado por deposición fundida (FDM). Las geometrías analizadas fueron el patrón giroide, panal de abeja y triangular, y se cambió el tamaño de poro ajustando diversas densidades de relleno: 50, 75 y 80 %. A estas estructuras se les realizó un análisis de porosidad para determinar el número de poros, el tamaño del poro y la porosidad total por medio de un análisis de partículas con el software Image J. Las estructuras con 50 % de densidad de relleno se observaron bajo un microscopio electrónico de barrido en donde se observó si el proceso de esterilización por autoclave produce algún cambio en la morfología del poro o del material. Cada estructura se estudió mecánicamente mediante una prueba de tracción y de compresión y una prueba de degradación a diez semanas sumergida en PBS. Adicionalmente se evaluó si el material utilizado es biocompatible con células de neuroblastoma LAN1.

9.1. Evaluación morfológica de los andamios

Los andamios fueron realizados con diversas geometrías y tamaños de poro (Figuras 35 y 36), las cuales tenían geometrías giroide, panal de abeja y triangular y se varió el tamaño del poro variando la densidad de relleno. En la Figura 37 se puede observar que para el patrón giroide el tamaño de los poros está en el rango de los 15 y 35 μm y que no existe una tendencia entre el número de poros, el tamaño y la porosidad, esto puede que se deba a que en este tipo de patrón y densidades de relleno, la impresora no es capaz de dejar poros de forma homogénea a lo largo de la superficie por la resolución, lo cual puede que sea una desventaja al momento de colocar los andamios directamente con células, ya que para crecer estas necesitan interconectividad y en el caso de aplicaciones óseas, esto es necesario para permitir un crecimiento interno de vasculaturas, para suministrar oxígeno y otros nutrientes

a las células y para promover una eliminación de desechos [22]. Al comparar el tamaño de poro con la porosidad, esta tiene sentido que sea baja, ya que en un estudio donde se utilizó este mismo patrón, se encontraron porosidades por encima del 65 % a partir de un tamaño de poro de $340\mu\text{m}$, por lo cual, una baja porosidad se ve relacionada con un tamaño de poro pequeño; además, se describe que este patrón tiene la misma arquitectura de poros en los tres ejes (x, y y z), lo cual es beneficioso ya que esto hace que el andamio tenga una mayor interconectividad y permeabilidad en comparación con los andamios bidimensionales [71]; sin embargo, a pesar de que la interconectividad de esta geometría es buena, los parámetros de tamaños de poro estudiados no se consideran aptos para la aplicación del estudio por la baja porosidad y se recomienda estudiar esta estructura a futuro con densidades de relleno menores.

En cuanto al patrón de panal de abeja, se puede observar que en la densidad de relleno del 50 % (H1) se tiene el mayor tamaño de poro ($702\mu\text{m}$) y porosidad (16.118 %) y que estos parámetros decrecen drásticamente al aumentar las densidades de relleno a 75 % y 85 %. En cuanto al patrón de relleno triangular, se puede observar que los tamaños de poro superan los $200\mu\text{m}$ en todos los casos y están en el rango de $222 - 705\mu\text{m}$, lo cual es bueno ya que el tamaño ideal de poro se recomienda que esté en el rango de $100 - 1000\mu\text{m}$ [72], [73] y cuando el tamaño de poro es menor a $100\mu\text{m}$ la distribución celular se ve restringida, dando como resultado una disminución en la viabilidad, proliferación y diferenciación celular [73], por esta razón, el patrón giroide a las densidades de relleno estudiadas, no se recomienda para esta aplicación. Ahora bien, las estructuras que sí cumplen con esta convención son el patrón de panal de abeja al 50 % de densidad de relleno (H1) y todas las triangulares. También la diferencia del tamaño de poros es más frecuente en poros triangulares que circulares, donde la distribución es más uniforme y puede que los patrones de panal de abeja y triangulares sean más efectivos que el giroide por la presencia de esquinas, ya que las células se distribuyen más en estas geometrías y según la ubicación, no obstante, puede que una combinación entre geometrías o porosidades pueda ser una buena idea como se ha explorado en otros estudios [74] ya que la forma de poro esférica es más adecuado para hueso trabecular, mientras que la forma lineal es más adecuada para el hueso cortical [22].

Las porosidades obtenidas [37c], las cuales los mayores valores fueron del 16 %, no se consideran adecuadas para ninguno de los casos, ya que a pesar de que el hueso cortical tiene una porosidad del 3-12 % y el trabecular del 50-90 % [75], estudios previos recomiendan utilizar andamios con porosidades a partir de 30 % hasta 99 % [76] o bien utilizan densidades de relleno menores para tener una mayor porosidad así como demostraron Baptista y Guedes en 2021 tras utilizar densidades de relleno de 30, 50 y 70 % para lograr porosidades de 70, 50 y 30 %, respectivamente [26]. También se recomienda explorar otros métodos de evaluación de la porosidad de andamios para tener más seguridad y certeza del valor de este resultado, por mencionar otras opciones, se podría utilizar el método de desplazamiento de líquido, el método gravimétrico o el método de porosimetría de mercurio [76].

En la microscopía electrónica de barrido fue posible observar más a detalle las estructuras estudiadas con una densidad de relleno del 50 % y a la vez se comprobó si el proceso de esterilización por autoclave no produce algún cambio morfológico significativo. En todos los casos se pudo observar que la superficie del material es completamente lisa, plana y que no hay presencia notable de microporos, lo cual se pudo comprobar hasta un aumento de $50\mu\text{m}$, pues a partir de este aumento se observó que el material comenzaba a desintegrarse y se

observaba una especie de ebullición, por lo cual no se exploró la microporosidad a un aumento menor (Figura 41d). Fue posible identificar presencia de fibras basura que no pertenecían al patrón de relleno (Figuras 38d, 39d y 40c) las cuales son restos de material que se conocen como encordados o stringing, los cuales son productos de la impresión cuando el filamento es extruido durante movimientos de no impresión, cuando el extrusor se mueve entre capas o realiza un desplazamiento o cuando la temperatura del extrusor y la velocidad de impresión es demasiado alta y lo cual se puede evitar ajustando estos parámetros de impresión [77]. También se identificó una región en donde se encontró un agujero en la superficie del material (Figura 38c) el cual puede que se haya formado en el proceso de impresión del andamio. También se realizaron algunas mediciones en los andamios (Figuras 39b, 40a, 40b, 41b, 42a y 42b) en donde es posible observar que las muestras estériles tienen un pequeño aumento en el tamaño de las aristas, lo cual puede que se deba a que el material absorbió agua tras el proceso de esterilización, haciendo que la superficie se vea un poco mayor.

9.2. Ensayos mecánicos

En los ensayos de mecánicos, se sabía que la máquina disponible en la universidad, la máquina de ensayos universales marca Versa Tester (Instron Corporation, MA, USA) no era específica para polímeros y a sugerencia del proveedor, no se debían realizar ensayos de muestras que resistieran menos de mil libras, ya que debajo de este número la máquina presentaba poca precisión.

9.2.1. Ensayos de tracción

Para los ensayos de tracción se tuvieron que realizar iteraciones de las probetas, la motivación principal era realizar probetas sin perímetro, ya que se demostró que el perímetro aumenta la resistencia, pero al observar que estas probetas apenas resistían colocarse en la máquina de ensayos, se decidió realizar los ensayos con perímetro. Al explorar las dimensiones de las probetas utilizadas por Pimentel el 2019 [66] y las recomendadas por la norma ISO 527 1A [65] se obtuvo que las dimensiones dadas por la norma ISO tuvieron una mayor resistencia que las utilizadas por Pimentel (Figura 43) pero aún así no se adaptaban a la recomendación del proveedor de la máquina de ensayos, razón por la cual se decidió duplicar el grosor de las probetas y volver a realizar la prueba, en donde se exploró realizar el ensayo de probetas con y sin perímetro. En la Figura 44 se muestran los resultados del esfuerzo máximo soportado por estas probetas y variando la densidad de relleno, se puede observar que las probetas con perímetro tienen una mayor resistencia que las que no tienen perímetro y que el patrón de relleno no hace que se tenga una mayor resistencia a tracción. Al obtener que duplicar el grosor de las probetas estas aún no se adaptaban a la limitación de la máquina de ensayos, se decidió cancelar la prueba.

Al comparar los resultados con otros estudios, se hubiera esperado que el patrón giroide tuviera una considerable mayor resistencia y que las probetas (sin duplicar el grosor) resistieran un promedio de 25MPa a lo sumo [78], indicador de que la máquina de ensayos disponible no era la adecuada. Para poder realizar este ensayo de manera confiable se recomienda contar con maquinaria especializada como la máquina Shimadzu AGS-X (Shimadzu

Corp., Kyoto, Japón) equipado con celda de carga de 100 kN de capacidad [79], [78] o la máquina universal marca Roell (Roell GmbH, Dortmund, Alemania) equipada con una celda de carga de 10 kN [80], [81].

9.2.2. Ensayos de compresión

En este ensayo las dimensiones propuestas por Pimentel en 2019 funcionaron adecuadamente y se adaptaron a la limitación mencionada por el proveedor. El resto de las pruebas se hizo con perímetro pensando que se iba a poder hacer también la prueba de tracción con probetas con perímetros, a pesar de que el ensayo de tracción se canceló, se demostró que el perímetro no aumenta tanto la resistencia a compresión ($p > 0.05$) [45] por lo cual fue irrelevante realizar el ensayo con o sin perímetros. En todos los patrones de relleno se observó que al aumentar el porcentaje de relleno se tiene un mayor módulo de Young y resistencia máxima (Figuras [47] y [49]), lo cual es de esperar ya que a mayores densidades se utiliza más material y los poros son más pequeños, lo cual hace que tengan una mayor resistencia; además, es de esperar este comportamiento tras comparar estos resultados con otros estudios en donde se obtuvo el mismo comportamiento [67], [82], [54]. También se obtuvo que el patrón triangular fue el que obtuvo una mayor resistencia en todas las pruebas (Figura [48] lo cual puede que se deba a que esta es una estructura que se forma en dos dimensiones y se ha comprobado que estas tienen una mayor resistencia que las que se forman en tres dimensiones como en el caso del patrón giroide, por lo cual también tiene sentido que este patrón haya tenido los resultados más bajos [83], [84].

Al comparar los resultados con la resistencia del hueso (Cuadro [2]) se puede decir que los resultados obtenidos son aplicables y comparables con la resistencia del hueso esponjoso, ya que este presenta módulo elástico 100 - 3,000 MPa y el rango de los resultados obtenidos para este parámetro está entre 653 - 1,760 MPa. Sin embargo, estos no tendrían un buen desempeño en hueso cortical, pues necesita una resistencia mínima de 11,400 MPa en cuanto al módulo de Young y la resistencia máxima soportada. Para lograr una mayor resistencia se recomienda explorar otros tipos de materiales o refuerzos así como un andamio de vitrocerámica [33] o de policaprolactona/hidroxiapatita [15] los cuales han demostrado tener un buen desempeño en su resistencia a compresión con estructuras y tamaños de poros similares a las de este estudio.

9.3. Ensayos de degradación

A partir de este ensayo se pudo comprobar que la absorción de agua es evidente en todos los casos, pues aporta un aumento en el peso el cual es más evidente las primeras semanas y luego comienza a decrecer (Figura [50]). También se puede observar que la absorción es más estable para todas las densidades de relleno del patrón triangular, pues solo en la semana 1 y 9 de T1 se obtuvo un aumento de peso mayor al 5%. Los otros patrones de relleno muestran un aumento de peso mayor al 10% en algunos casos como lo fueron en las primeras semanas de G1, G2, H1 y H2, por lo cual se podría decir que la absorción de agua depende de la geometría y tamaño del poro lo cual puede estar relacionado con la interconectividad de los patrones, como en el caso del patrón giroide, con la la cantidad de aristas en dos dimensiones

o con la cantidad de material presente en cada caso, pues cada estructura presenta un peso distinto (Cuadro 6). El hecho de haber presentado una alta absorción de agua no está alejado de los resultados obtenidos en estudios similares, en donde además de demostrar una absorción de agua del PLA se muestra que ocurre un aumento en la absorción de agua al aumentar la temperatura de incubación 85.

En cuanto al cambio de peso seco se obtuvo que ninguna estructura tuvo un decaimiento menor al 2% (Figura 51) por lo cual se puede decir que la estabilidad y la degradación a largo plazo de andamios hechos de PLA no se ve afectada por la geometría y tamaño del poro. Estos resultados son comparables con otros estudios en donde se estudió la degradación de PLA con PCL con dimensiones de $2 \times 4 \times 2$ mm en donde se obtuvo que al incubar las muestras a 37 °C en PBS se tiene una pérdida de peso considerable a los 50 días y que este cambio no depende del tamaño del poro; en este estudio también se obtuvo una mayor degradación al aumentar la temperatura de incubación a 50 °C y 65 °C 86. Se esperaba obtener cambios de pesos más considerables tras compararlos con la literatura, sin embargo, puede que esto no se haya obtenido ya que la incubadora en la cual se colocaron las muestras muchas veces bajaba de temperatura y no estaba en un rango ideal para este estudio. En cuanto al pH, este valor sí es coherente al compararlo con estudios encontrados en la literatura 85, 86.

En cuanto a la degradación de los andamios en etanol al 70% y acetona al 99% se obtuvieron los mismos resultados que al sumergirlos en PBS, pues al sacarlos de dichas soluciones y pesarlos, se reflejó un aumento en peso dada la absorción de agua y al secarlos durante una semana no se observó pérdida de peso, lo cual refuerza la estabilidad del PLA (Figuras 53 y 54). En cuanto a la degradación en acetona se pudo observar residuos del material al fondo de los tubos, no obstante, esto no representó alguna pérdida en peso (Figura 55); y en el caso de las estructuras triangular y giroide con densidad de relleno del 50% se observó que las estructuras se debilitaban mecánicamente al sacarlas de esta solución pero al tenerlas en peso seco las estructuras recuperaban su rigidez (Figura 56), lo cual puede deberse a que este solvente induce la cristalización del PLA al penetrar en la fase amorfa del material, aumentando su flexibilidad y reduciendo su rigidez 87.

9.4. Ensayo de biocompatibilidad

En la Figura 57 se puede observar que en todas las concentraciones de los extractos a las 24 y 72 horas superaron la viabilidad del 70%, lo cual es positivo según la norma ISO 10993-5 debido a que porcentajes de viabilidad inferiores a este valor se consideran tóxicos 88. Esto se traduce en que los materiales utilizados para el estudio no son tóxicos para la línea celular LAN-1 y que pueden ser biocompatibles para su uso en propuestas de andamios celulares. También se puede observar una tendencia en que hubo una mayor viabilidad celular en los pozos que tenían los extractos de los materiales con respecto al control. Esto tiene sentido tras compararlo con otros estudios similares, en donde las células con extractos presentan una mayor viabilidad que el control al estudiar el poli(fumarato de propileno) (PPF) 88 y el polímero de alta densidad (HDPE) 47. La explicación radica en que estos materiales promueven una respuesta biológica adecuada en términos de proliferación, morfología, migración y unión celular, siendo candidatos de buenos materiales para el uso en

cultivos 3D o en ingeniería de tejidos.

En cuanto a la diferencia de tiempos que fueron expuestas las células se puede observar que a las 72 horas hay una menor viabilidad celular en general que a 24 horas (Figura 58), no obstante para ambos tiempos se tuvo una viabilidad celular mayor al 70%. Este resultado es coherente con lo encontrado en la literatura, pues la disminución de la viabilidad celular con el tiempo puede deberse a la muerte celular inducida por los polímeros 89.

- Es posible realizar andamios por medio de impresión 3D a partir de geometrías estándar de patrones de relleno de impresoras 3D y cambiar el tamaño de poro al cambiar la densidad de relleno.
- La geometría giroide no es una buena opción en ninguna de las densidades de relleno estudiadas (50 %, 75 % y 85 %) porque no presenta una porosidad ni tamaño de poro mínimo para esta aplicación. Al contrario, el patrón panal de abeja al 50 % de densidad de relleno y el patrón triangular en todas las densidades de relleno sí cumplen con los requerimientos de tamaño de poro, haciendo que sea más probable su uso en ingeniería de tejidos y al ser estructuras que presentan esquinas, es más probable que haya un crecimiento celular en estas estructuras.
- La resistencia a compresión varía según la geometría y tamaño del poro, siendo la geometría triangular la que presenta una mayor resistencia, seguida de la geometría panal de abeja y por último el patrón giroide. En todas las estructuras se obtuvo que la resistencia a compresión y la densidad de relleno son directamente proporcionales y todas son aptas para una aplicación en hueso esponjoso.
- Las pruebas de tracción no proveen información relevante en este estudio debido a limitantes con respecto a la maquinaria de medición.
- Se demostró que el PLA es estable a largo plazo (10 semanas) y que su degradación no se ve afectada según la geometría y tamaño del poro.
- En cuanto a los procesos de esterilización, se demostró que al esterilizar las muestras con autoclave y mediante el uso de etanol al 70 % no se degrada el material ni a las estructuras, por lo cual cualquier método se puede aplicar para su posterior uso en cultivos celulares.
- Se demostró que el PLA no produce muerte celular a 24 y 72 horas tras incubar este material indirectamente con la línea celular LAN1.

- De forma general, se recomienda más el uso del patrón triangular dado que cumple con una porosidad y tamaño de poro adecuado y presenta los mejores resultados en cuanto a resistencia a compresión.

- Para los ensayos mecánicos se recomienda utilizar una máquina de ensayos específica para polímeros para poder apegarse a las dimensiones de las probetas estandarizadas a nivel internacional y ampliar el estudio con ensayos de tracción.
- Se recomienda realizar el ensayo de degradación a una mayor temperatura y así poder tener una mayor pérdida de peso y obtener conclusiones más robustas acerca de la degradación por medio de envejecimiento acelerado. Esto también se puede ampliar al estudiar la degradación por medio de degradación enzimática.
- Para ampliar el estudio, se recomienda estudiar otro tipo de patrones y densidades de relleno, explorar otros biomateriales (como PEEK o PCL) o cambiar variables de la impresión como la altura de capa o temperatura de impresión.
- Evaluar la biocompatibilidad con células establecidas por estándares (i.e. línea celular L929 establecida por ISO 10993) o con células especializadas en el tejido de interés (e.g. osteoblastos, osteoclastos, osteocitos).
- Con los resultados obtenidos, si se desea evaluar qué patrón presenta una mayor adhesión celular, se recomienda utilizar únicamente los patrones triangulares o panal de abeja a una densidad de relleno del 50% dado que estas presentaron un mejor desempeño y tienen potencial para este estudio.

-
- [1] R. McClelland, R. Dennis, L. M. Reid, B. Palsson y J. M. Macdonald, "TISSUE ENGINEERING," *Introduction to Biomedical Engineering*, págs. 313-402, ene. de 2005. DOI: [10.1016/B978-0-12-238662-6.50009-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-238662-6.50009-4).
- [2] N. I. of Health (NIH), *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Recuperado el 19 de abril de 2023, S.A. dirección: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
- [3] L. Suamte, A. Tirkey, J. Barman y P. J. Babu, "Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications," *Smart Materials in Manufacturing*, vol. 1, pág. 100 011, ene. de 2023, ISSN: 2772-8102. DOI: [10.1016/J.SMMF.2022.100011](https://doi.org/10.1016/J.SMMF.2022.100011).
- [4] G. H. Yang, M. Kim y G. Kim, "Additive-manufactured polycaprolactone scaffold consisting of innovatively designed micro-sized spiral struts for hard tissue regeneration," *Biofabrication*, vol. 9, 1 mar. de 2017, Usan PCL, ISSN: 17585090. DOI: [10.1088/1758-5090/9/1/015005](https://doi.org/10.1088/1758-5090/9/1/015005).
- [5] A. Gregor, E. Filová, M. Novák et al., "Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer," *Journal of Biological Engineering*, vol. 11, 1 oct. de 2017, Usan PLA, ISSN: 17541611. DOI: [10.1186/s13036-017-0074-3](https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3).
- [6] X. Feng, L. Ma, H. Liang et al., "Osteointegration of 3D-printed fully porous polyetheretherketone scaffolds with different pore sizes," *ACS Omega*, vol. 5, págs. 26 655-26 666, 41 oct. de 2020, En este se hizo de todo y se probó en ratones con material PEEK, ISSN: 24701343. DOI: [10.1021/acsomega.0c03489](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03489).
- [7] H. Fesseha e Y. Fesseha, "Bone Grafting, Its Principle and Application: A Review," *Osteol Rheumatol Open J*, vol. 1, págs. 43-50, 1 2020. DOI: [10.17140/ORH0J-1-113](https://doi.org/10.17140/ORH0J-1-113).
- [8] A. Dussault, A. A. Pitaru, M. H. Weber, L. Haglund, D. H. Rosenzweig e I. Villemure, "Optimizing Design Parameters of PLA 3D-Printed Scaffolds for Bone Defect Repair," *Surgeries*, vol. 3, págs. 162-174, 3 jun. de 2022. DOI: [10.3390/surgeries3030018](https://doi.org/10.3390/surgeries3030018).

- [9] E. Schätzlein, C. Kicker, N. Söhling et al., “3D-Printed PLA-Bioglass Scaffolds with Controllable Calcium Release and MSC Adhesion for Bone Tissue Engineering,” *Polymers*, vol. 14, 12 jun. de 2022, ISSN: 20734360. DOI: [10.3390/polym14122389](https://doi.org/10.3390/polym14122389).
- [10] C. B. N. d. M. (U. MedlinePlus en español. [Internet]. Benjamin, *Osteotomía de la rodilla*, Actualizado 28 de junio 2021, S.A. dirección: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007499.htm>.
- [11] “Surgical treatment of multifragmentary segmental femur shaft fractures with orif and bone graft versus mipo: A prospective control-group study,” *Medicinski Glasnik*, vol. 17, págs. 334-344, 2 ago. de 2020, ISSN: 18402445. DOI: [10.17392/1150-20](https://doi.org/10.17392/1150-20).
- [12] I. Fernandez-Bances, M. Perez-Basterrechea, S. Perez-Lopez et al., “Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft,” *Cytotherapy*, vol. 15, págs. 571-577, 5 mayo de 2013, ISSN: 14653249. DOI: [10.1016/j.jcyt.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.004).
- [13] T. T. Roberts y A. J. Rosenbaum, “Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing,” *Organogenesis*, vol. 8, págs. 114-124, 4 oct. de 2012, ISSN: 15476278. DOI: [10.4161/org.23306](https://doi.org/10.4161/org.23306).
- [14] V. Pesce, D. Speciale, G. Sammarco, S. Patella, A. Spinarelli y V. Patella, “Surgical approach to bone healing in osteoporosis,” *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2009. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2781233/pdf/ClinicalCases-6-0131.pdf>.
- [15] J. Zang, L. Lu y M. J. Yaszemski, *Bone Disorders*. Elsevier Inc., 2017, págs. 83-118, ISBN: 9780128028032. DOI: [10.1016/B978-0-12-802792-9.00003-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802792-9.00003-3).
- [16] T. J. de Villiers y S. R. Goldstein, “Bone health 2022: an update,” *Climacteric*, vol. 25, págs. 1-3, 1 2022, ISSN: 14730804. DOI: [10.1080/13697137.2021.1965408](https://doi.org/10.1080/13697137.2021.1965408).
- [17] A. S. of Oncology, *Bone Cancer (Sarcoma of Bone): Statistics*, Recuperado el 29 de abril de 2023, 2023. dirección: <https://www.cancer.net/cancer-types/bone-cancer-sarcoma-bone/statistics>.
- [18] C. for Disease Control y P. CDC, *Facts About Falls*, Recuperado el 29 de abril de 2023, 2021. dirección: <https://www.cdc.gov/falls/facts.html#print>.
- [19] J. J. Chung, H. Im, S. H. Kim, J. W. Park e Y. Jung, “Toward Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering: 3D Printing Techniques in Regenerative Medicine,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, nov. de 2020, ISSN: 22964185. DOI: [10.3389/fbioe.2020.586406](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.586406).
- [20] M. A. A. Ansari, A. A. Golebiowska, M. Dash et al., “Engineering biomaterials to 3D-print scaffolds for bone regeneration: practical and theoretical consideration,” *Biomaterials Science*, vol. 10, págs. 2789-2816, 11 abr. de 2022, ISSN: 20474849. DOI: [10.1039/d2bm00035k](https://doi.org/10.1039/d2bm00035k).
- [21] B. Sosa, *Digitalización e impresión en 3D de piezas arqueológicas: el nuevo proyecto del CIAA*, Recuperado el 29 de abril de 2023, 2022. dirección: <https://noticias.uvg.edu.gt/impresion3d-de-piezas-arqueologicas/>.
- [22] S. Kanwar y S. Vijayavenkataraman, “Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review,” *Bioprinting*, vol. 24, dic. de 2021, ISSN: 24058866. DOI: [10.1016/j.bprint.2021.e00167](https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00167).

- [23] E. Provaggi, C. Capelli, B. Rahmani, G. Burriesci y D. M. Kalaskar, “3D printing assisted finite element analysis for optimising the manufacturing parameters of a lumbar fusion cage,” *Materials and Design*, vol. 163, feb. de 2019, ISSN: 18734197. DOI: [10.1016/j.matdes.2018.107540](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.107540).
- [24] D. R. Fonseca, R. Sobreiro-Almeida, P. C. Sol y N. M. Neves, “Development of non-orthogonal 3D-printed scaffolds to enhance their osteogenic performance,” *Biomaterials Science*, vol. 6, págs. 1569-1579, 6 jun. de 2018, ISSN: 20474849. DOI: [10.1039/c8bm00073e](https://doi.org/10.1039/c8bm00073e).
- [25] F. P. Melchels, A. M. Barradas, C. A. V. Blitterswijk, J. D. Boer, J. Feijen y D. W. Grijpma, “Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, págs. 4208-4217, 11 2010, ISSN: 17427061. DOI: [10.1016/j.actbio.2010.06.012](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.012).
- [26] R. Baptista y M. Guedes, “Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 118, ene. de 2021, ISSN: 18730191. DOI: [10.1016/j.msec.2020.111528](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111528).
- [27] M. Shirzad, A. Zolfagharian, A. Matbouei y M. Bodaghi, “Design, evaluation, and optimization of 3D printed truss scaffolds for bone tissue engineering,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 120, ago. de 2021, ISSN: 18780180. DOI: [10.1016/j.jmbbm.2021.104594](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104594).
- [28] G. Tortora y B. Derrickson, “Introduction to the Human Body,” 2015.
- [29] J. Waschke, M. Koch, S. Kürten, G. Schulze-Tanzil y B. Spittau, *Sobotta. Texto de anatomía*. Elsevier Health Sciences, 2018.
- [30] L. M. Biga, S. Dawson, A. Harwell et al., *Anatomy Physiology*. Pressbooks, 2019.
- [31] J. P. Harry Hoyen Simon Lambert, *Extraarticular, multifragmentary fracture Definition*, Recuperado el 06 de noviembre de 2023, S.A. dirección: <https://surgeryreference.aofoundation.org/orthopedic-trauma/adult-trauma/distal-humerus/extraarticular-multifragmentary/definition>.
- [32] T. Niikura, M. Miwa, S. Y. Lee et al., “Technique to prepare the bed for autologous bone grafting in nonunion surgery,” *Orthopedics*, vol. 35, n.º 6, págs. 491-495, 2012.
- [33] S. I. Roohani-Esfahani, P. Newman y H. Zreiqat, “Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects,” *Scientific Reports*, vol. 6, ene. de 2016, ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/srep19468](https://doi.org/10.1038/srep19468).
- [34] E. F. Morgan, G. U. Unnikrisnan y A. I. Hussein, “Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 20, págs. 119-143, jun. de 2018, ISSN: 15454274. DOI: [10.1146/annurev-bioeng-062117-121139](https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121139).
- [35] N. Reina y J. Laffosse, “Biomecánica del hueso: aplicación al tratamiento y a la consolidación de las fracturas,” *EMC - Aparato Locomotor*, vol. 47, págs. 1-17, 3 sep. de 2014, ISSN: 1286935X. DOI: [10.1016/s1286-935x\(14\)68513-0](https://doi.org/10.1016/s1286-935x(14)68513-0).
- [36] C. M. Murphy, F. J. O’Brien, D. G. Little y A. Schindeler, “Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad,” *European Cells and Materials*, vol. 26, págs. 120-132, sep. de 2013, ISSN: 14732262. DOI: [10.22203/eCM.v026a09](https://doi.org/10.22203/eCM.v026a09).

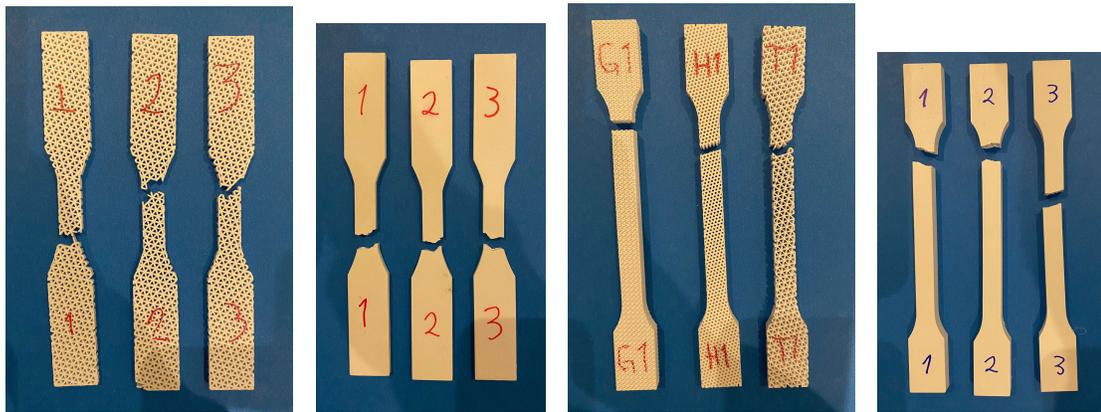
- [37] P. Dec, A. Modrzejewski y A. Pawlik, "Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, 1 ene. de 2023, ISSN: 14220067. DOI: [10.3390/ijms24010529](https://doi.org/10.3390/ijms24010529).
- [38] A. Eltom, G. Zhong y A. Muhammad, "Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review," *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2019, 2019, ISSN: 16878442. DOI: [10.1155/2019/3429527](https://doi.org/10.1155/2019/3429527).
- [39] O. A. Chanes-Cuevas, A. Perez-Soria, I. Cruz-Maya, V. Guarino y M. A. Alvarez-Perez, "Macro-, micro- and mesoporous materials for tissue engineering applications," *AIMS Materials Science*, vol. 5, págs. 1124-1140, 6 2018, ISSN: 23720468. DOI: [10.3934/matersci.2018.6.1124](https://doi.org/10.3934/matersci.2018.6.1124).
- [40] M. Kohan, S. Lancoš, M. Schnitzer, J. Živčák y R. Hudák, "Analysis of PLA/PHB Biopolymer Material with Admixture of Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate for Clinical Use," *Polymers*, vol. 14, 24 dic. de 2022, ISSN: 20734360. DOI: [10.3390/polym14245357](https://doi.org/10.3390/polym14245357).
- [41] G. Gautam, S. Kumar y K. Kumar, "Processing of biomaterials for bone tissue engineering: State of the art," *Materials today: proceedings*, vol. 50, págs. 2206-2217, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/>.
- [42] F. N. Habib, M. Nikzad, S. H. Masood y A. B. M. Saifullah, "Design and development of scaffolds for tissue engineering using three-dimensional printing for bio-based applications," *3D Printing and Additive Manufacturing*, vol. 3, págs. 119-127, 2 jun. de 2016, ISSN: 23297670. DOI: [10.1089/3dp.2015.0014](https://doi.org/10.1089/3dp.2015.0014).
- [43] C. Ning, *Biomaterials for bone tissue engineering*. Springer London, ene. de 2016, págs. 35-57, ISBN: 9781848826649. DOI: [10.1007/978-1-84882-664-9_4](https://doi.org/10.1007/978-1-84882-664-9_4).
- [44] L. Lin, A. Tong, H. Zhang, Q. Hu y M. Fang, "LNBI 4689 - The Mechanical Properties of Bone Tissue Engineering Scaffold Fabricating Via Selective Laser Sintering," *LNBI*, vol. 4689, págs. 146-152, 2007.
- [45] A. Haleem, M. Javaid, R. H. Khan y R. Suman, "3D printing applications in bone tissue engineering," *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, vol. 11, S118-S124, feb. de 2020, ISSN: 22133445. DOI: [10.1016/j.jcot.2019.12.002](https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.12.002).
- [46] H. Qu, H. Fu, Z. Han e Y. Sun, "Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review," *RSC Advances*, vol. 9, págs. 26 252-26 262, 45 2019, ISSN: 20462069. DOI: [10.1039/c9ra05214c](https://doi.org/10.1039/c9ra05214c).
- [47] M. O. Wang, J. M. Etheridge, J. A. Thompson, C. E. Vorwald, D. Dean y J. P. Fisher, "Evaluation of the in vitro cytotoxicity of cross-linked biomaterials," *Biomacromolecules*, vol. 14, págs. 1321-1329, 5 mayo de 2013, ISSN: 15264602. DOI: [10.1021/bm301962f](https://doi.org/10.1021/bm301962f).
- [48] A. E. Eldeeb, S. Salah y N. A. Elkasabgy, "Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review," *AAPS PharmSciTech*, vol. 23, 7 oct. de 2022, ISSN: 15309932. DOI: [10.1208/s12249-022-02419-1](https://doi.org/10.1208/s12249-022-02419-1).
- [49] Biopdi, *Compression Testing: Exploring Methods, Applications, and Benefits*, Recuperado el 29 de noviembre de 2023, S.A. dirección: <https://biopdi.com/compression-testing/>.
- [50] Zwickroell, *Ensayo de compresión y máquinas de ensayos de compresión*, Recuperado el 29 de noviembre de 2023, S.A. dirección: <https://www.zwickroell.com/es/sectores/ensayo-de-materiales/ensayo-de-compresion/>.

- [51] Biopdi, *Tensile testing – complete guide to testing metals, polymers and composite materials*. Recuperado el 29 de noviembre de 2023, S.A. dirección: <https://biopdi.com/tensile-testing/>.
- [52] B. Aloyaydi, S. Sivasankaran y A. Mustafa, “Investigation of infill-patterns on mechanical response of 3D printed poly-lactic-acid,” *Polymer Testing*, vol. 87, jul. de 2020, ISSN: 01429418. DOI: [10.1016/j.polymertesting.2020.106557](https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106557).
- [53] P. Yadav, A. Sahai y R. S. Sharma, “Strength and Surface Characteristics of FDM-Based 3D Printed PLA Parts for Multiple Infill Design Patterns,” *Journal of The Institution of Engineers (India): Series C*, vol. 102, págs. 197-207, 1 feb. de 2021, ISSN: 22500553. DOI: [10.1007/s40032-020-00625-z](https://doi.org/10.1007/s40032-020-00625-z).
- [54] Q. Ma, M. R. Rejab, A. P. Kumar, H. Fu, N. M. Kumar y J. Tang, “Effect of infill pattern, density and material type of 3D printed cubic structure under quasi-static loading,” *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science*, vol. 235, págs. 4254-4272, 19 oct. de 2021, ISSN: 20412983. DOI: [10.1177/0954406220971667](https://doi.org/10.1177/0954406220971667).
- [55] M. Q. Tanveer, A. Haleem y M. Suhaib, “Effect of variable infill density on mechanical behaviour of 3-D printed PLA specimen: an experimental investigation,” *SN Applied Sciences*, vol. 1, 12 dic. de 2019, ISSN: 25233971. DOI: [10.1007/s42452-019-1744-1](https://doi.org/10.1007/s42452-019-1744-1).
- [56] A. Rodríguez-Panes, J. Claver y A. M. Camacho, “The influence of manufacturing parameters on the mechanical behaviour of PLA and ABS pieces manufactured by FDM: A comparative analysis,” *Materials*, vol. 11, 8 ago. de 2018, ISSN: 19961944. DOI: [10.3390/ma11081333](https://doi.org/10.3390/ma11081333).
- [57] M. M. Hanon, Y. Alshammas y L. Zsidai, “Effect of print orientation and bronze existence on tribological and mechanical properties of 3D-printed bronze/PLA composite,” *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 108, págs. 553-570, 1-2 mayo de 2020, ISSN: 14333015. DOI: [10.1007/s00170-020-05391-x](https://doi.org/10.1007/s00170-020-05391-x).
- [58] P. Feng, J. Jia, M. Liu, S. Peng, Z. Zhao y C. Shuai, “Degradation mechanisms and acceleration strategies of poly (lactic acid) scaffold for bone regeneration,” *Materials and Design*, vol. 210, nov. de 2021, ISSN: 18734197. DOI: [10.1016/j.matdes.2021.110066](https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110066).
- [59] D. da Silva, M. Kaduri, M. Poley et al., “Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 340, págs. 9-14, mayo de 2018, ISSN: 13858947. DOI: [10.1016/j.cej.2018.01.010](https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.010).
- [60] E. Daskalakis, M. H. Hassan, A. M. Omar et al., “Accelerated Degradation of Polycaprolactone Composite Scaffolds for Large Bone Defects,” *Polymers*, vol. 15, 3 feb. de 2023, ISSN: 20734360. DOI: [10.3390/polym15030670](https://doi.org/10.3390/polym15030670).
- [61] I. O. of Standarization, “Biological evaluation of medical devices — Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices,” 2010.
- [62] W. LI, J. ZHOU e Y. XU, “Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices,” *Biomedical Reports*, vol. 3, págs. 617-620, 5 sep. de 2015, ISSN: 2049-9434. DOI: [10.3892/br.2015.481](https://doi.org/10.3892/br.2015.481).

- [63] F. Burkhardt, B. C. Spies, C. Wesemann et al., “Cytotoxicity of polymers intended for the extrusion-based additive manufacturing of surgical guides,” *Scientific Reports*, vol. 12, 1 dic. de 2022, ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/s41598-022-11426-y](https://doi.org/10.1038/s41598-022-11426-y).
- [64] K. Liu, W. Li, S. Chen et al., “The design, fabrication and evaluation of 3D printed gHNTs/gMgO whiskers/PLLA composite scaffold with honeycomb microstructure for bone tissue engineering,” *Composites Part B: Engineering*, vol. 192, jul. de 2020, ISSN: 13598368. DOI: [10.1016/j.compositesb.2020.108001](https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108001).
- [65] I. O. for Standardization (ISO), “Plastics - Determination of tensile properties,” 2012. dirección: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/56046/c5c3ec20cc0741289bf6def861e0a40b/ISO-527-2-2012.pdf>.
- [66] X. Pimentel, “Análisis de resistencia mecánica y térmica para piezas fabricadas en PLA con impresión 3D,” 2019. dirección: https://repositorio.uvg.edu.gt/static/flowpaper/template.html?path=/bitstream/handle/123456789/3432/pim13316_trabajo_de_graduacion.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- [67] H. K. Dave, S. R. Rajpurohit, N. H. Patadiya et al., “COMPRESSIVE STRENGTH OF PLA BASED SCAFFOLDS: EFFECT OF LAYER HEIGHT, INFILL DENSITY AND PRINT SPEED,” *International Journal of Modern Manufacturing Technologies*, vol. XI, págs. 2067-3604, 1 2019.
- [68] Z. Yu, Y. Gao, J. Jiang et al., “Study on Effects of FDM 3D Printing Parameters on Mechanical Properties of Polylactic Acid,” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 688, 3 dic. de 2019, ISSN: 1757899X. DOI: [10.1088/1757-899X/688/3/033026](https://doi.org/10.1088/1757-899X/688/3/033026).
- [69] I. O. for Standardization (ISO), *ISO 10993-13:2010 Biological evaluation of medical devices Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices*, Recuperado el 19 de abril de 2023, S.A. dirección: <https://www.iso.org/standard/44050.html>.
- [70] T. F. Scientific, *Useful Numbers for Cell Culture*, Recuperado el 29 de noviembre de 2023, S.A. dirección: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>.
- [71] D. Ali y S. Sen, “Finite element analysis of mechanical behavior, permeability and fluid induced wall shear stress of high porosity scaffolds with gyroid and lattice-based architectures,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 75, págs. 262-270, nov. de 2017, ISSN: 18780180. DOI: [10.1016/j.jmbbm.2017.07.035](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.07.035).
- [72] H. Zhao, L. Li, S. Ding, C. Liu y J. Ai, “Effect of porous structure and pore size on mechanical strength of 3D-printed comby scaffolds,” *Materials Letters*, vol. 223, págs. 21-24, jul. de 2018, ISSN: 18734979. DOI: [10.1016/j.matlet.2018.03.205](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.03.205).
- [73] K. Hayashi, M. L. Munar y K. Ishikawa, “Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 111, jun. de 2020, ISSN: 18730191. DOI: [10.1016/j.msec.2020.110848](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110848).
- [74] K. F. Leong, C. K. Chua, N. Sudarmadji y W. Y. Yeong, “Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 1, págs. 140-152, 2 abr. de 2008, ISSN: 17516161. DOI: [10.1016/j.jmbbm.2007.11.002](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.11.002).

- [75] X. Zhou, G. Zhou, R. Junka et al., “Fabrication of polylactic acid (PLA)-based porous scaffold through the combination of traditional bio-fabrication and 3D printing technology for bone regeneration,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 197, ene. de 2021, ISSN: 18734367. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2020.111420](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111420).
- [76] Q. L. Loh y C. Choong, “Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size,” *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, vol. 19, págs. 485-502, 6 dic. de 2013, ISSN: 19373368. DOI: [10.1089/ten.teb.2012.0437](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437).
- [77] K. Paraskevoudis, P. Karayannis y E. P. Koumoulos, “Real-time 3d printing remote defect detection (Stringing) with computer vision and artificial intelligence,” *Processes*, vol. 8, págs. 1-15, 11 nov. de 2020, ISSN: 22279717. DOI: [10.3390/pr8111464](https://doi.org/10.3390/pr8111464).
- [78] A. Pandzic, D. Hodzic y A. Milovanovic, “Effect of infill type and density on tensile properties of pla material for fdm process,” *Annals of DAAAM and Proceedings of the International DAAAM Symposium*, vol. 30, págs. 545-554, 1 2019, ISSN: 17269679. DOI: [10.2507/30th.daaam.proceedings.074](https://doi.org/10.2507/30th.daaam.proceedings.074).
- [79] A. Milovanovic, A. Sedmak, A. Grbovic et al., “Comparative analysis of printing parameters effect on mechanical properties of natural PLA and advanced PLA-X material,” *Procedia Structural Integrity*, vol. 28, págs. 1963-1968, 2020, ISSN: 24523216. DOI: [10.1016/j.prostr.2020.11.019](https://doi.org/10.1016/j.prostr.2020.11.019).
- [80] J. Dobos, M. M. Hanon e I. Oldal, “Effect of infill density and pattern on the specific load capacity of FDM 3D-printed PLA multi-layer sandwich,” *Journal of Polymer Engineering*, vol. 42, págs. 118-128, 2 feb. de 2022, ISSN: 03346447. DOI: [10.1515/polyeng-2021-0223](https://doi.org/10.1515/polyeng-2021-0223).
- [81] “Infill Strategy in 3D Printed PLA Carbon Composites: Effect on Tensile Performance,” *Polymers*, vol. 14, 19 oct. de 2022, ISSN: 20734360. DOI: [10.3390/polym14194221](https://doi.org/10.3390/polym14194221).
- [82] J. León-Becerra, O. A. González-Estrada y J. Quiroga, “Effect of Relative Density in In-Plane Mechanical Properties of Common 3D-Printed Polylactic Acid Lattice Structures,” *ACS Omega*, vol. 6, págs. 29830-29838, 44 nov. de 2021, ISSN: 24701343. DOI: [10.1021/acsomega.1c04295](https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04295).
- [83] B. Pernet, J. K. Nagel y H. Zhang, “Compressive Strength Assessment of 3D Printing Infill Patterns,” *Procedia CIRP*, vol. 105, págs. 682-687, 2022, ISSN: 22128271. DOI: [10.1016/j.procir.2022.02.114](https://doi.org/10.1016/j.procir.2022.02.114).
- [84] S. I. Roohani-Esfahani, P. Newman y H. Zreiqat, “Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects,” *Scientific Reports*, vol. 6, ene. de 2016, ISSN: 20452322. DOI: [10.1038/srep19468](https://doi.org/10.1038/srep19468).
- [85] T. Aouat, M. Kaci, J. M. Lopez-Cuesta y E. Devaux, “Investigation on the Durability of PLA Bionanocomposite Fibers Under Hygrothermal Conditions,” *Frontiers in Materials*, vol. 6, dic. de 2019, ISSN: 22968016. DOI: [10.3389/fmats.2019.00323](https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00323).
- [86] R. M. Felfel, L. Poczka, M. Gimeno-Fabra et al., “In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 11, 1 feb. de 2016, ISSN: 1748605X. DOI: [10.1088/1748-6041/11/1/015011](https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/015011).

- [87] N. Naga, Y. Yoshida, M. Inui, K. Noguchi y S. Murase, “Crystallization of amorphous poly(lactic acid) induced by organic solvents,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 119, págs. 2058-2064, 4 feb. de 2011, ISSN: 00218995. DOI: [10.1002/app.32890](https://doi.org/10.1002/app.32890).
- [88] M. Chraniuk, M. Panasiuk, L. Hovhannisyan et al., “The Preliminary Assessment of New Biomaterials Necessitates a Comparison of Direct and Indirect Cytotoxicity Methodological Approaches,” *Polymers*, vol. 14, 21 nov. de 2022, ISSN: 20734360. DOI: [10.3390/polym14214522](https://doi.org/10.3390/polym14214522).
- [89] A. Mellati, M. V. Kiamahalleh, S. Dai, J. Bi, B. Jin y H. Zhang, “Influence of polymer molecular weight on the in vitro cytotoxicity of poly (N-isopropylacrylamide),” *Materials Science and Engineering C*, vol. 59, págs. 509-513, feb. de 2016, ISSN: 18730191. DOI: [10.1016/j.msec.2015.10.043](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.043).



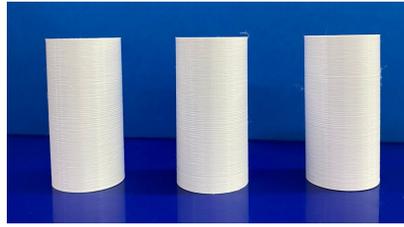
(a) Probetas de tracción con las dimensiones utilizadas por Pimentel en 2019 sin Perímetro

(b) Probetas de tracción con las dimensiones utilizadas por Pimentel en 2019 con Perímetro

(c) Probetas de tracción con las dimensiones establecidas por la norma ISO 527 con el doble del grosor y sin Perímetro

(d) Probetas de tracción con las dimensiones establecidas por la norma ISO 527 con el doble del grosor y con Perímetro

Figura 59: Probetas utilizadas en el ensayo de tracción luego de hacerles la prueba

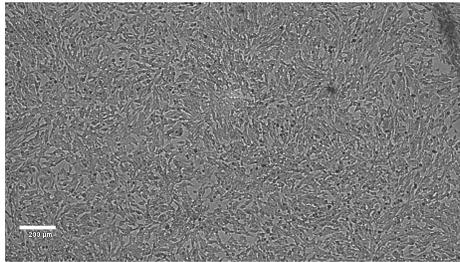


(a) Probetas de compresión antes de realizar la respectiva prueba

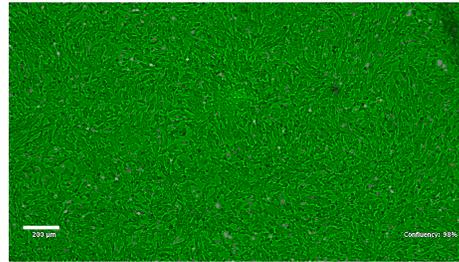


(b) Probetas de compresión después de realizar la respectiva prueba

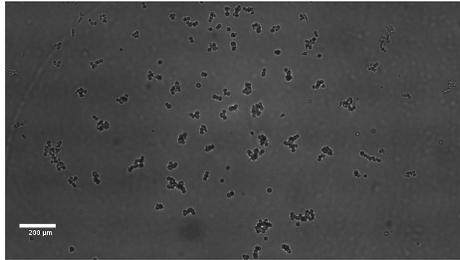
Figura 60: Probetas de compresión antes y después de realizar la respectiva prueba



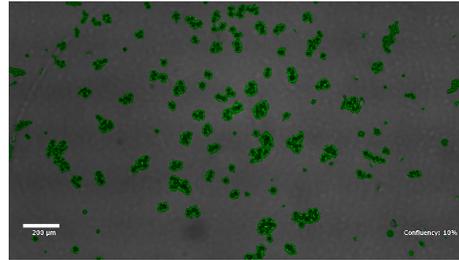
(a) Células antes de realizar el sub cultivo en las placas de 96 pozos



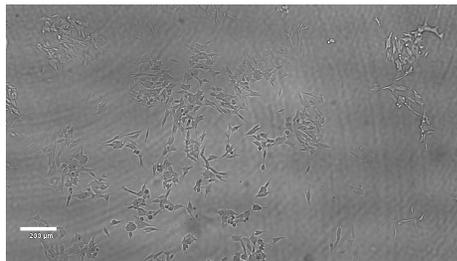
(b) Confluencia antes de realizar el sub cultivo en las placas de 96 pozos



(c) Células recién sembradas en la placa de 96 pozos



(d) Confluencia de las células recién sembradas en la placa de 96 pozos



(e) Células en placa de 96 pozos luego de incubarlas 24 h

Figura 61: Células LAN 1 antes y después de sembrarlas en la placa de 96 pozos con sus respectivas confluencias