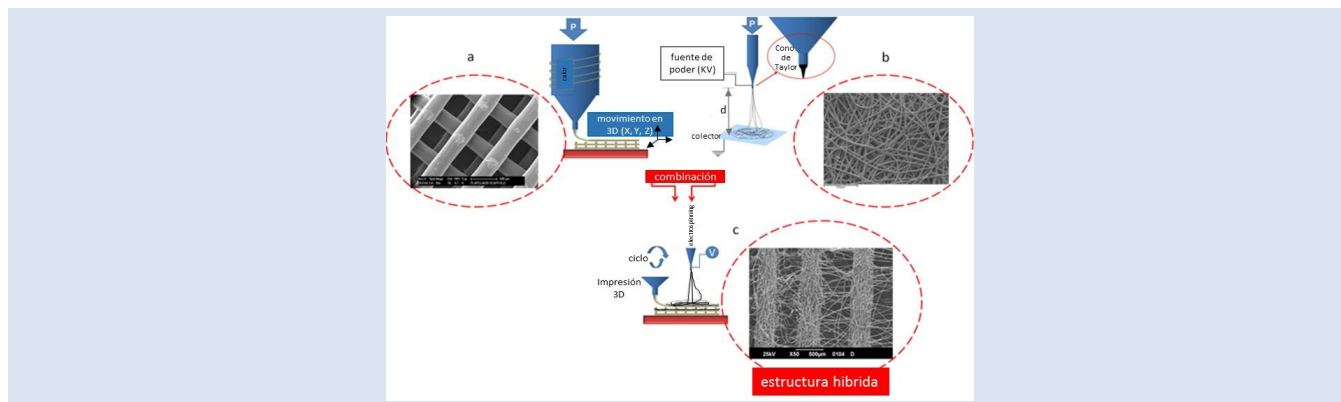


TÉCNICAS PARA LA FABRICACIÓN DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS CON APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Marcos A. Sabino^{1*}, Marielys Loaiza^{1,2}, Janaína Dernowsek³, Rodrigo Rezende³, Jorge V. L. Da Silva³

1: Grupo B5IDA, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela. 2: Dpto. de Química, Complejo Académico El Sabino, Univ. Nac. Exp. Francisco de Miranda, Falcón, Venezuela. 3: Divisão de Tecnologias Tridimensionais, Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), Campinas, SP, Brasil

*Email: msabino@usb.ve



RESUMEN

La fabricación por manufactura aditiva (MA) ha sido investigada y desarrollada desde los últimos 20 años. Esto ha conllevado también al avance de otras áreas como la ingeniería de tejidos. La novedad y la ventaja de estas técnicas recaen en el hecho de que en lugar de fundamentar el proceso en la eliminación de material, ésta crea piezas tridimensionales capa por capa y con mucha precisión directamente de modelos CAD (Computer Aided Design), con altas complejidades geométricas y usando materiales que no podrían ser producidos a través de procesos de fabricación tradicionales. Durante estas últimas dos décadas, se ha hecho un progreso significativo en el desarrollo y comercialización de nuevos e innovadores procesos de MA y prototipado rápido (PR), así como de numerosas aplicaciones con muchos avances en la industria aeroespacial, automotriz, biomédica, biomecánica, farmacológica y otros campos. Este artículo revisa los principales procesos y aplicaciones de esta actual y novedosa tecnología, y va acompañado con resultados de algunos proyectos de investigación donde han participado los autores. También presenta cuales son los desafíos y necesidades futuras en estas tecnologías, y a su vez considera otras metodologías y tecnologías que compiten a la par de la MA y PR, como lo son el electrohilado o electrospinning, desarrollo de hidrogeles y la impresión de órganos o bioprinting.

Palabras Claves: manufactura aditiva, prototipado rápido, electrohilado, andamios, polímeros biodegradables, impresión de órganos, ingeniería de tejidos.

TECHNIQUES FOR MANUFACTURING POLYMER SCAFFOLDS WITH POTENTIAL APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING

ABSTRACT

Build object using additive manufacturing (AM) has been researched and developed over the past 20 years. This has also led to the advancement of others areas as well as tissue engineering. The novelty and advantage of these techniques lie in the fact that instead of basing the process in material removal, it creates three-dimensional objects layer by layers and very accurately directly from CAD (Computer Aided Design) models, with high geometric and material complexities that could not be produce through traditional manufacturing processes. In the report literature over the past two decades, it has made significant progress in the development and commercialization of new and innovative processes of AM and rapid prototyping (RP), as well as numerous applications have now created many advances in aerospace, automotive, biomedical, biomechanics, pharmacology and other fields. This article reviews the main processes and applications of this current and new technology, and is accompanied with results of some research projects where the authors have participated. It also presents what challenges and future needs in these technologies, and in turn considered other methodologies and technologies that compete with the AM and RP, such as electrospinning, hydrogels and organ printing or bioprinting.

Keywords: additive manufacturing, rapid prototyping, electrospinning, scaffold, biodegradable polymers, bioprinting, tissue engineering.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, lo que se podría llamar la edad actual de la medicina, la ingeniería de tejido (también reconocida por algunos autores como medicina regenerativa) ha ido tomando una fuerza y una viabilidad en cuanto a los estudios de investigación multidisciplinarios [1,2,3], muchos de los cuales ya ha mostrado resultados probados, centrados en la regeneración y recuperación de tejidos, y que han estado más enmarcados en los últimos tiempos en cuanto a tejidos: óseo [4], piel [5], cartílago [6], etc. La creación de tales estructuras, denominadas andamios, deben cumplir ciertos requisitos, es decir deben ser tridimensionales (3D), porosas y con poros interconectados, biocompatibles y biodegradables (preferiblemente) [1-3, 7]. La ingeniería de tejidos también ha ido dando paso a un área también novedosa que es la impresión de órganos [8], aunque esta es un área dentro de la cual hay muchos aspectos del punto de vista metabólico y fisiológico. Esto hace que a través de las tecnologías actuales se pudiesen reproducir órganos (o parte de órganos) que cumplan funciones vitales y puedan reproducir las mismas tal y como lo hace el organismo humano.

En las últimas décadas, los profesionales dedicados a la ingeniería de tejidos, donde resaltan esfuerzos de licenciados químicos, ingenieros de materiales, físicos, biólogos, médicos, odontólogos, farmacéuticos, ingenieros químicos, entre otros, han conceptualizado su trabajo, estableciendo criterios y apuntando a mover una plataforma de ingeniería de tejido holística, paso a paso en aplicaciones clínicas, que incluyen el diseño y fabricación de estos andamios (*scaffolds*), el aislamiento y caracterización celular, proliferación celular, diferenciación celular, uso de bioreactores, etc. [9]

Pero ¿Qué son estos andamios o estructuras 3D?. Los andamios son soportes o estructuras tridimensionales temporales, en los que las células pueden crecer y formar tejidos, por lo que al momento de diseñarlos y fabricarlos, se deben tener en consideración aspectos que van desde la técnica o método a utilizar para su fabricación, como el control de la topografía y rugosidad de la superficie, porosidad, forma y tamaño de poro, lo cual es importante para aumentar la migración de las células en su interior y en la superficie de los mismos [1-3, 7, 10]. La obtención de andamios permite entonces

que estos *template* tridimensionales actúen como una estructura soporte que debe tener características y propiedades que le permitan biomimetizar [11] el tejido que se pretende regenerar sobre sus bases, es decir que sirva como una matriz extracelular (MEC) [12] que permita que se dé la adhesión y su posterior proliferación y diferenciación celular. Hasta la verificación de la formación de tejido neonato sobre éste y que luego conlleve a la formación de un tejido nuevo con sus propias características biológicas, mecánicas, etc.

Para la fabricación de andamios, se deben considerar varios aspectos que son fundamentales [7,10]: (1) estos deben poseer geometrías que permitan direccionar la regeneración tisular o la generación de nuevo tejido a la par de que ocurre la formación de ese nuevo tejido, así como de los sistemas de vascularización y aquellos que permiten el intercambio de fluidos y nutrientes biológicos; también para el descarte de los desechos que se generen; y es por ello que deben ser estructuras porosas y que exista interconexión entre ellos. (2) los andamios, tienen también que proporcionar temporalmente unas propiedades mecánicas adecuadas a las funciones para las cuales fue diseñado y fabricado; esto recae en el hecho de poder seleccionar los biomateriales adecuados para poder garantizar estas propiedades. (3) La degradación es un aspecto fundamental, pues lo que se espera es que a medida que el nuevo tejido se va formando, el andamio vaya permitiendo su fijación en esa estructura 3D y que los productos de degradación que vayan generando no presenten carácter toxico, sino que siga permitiendo a la estructura que sea biocompatible en el tiempo. Es por ello que generalmente los andamios son fabricados a partir de polímeros sintéticos que presenten biocompatibilidad y biodegradabilidad, se pueden usar también biopolímeros (como por ejemplo alginato, quitosano, colágeno, etc.) [13,14], inclusive proteínas [15], así como también hacer materiales compuestos [16] (usando materiales inorgánicos como las biocerámicas como lo son la hidroxiapatita, fosfato de calcio, etc.). Y finalmente otro aspecto a tomar en consideración son las características superficiales que deben presentar esos andamios, lo cual evidentemente está asociado a los procesos de biocompatibilidad, y a las posibles modificaciones superficiales que se puedan hacer a estos andamios (como por ejemplo la inserción química de péptidos como RGDS, RGDV, PDSGR,

VTXG, etc. [10, 17,18]) o a tratamientos físicos tipo plasma [19] entre otros.

Este artículo de revisión está enfocado en presentar información general sobre los procedimientos o métodos de fabricación de andamios usados en ingeniería de tejidos, y cuáles son las perspectivas futuras en esta interesante y multidisciplinaria área. El artículo va acompañado de algunos resultados experimentales que son producto de la investigación de los autores.

Desde las ultimas 3 décadas, muchos grupos de investigación [1-3, 7, 10-14, 20, 21] han venido desarrollando técnicas novedosas para dar forma a biomateriales (bien sean de naturaleza polimérica, cerámica, metálica o material compuesto) en estructuras 3D complejas que exhiban unas propiedades esperadas para determinadas aplicaciones en la ingeniería de tejidos o medicina regenerativa. Y han sido los materiales poliméricos los que han venido aportando más avances en este particular, dada su versatilidad química [22], propiedades reológicas [23], mecánicas o elástico-plásticas [24], y de posibilidad de añadir aditivos químicos [25] o inclusive fármacos [26] o biomoléculas [27]. También está la formulación de materiales compuestos [28], que son necesarios para garantizar un mejor desempeño físico-químico, mecánico, farmacológico y quirúrgico de estos andamios. Teniendo siempre como clave que serán aspectos relacionados con el diseño [29], selección de material, biocompatibilidad, biodegradabilidad y métodos de fabricación, lo que le dará a los pacientes y a los médicos la seguridad que posteriormente le conferirá el éxito a los mismos.

Para estas consideraciones de diseño y de propiedades finales de los andamios se deben tener en cuenta la relación estructura química-propiedades de estos materiales poliméricos (sean de origen natural o sintético, mezclas de ambos, o de materiales compuestos). Por ejemplo es bien sabido que materiales poliméricos que exhiben una alta cristalinidad muestran un incremento en sus propiedades mecánicas, pero son más difícilmente degradables [30]. Técnicas de procesamiento que puedan, por ejemplo, inducir degradación termo-oxidativa, induzcan mejoras en la capacidad degradativa de estas estructuras, pero a expensas de reducir su resistencia, y el tiempo de vida del andamio [31]. Otra atención de suma importancia que se debe tener, es que la inclusión de ciertas

biomoléculas en estos andamios, bien sea por alguna modificación que haya sido implementada en su superficie, o colocada en su formulación, algún factor de señalización celular, fármaco, aditivo, etc, no pueden ser inactivadas durante el proceso de fabricación de estos andamios [17, 26,27], por lo que a veces no es tan sencillo decidir cuál es la tecnología o metodología a escoger para su obtención. Es allí también, donde el carácter multidisciplinario de la ingeniería de tejidos se perfila, pues es para estos casos donde la discusión entre investigadores de diferentes áreas (biología, física, química, ingeniería, medicina, farmacología, etc.) se hace realmente necesaria para poder garantizar su fabricación y buen desempeño [32].

Entonces, las técnicas de fabricación para ingeniería de tejidos dependen en muchos casos del polímero en cuestión, de sus características superficiales y de la función potencial que debe tener el andamio [13,14,17]. La mayoría de las técnicas envuelven tratamientos térmicos y de presión, así como el uso de solventes (orgánicos) que deben ser debidamente eliminados [33]. Los costos también deben ser considerados. Muchas de las propuestas actuales consideran que durante el proceso de fabricación de los andamios sea posible la incorporación de líneas celulares, lo cual a nuestro modo de ver está todavía en etapa de discusión y de validación, dado que justamente estas técnicas de manufactura que involucran aplicación de calor, o de presión, o del uso de solventes o reactivos químicos, siempre son unas limitantes al momento de pensar en que deben estar presentes células al mismo momento en que estos andamios con fabricados.

Mientras tanto, cada técnica presenta sus ventajas y desventajas, pero cada una de ellas debe ser considerada como la técnica más apropiada para reunir todos los requerimientos que son necesarios para la recuperación de un tejido en particular. A continuación se presentan los aspectos más importantes de las técnicas más usadas y reportadas, que dieron sus primeros aportes en la generación de estos andamios, así como las que actualmente se están usando y aun en etapa de desarrollo, dado que cada día aparecen nuevas y más novedosas opciones para fabricar soportes para esta interesante área como lo es la ingeniería de tejidos.

1.1 Hilado y tejido de fibras

El tejido de fibras es una de las técnicas, junto con

la de lixiviación de partículas y evaporación de solventes, que se usó inicialmente para la obtención de membranas y andamios tridimensionales, teniendo mucho alcance dada la sencillez de las mismas y sus bajos costos. Matrices 3D porosas pueden ser construidas por la unión de fibras de polímeros, generando una especie de nodos en los puntos de unión entre las fibras, bien sea por la utilización de un polímero secundario, o usando una fusión controlada entre estos, aplicando algún tipo de sellado térmico. Por ejemplo, fibras de PGA se han unido mediante la incorporación en la solución de poli(L-Láctico) PLLA, luego estos son enfriados y se da la posterior eliminación del PLLA usando un solvente que es selectivo sólo a este polímero [34].

En el caso de un poliéster-eter biodegradable como la Poly(p-dioxanona) (PPDX) la cual ha sido muy usada para la fabricación de suturas [35] también se empleó esta técnica para el desarrollo de estructuras

3D mediante el proceso de hilado y luego fusión controlada [36]. En este caso primeramente se forman los filamentos a través de un proceso de hilación desde el fundido (como lo muestra la figura 1).

Luego estos filamentos son recolectados cuidadosamente y embebidos dentro de un molde (en este caso se usó una capsula de aluminio), la cual es sellada y sometida a un proceso de fusión controlado para no permitir la fusión total y desorientación de las fibras, sino solamente generar una fusión superficial (considerando la temperatura de fusión *onset* del polímero) que permita generar la unión interfacial entre fibras o sinterización [36], como se muestra en la figura 2.

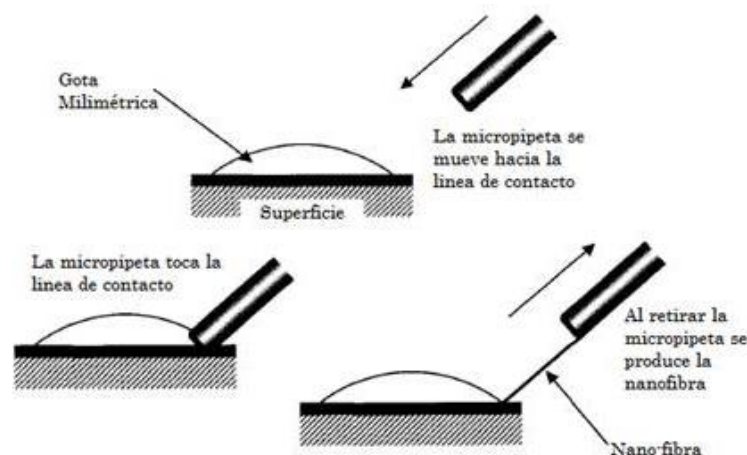


Figura 1. Proceso de hilado desde el fundido.

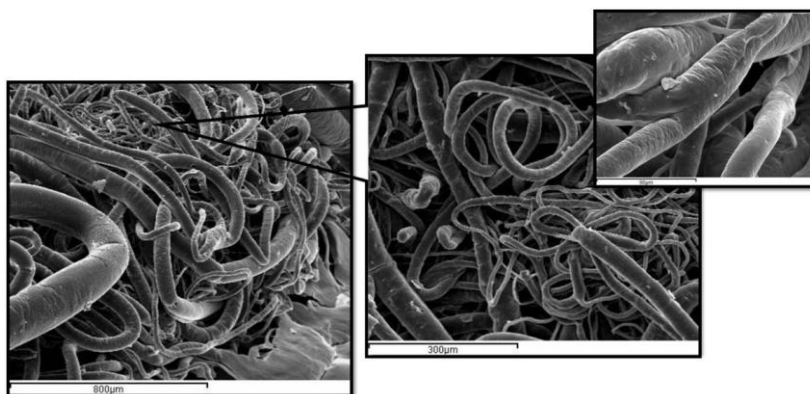


Figura 2. Microfotografía MEB de un sistema de hilado y tejido de fibras (por confinamiento) de polímero. Se observa una matriz 3D porosa, construida por la sinterización por fusión de las fibras.

Sin embargo, a pesar de la simplicidad de esta técnica, las dificultades que presenta mayormente es el control de la porosidad, el control de los diámetros de las fibras, la desorientación de las fibras y colapso cuando se usaba el proceso térmico sin un buen control para la unión entre los filamentos.

1.2 Solvent casting y lixiviación de partículas

Casi de manera simultánea, y como una consecuencia de las desventajas que presentaba la técnica anterior para controlar tamaño de poros y diámetro de fibras, surge como una alternativa la técnica de formación de membranas por *solvent casting* y lixiviación de partículas. En este caso el tema del control del tamaño de poros, en muchos casos pudo ser controlado. Es por ello que en este caso, con una buena selección de la sal a usar, se conseguía controlar el tamaño de poros, a altas concentraciones de sal, sin perder su estabilidad física se podía proporcionar una interconectividad de poros, se generaba una buena relación superficie-área-volumen, así como el nivel de cristalinidad. La técnica entonces consiste en realizar un proceso de separación de fases, donde se usa una solución polimérica, y debe tener un buen solvente y que sea deseablemente volátil, donde se coloca un compuesto porógeno (como una sal u otro polímero, preferiblemente soluble en agua) el cual es mezclado, y se deja secar hasta formar una estructura tridimensional, que una vez formada, es sometida a la acción de un buen solvente para el compuesto porógeno pero mal solvente para la matriz polimérica, la cual finalmente va a formar la estructura o red 3D [1, 37]. Esta estructura luego debe ser debidamente lavada para garantizar la eliminación total del porógeno y de posibles restos de solventes. En la siguiente figura 3, se presenta un diagrama esquemático de cómo se puede conseguir este proceso de formación de andamios.

En la figura 4 a continuación, se muestra la obtención de andamios 3D usando los poliésteres policaprolactona (PCL) y mezcla PCL/PPDX (figuras 4A y 4B respectivamente) con la inclusión de sal (NaCl) previamente tamizada. Allí mismo se muestra en las figuras 4C y 4D como esa estructura 3D porosa es cubierta por una monocapa celular luego de la deposición de células condriocitos [38].

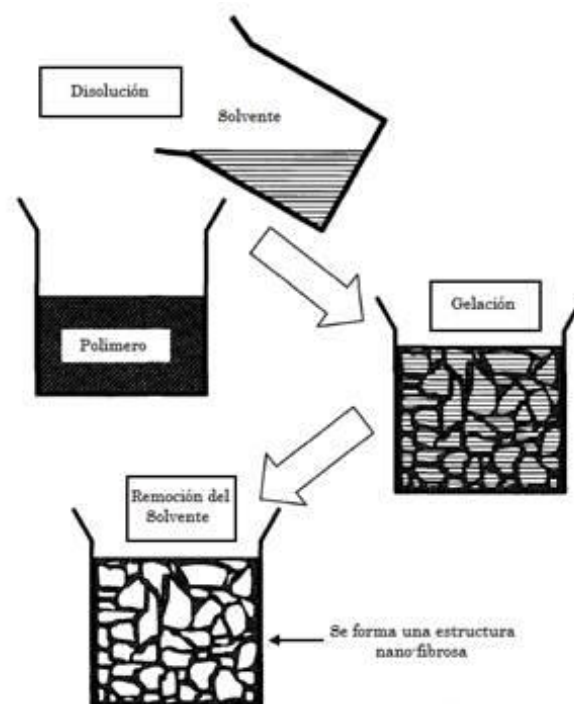


Figura 3. Proceso esquemático para la preparación de andamios usando la técnica de lixiviado.

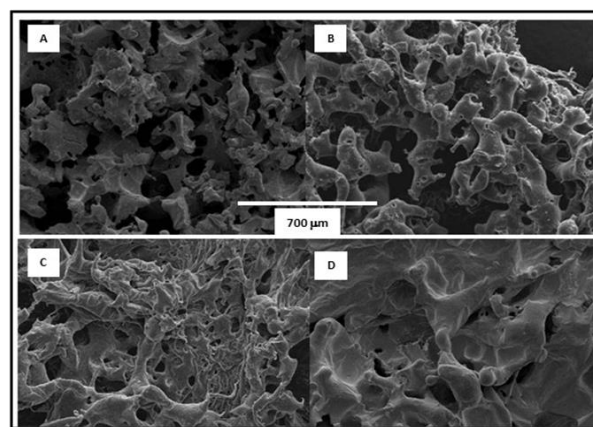


Figura 4. Observación por MEB, de un andamio usando poliésteres biodegradables, a través de la técnica de lixiviación (agente porógeno usado: NaCl).

En otro trabajo, se muestra el uso de un agente porógeno (carbonato de calcio) para fabricar la estructura tridimensional, que corresponde a un material compuesto. En este caso, se usó Poliláctico Láctico (PLA) como matriz, un PLA modificado con anhídrido maléico como agente compatibilizante y la fase dispersa fue la zeína (una proteína vegetal extraída del maíz), y el carbonato de calcio en forma de polvo. En la figura 5, entonces se aprecia como este agente logra formar la red 3D

de este material compuesto [39].

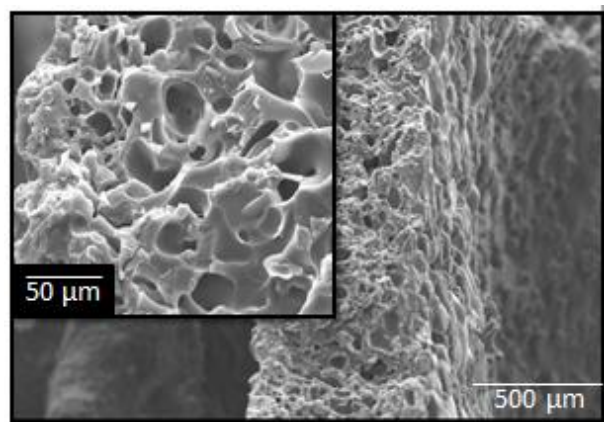


Figura 5. Microfotografía de un andamio poroso de un poliéster /zeina donde se usó como agente porógeno CaCO₃.

1.3 Espumado con gas

Una preocupación importante con las estrategias clásicas de fabricación de andamios como la evaporación de solventes y lixiviación de partículas, son los posibles restos de esos solventes los cuales conducen a una respuesta inflamatoria en el tejido después de la implantación. Un método que evita cualquier tipo de disolventes orgánicos es el método de fabricación de andamios usando un gas como agente de expansión [40]. La metodología es crear discos de polímero comprimidos (por ejemplo poliésteres) que son ligeramente calentados (al menos por encima de su temperatura de transición vítrea, en aquellos casos donde pueda ser necesario) y luego con CO_{2(gas)} a alta presión. A medida que se reduce la presión, la nucleación y formación de poros se generan en la matriz de polímero en función de la cantidad de gas inyectado y en la reducción de la tasa de presión. El tamaño medio de poros varía desde 100 hasta 500 µm. Sin embargo, un inconveniente de este método sigue siendo que la morfología de poros formada corresponde a poros fundamentalmente cerrados, lo cual es una limitante, pues se sabe que los andamios para ingeniería de tejidos deben garantizar interconectividad entre poros para responder a una posterior vascularización y difusión celular. Una solución de este problema, sin necesidad del uso de solventes, ha sido la incorporación de sales y su lixiviación y crear de esta manera una red de poros abiertos en los andamios producidos por espumado con gas [41].

1.4 Moldeo desde el fundido

Un método alternativo para la producción de andamios tridimensionales, es a través de un proceso de inyección en un molde desde el fundido. Esta técnica requiere de mezclar las partículas de un polímero y de un porógeno que se combinan y son inyectadas en un molde en un proceso donde la temperatura debe estar por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero (para polímeros amorfos) o de la temperatura de fusión (para los polímeros semicristalinos). Después de la reorganización del polímero, el material compuesto es extraído del molde, enfriado, y se sumergen en un líquido apropiado para lixiviar el porógeno. La estructura porosa resultante tiene la forma exterior exactamente igual que la del molde. Un ejemplo muy útil en este caso es mezclar poliésteres con micropartículas de gelatina para formar el compuesto, y luego lixiviar de esta manera la gelatina en agua destilada o desionizada [42].

1.5 Extrusión

Mientras que la extrusión es un método de procesamiento bien documentado para polímeros industriales y diversas aplicaciones, este método es relativamente nuevo para la fabricación de andamios biocompatibles y porosos. Uno de los primeros trabajos reportados usando esta técnica aplicada a la ingeniería de tejidos, fue el trabajo de Widmer y colaboradores en 1998 [43], quienes utilizaron un copolímero poliácido(Lactico-Glicólico) PLGA y PLLA para formar andamios tubulares para la regeneración del nervio periférico. En este trabajo, se fabricaron inicialmente membranas de estos polímeros utilizando la técnica de “solvent casting”, donde en una solución de los mismos se dispersaron partículas de cloruro de sodio como agente generador de poros. Las membranas se cortaron en un tamaño apropiado se cortaron y fueron cargadas en la extrusora. En la extrusora se aplica calor y presión al material compuesto (polímero/NaCl) y lo fuerza a pasar través de una boquilla (para dar la forma deseada de cilindro tubular) y lo empuja hacia fuera de la boquilla para formar estos conductos cilíndricos. Después los conductos se enfrían, y se sumergen en agua para lixiviar la sal y se secan a vacío.

1.6 Electrospinning o electro-hilado

Esta técnica fue patentada por Formhals en 1934 [44], en donde un arreglo experimental era descrito para la producción de fibras poliméricas empleando fuerza electrostática. Cuando se producen fibras bajo este método, el proceso se denomina electrohilado, mejor conocido como *electrospinning* [45-47]. En otras palabras, el *electrospinning* es una técnica que permite la creación de micro y nanofibras a través de un chorro de solución polimérica eléctricamente cargada o de polímero en estado fundido. Las fibras obtenidas a través del *electrospinning* se denominan fibras *electrospun* [47].

Los andamios producidos por *electrospinning* son herramientas muy atractivas para la ingeniería de tejidos, dado que estos imitan físicamente (biomimetizan) a una matriz extracelular natural, y es por ello que estos andamios actúan como buenos soportes para la adhesión y desarrollo celular [11].

El equipo de *electrospinning* en su forma más básica, consiste en una pipeta o reservorio para contener una solución polimérica (cuya punta debe ser un capilar metálico muy delgado a través del

cual descenderá el polímero), dos electrodos (formando una configuración punta-placa), y una fuente de voltaje de corriente continua (DC) en el rango de los kilovoltios (kV) [46]. Debido al alto voltaje aplicado, una gota polimérica es halada desde la punta de la pipeta formando cientos de fibras; cada fibra se carga eléctricamente, y dichas cargas generan dobleces o curvas de manera que las fibras poliméricas serpentean hasta que son depositadas en el colector, todo esto generado por la diferencia de potencial que esto induce. Durante ese viaje, el diámetro de cada fibra se reduce, y el solvente es volatilizado durante el viaje, por lo que se garantiza su eliminación. Finalmente, estas fibras son colectadas, al azar, quedando sinterizadas por algún posible resto de solvente, en la superficie metálica dispuesta para ello, y que ha sido conectada a tierra (voltaje cero) [1, 45-47], generando una especie de malla. Seguidamente, se presenta un esquema sencillo del montaje experimental o requerimientos del proceso de *electrospinning*, figuras 6-8 [46].

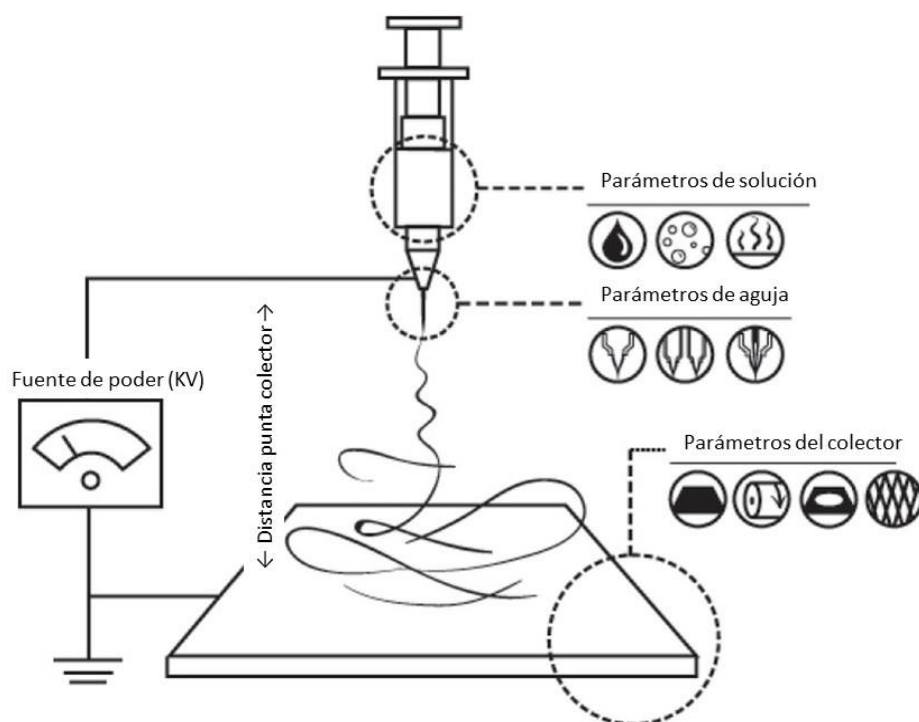


Figura 6. Diseño básico de un equipo de *electrospinning* (vertical) y variables de proceso.

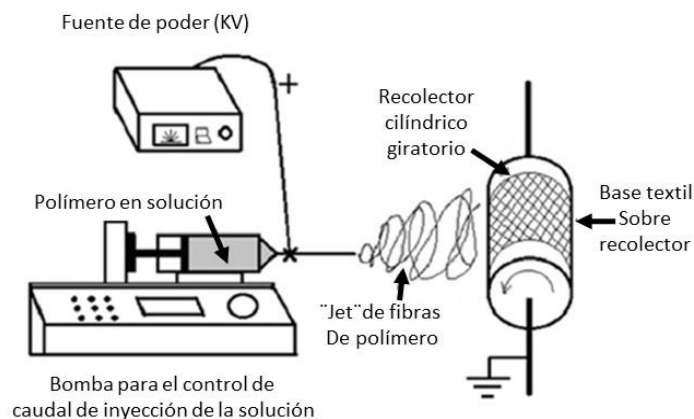


Figura 7. Diseño básico de un aparato de *electrospinning* (horizontal) y partes del equipo.

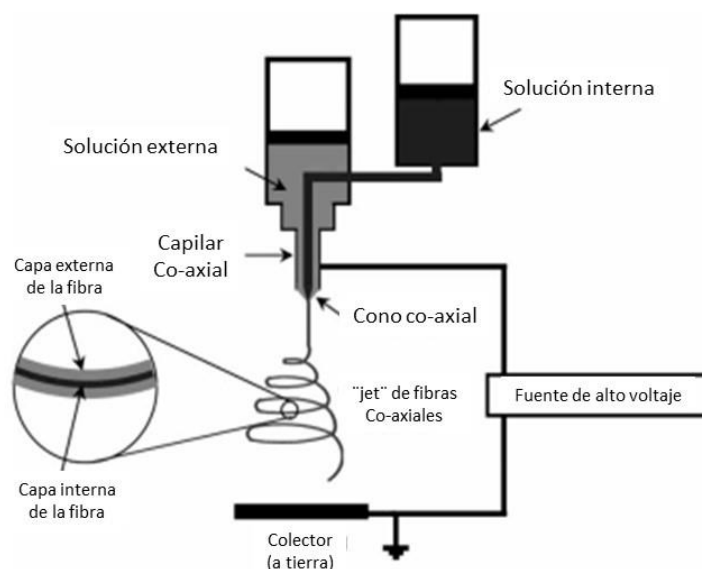


Figura 8. Diseño básico de un aparato de *electrospinning* con sistema co-axial.

El resultado del proceso es una red tridimensional de fibras dispuestas al azar sobre la superficie del colector, porosas, e interconectadas entre sí; para ello, durante el recorrido desde la punta del capilar hacia el colector realizado por la fibra en formación, debe ocurrir la evaporación del solvente empleado para generar la solución polimérica requerida.

Existen importantes características dentro del proceso de *electrospinning* [45]:

- Se debe disponer de un solvente adecuado para disolver el polímero a emplear.
- La presión de vapor del solvente debe ser la adecuada para que su evaporación sea lo suficientemente rápida para que la fibra mantenga su integridad cuando alcance el colector, pero no

tan rápida como para permitir que la fibra se endurezca antes de que alcance el rango nanométrico.

- La viscosidad y tensión superficial del solvente no debe ser tan alta para prevenir que el chorro formado no sea tan pequeño y permitir el drenaje libre de la solución polimérica desde el capilar.
- La fuente de poder debe ser adecuada para superar la viscosidad y tensión superficial de la solución para formar y sostener el chorro desde el capilar.
- La distancia entre el capilar y el colector puesto a tierra, debe ser suficientemente amplia como para que el solvente se evapore a tiempo y las

fibras se formen; además, de que no se creen chispas entre los electrodos.

La técnica de *electrospinning* permite obtener fibras de distintas morfologías, mediante la variación de los parámetros de proceso, modificando los elementos o configuración de ellos. Seguidamente se muestran fibras *electrospun* de diversos tipos de morfologías, como se muestra en la figura 9 [46].

Las tablas 1 y 2, presentan los parámetros en consideración en el proceso de *electrospinning*, cuyas modificaciones permiten obtener fibras de

distintas morfologías como las expuestas en la figura 9. Además de la morfología, algunos de estos parámetros se relacionan con los defectos presentes en las fibras (gotas), e influyen directamente en el diámetro de las mismas [48].

En la figura 10, se muestra el diseño y el equipo de *electrospinning* construido en la división de tecnologías tridimensionales del Centro de Tecnología e Informação Renato Archer (CTI) en Brasil, el cual fue construido por los autores, y que tiene una disposición horizontal.

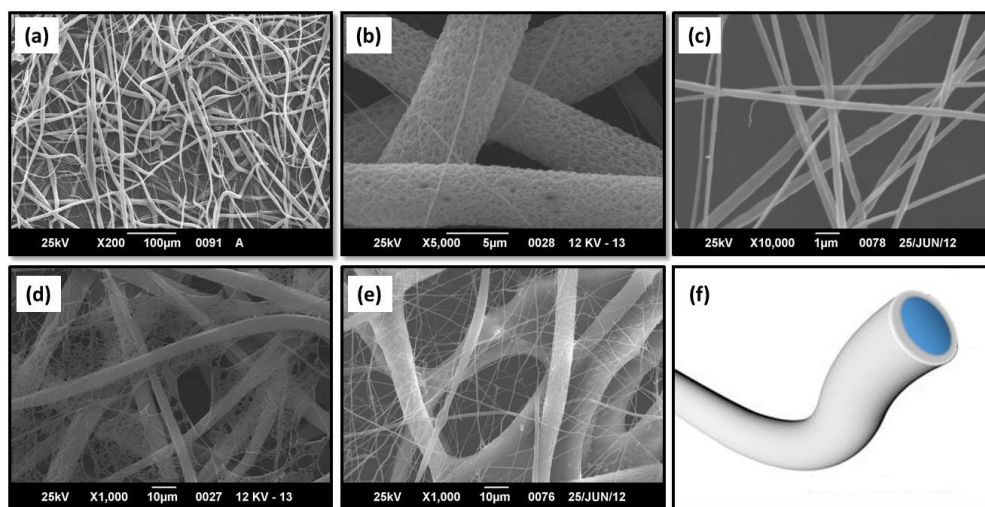
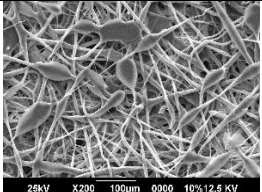
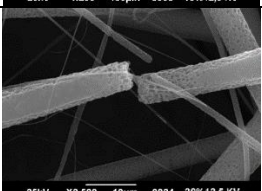
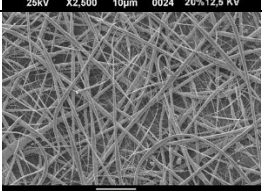
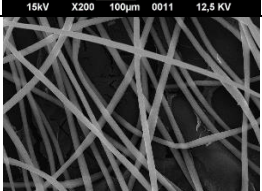
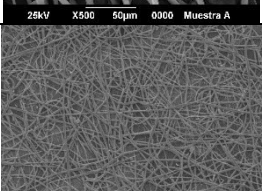
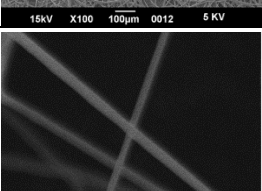


Figura 9. Tipos de fibras electrospun. (a) aplastadas o tipo cintas; (b) microfibras porosas; (c) nanofibras; (d) fibras y membrana tipo velo; (e) mezcla de micro y nano fibras, y fibras ramificadas; (f) diseño de lo que sería una fibra coaxial.

Tabla 1. Variables del proceso de electrospinning [46,47].

Propiedades del polímero	Propiedades de la solución	Características del montaje
Peso molecular	Viscosidad	Propiedades del sustrato
Distribución del peso molecular	Viscoelasticidad	Caudal de alimentación
Temperatura de transición vítrea (Tg)	Concentración	Magnitud del voltaje aplicado
Solubilidad	Tensión superficial	Geometría y arreglo de los electrodos. Distancia punta-colector.
	Conductividad eléctrica	Presión de vapor del solvente
		Humedad relativa

Tabla 2. Efecto de los parámetros de operación en el tipo de fibras y mallas obtenidas.

Parámetro	Variación	Efecto en la malla	Observaciones
Concentración de la Solución	Disminución		Fibras discontinuas interrumpidas en su extensión por la formación de gotas
	Aumento		Discontinuidad generalizada de las fibras con diámetros no consistentes en toda su extensión
Distancia punta-colector	Disminución		Fibras discontinuas y de diámetros inconsistentes en su extensión
	Aumento		Disminución de empaquetamiento de fibras o entramado originando poros más amplios
Voltaje	Disminución		Fibras discontinuas y diámetros inconsistentes en su extensión
	Aumento		Discontinuidad de las fibras, posible disminución del entramado, y fibras con diámetros menores

A continuación se muestran en las figuras 11 y 12, los andamios obtenidos mediante *electrospinning* a partir de dos poliésteres biodegradables, la Poli(ϵ -caprolactona) (figura 11) [49], y el Poliláctico (figura 12) [47] usando los equipos de electrospinning de la USB (con disposición vertical) y del CTI (con disposición horizontal) respectivamente.

1.7 Prototipado rápido de formas libres sólidas

Es la técnica más avanzada para la fabricación de andamios, también conocida como sólido de libre

forma (*solid free form*), permite la obtención de un objeto tridimensional previamente modelado con un programa de diseño añadido por computadora (*CAD*), que luego es expresado como una serie de secciones transversales usando un método de fabricación por capas (capa por capa) que es controlado por computadora [50].

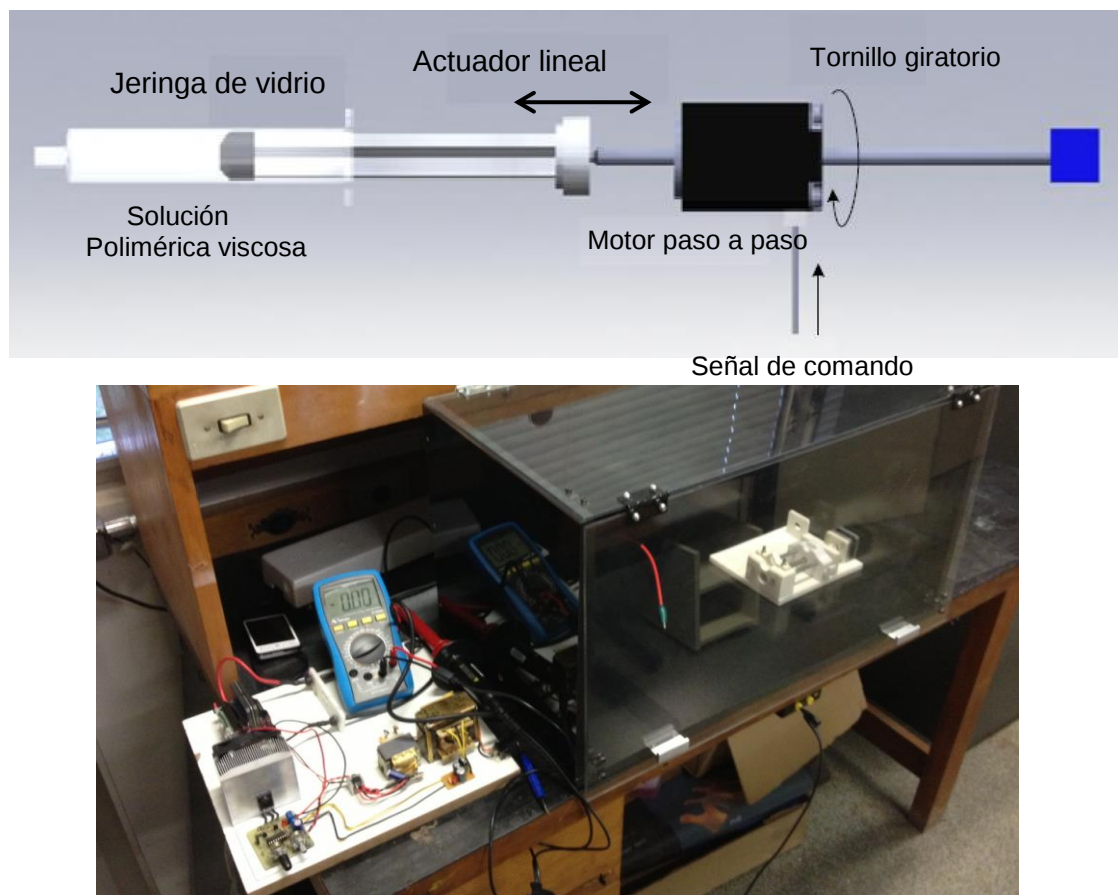


Figura 10. Sistema de operación de un equipo de electrospinning diseñado y construido en el CTI.

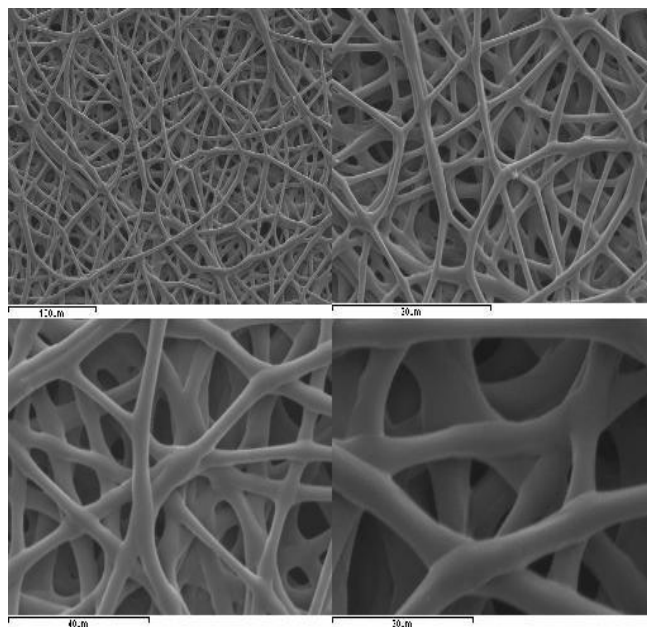


Figura 11. Microfotografías MEB de mallas obtenidas a partir de una solución de PCL/cloroformo (30 % p/v), $d = 25$ cm, $V = 15$ kV. Se observan diámetros uniformes de fibras, diámetro $\varnothing \approx 3-5$ μm , estructura de poros interconectados, con tamaño de poros $\approx 30-50$ μm , y buena sinterización.

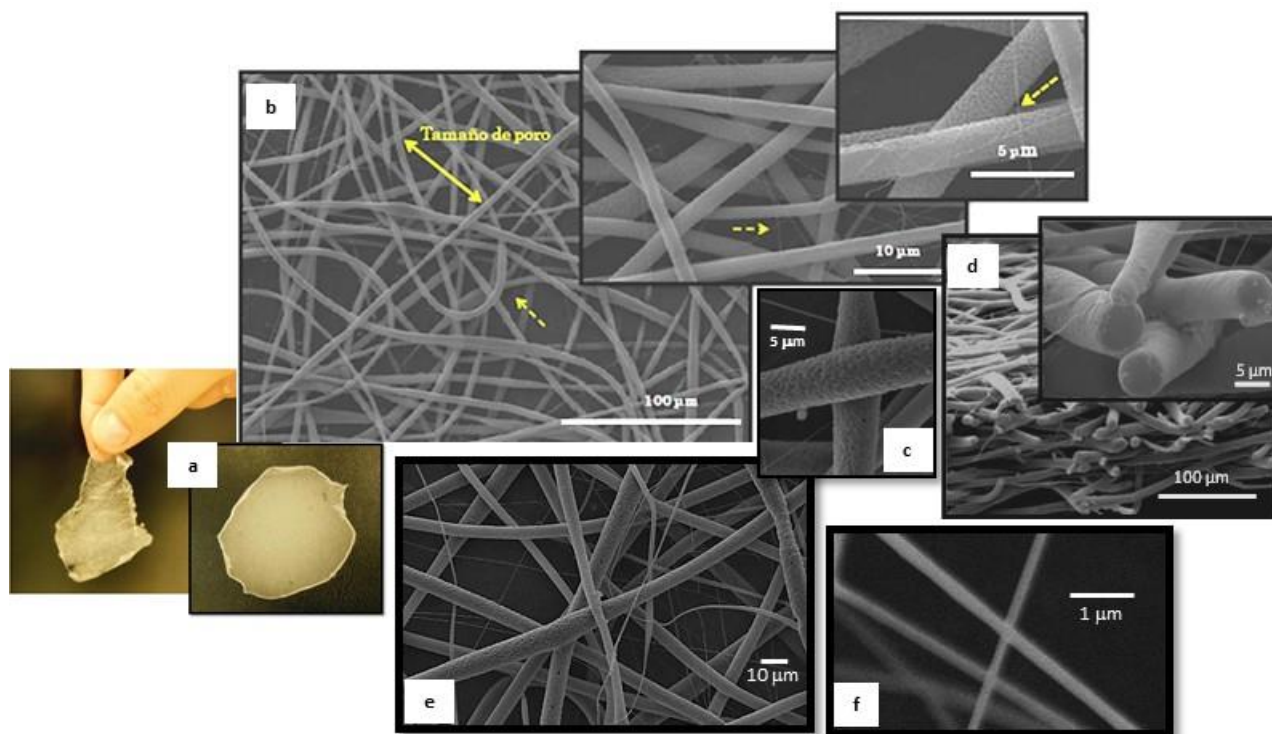


Figura 12. Microfotografías MEB de mallas obtenidas a partir de una solución de PLA/cloroformo (12,5 % p/v), $d = 13$ cm, $V = 11$ kV. (a) malla obtenida; (b) MEB de la disposición de las fibras y poros; (c) superficie porosa de las fibras; (d) espesor de la malla 3D y sinterización de la fibras; (e) mezcla de micro y nano fibras; y (f) detalle de las nano fibras formadas.

Entre las tecnologías de prototipado rápido (PR) están [51]: modelado por deposición de material fundido (FDM, en inglés), sinterización selectiva por láser (SLS, en inglés), estereolitografía (SLA, en inglés), impresión por bioextrusión 3D (3D-P), fabricación por corte y laminado (LOM, en inglés), fotopolimerización por luz UV (SGC, en inglés). Estas técnicas permiten fabricar andamios con arquitectura altamente reproducible y variable en cuanto a composición, permiten controlar tamaño, forma, geometría e interconectividad de la matriz produciendo estructuras biomiméticas. Adicionalmente puede integrarse a la técnica de adquisición de imágenes (tomografías computarizadas, TC) permitiendo que el injerto se ajuste al tamaño, forma, etc. de algún paciente en particular.

Sin embargo, hay limitaciones respecto a la variedad de polímeros que pueden usarse [52]. Cada una de las tecnologías mencionadas difiere en el estado y cantidad de material empleado, traslucidez, calidad superficial, precisión, costos, propiedades de resistencia mecánica, procesos de postcurado, entre

otros. En la tabla 3 se mostrará un resumen de las principales diferencias entre las principales tecnologías nombradas en el prototipado rápido.

La mayoría de los estudios de investigación actuales llevados a cabo por los más importantes centros de desarrollo y uso de prototipado rápido [53, 54], parecen indicar que la evaluación de parte de estas tecnologías en función de costo tiempo favorecen a la bioextrusión y a la FDM con la mejor relación costo-beneficio. [55]. Adicionalmente a los precios competitivos se destacan por las buenas propiedades mecánicas manifestadas por estas estructuras, que pueden ser generadas formas diversas y por ser de fácil colocación [56].

Estos motivos conducen a que en esta revisión, se considere una explicación más detallada de las técnicas de prototipado rápido: Bioextrusión y FDM, ya que han sido las técnicas más implementadas en la biofabricación de implantes por parte de nuestros grupos de investigación. Sin embargo alguna breve reseña se considerara sobre las otras técnicas.

1.8 Sinterización selectiva por láser (SLS)

El sinterizado selectivo por láser (conocido en inglés bajo el nombre de SLS: selective laser sintering), permite imprimir objetos funcionales sin recurrir a un aglutinante intermediario o a una eventual etapa de ensamble [57]. Antes de la impresión, la concepción del objeto es realizada a partir de un software de CAD (por ejemplo: CATIA, SolidWorks, ProEngineer) para que este sea enviado a una impresora en formato numérico. Luego, la impresión se realiza capa por capa, a partir de polvos fusionados, gracias a la temperatura generada por un láser CO₂. Esta tecnología hace posible la fabricación de objetos a partir de una amplia gama de materiales – como metales (titanio, acero y aleaciones) y los polímeros (generalmente poliamidas y policarbonatos), respetando las altas exigencias de las piezas funcionales, como la resistencia mecánica y la resistencia química y a la temperatura. Además, este procedimiento permite obtener piezas con color y sin límites de forma gracias a la ausencia de soportes, logrando al mismo tiempo, un alto nivel de calidad del producto y una gran estabilidad a lo largo del proceso de fabricación. En consecuencia, este proceso es utilizado, no solamente en el área de diseño y en la industria automóvil e aeronáutica, donde tiene su mayor interés y usuarios, sino también en la ingeniería biomédica (donde las piezas impresas deben ser biocompatibles).

1.9 Estereolitografía (SLA)

El concepto básico de la Estereolitografía es formar estructuras 3D mediante la laminación de capas delgadas en dos dimensiones superpuestas para así formar objetos en 3D [58]. Por lo general consiste en el curado o solidificación de un polímero fotosensible líquido por un rayo láser UV proyectado sobre la superficie de un fotopolímero. El láser suministra la energía que induce una reacción química, enlazando un gran número de pequeñas moléculas (monómeros) formando así un polímero altamente reticulado [59]. La Estereolitografía es un método aditivo porque construye objetos capa por capa, y como consecuencia es también generalmente conocida como técnicas de fabricación por capas para generar andamios 3D. En los últimos años esta técnica ha venido siendo popularizadas dado que se usa en la construcción de retratos tridimensionales.

1.10 Fabricación por corte y laminado (LOM)

Se basa en el uso de una hoja de papel encolada que se posiciona automáticamente sobre una plataforma y se prensa con un rodillo caliente quedando adherida a la hoja precedente [60]. La técnica LOM es un proceso automatizado que genera una pieza tridimensional basada en una representación CAD por laminación secuencial de láminas transversales. El sistema óptico consta de espejos que proporcionan el haz láser sobre la superficie en tratamiento a través de una lente focal que lo enfoca con un tamaño aproximado de 25mm. El corte del láser es controlado por una mesa de posicionamiento XY. El proceso de fabricación consta de tres partes: (1) La generación del fichero CAD-STL; (2) Construcción: en la fase de construcción, las capas finas de adhesivo recubierto con material son secuencialmente unidos el uno al otro siendo previamente cortados por el rayo láser. El láser incide sobre la superficie quemando el perímetro indicado por el modelo CAD en cada sección transversal, una vez hecho esto todo lo que se encuentra dentro de los límites se libera de la hoja. La plataforma con la pila de capas desciende y una nueva sección de materiales avanza. Vuelve a ascender la plataforma y el material calentado se superpone para ir uniéndose la pieza repitiendo el proceso; y (3) Finalmente se separa del material de apoyo. El factor temperatura es crítico y ha de mantenerse constante a lo largo del proceso por lo que la maquinaria dispone de un circuito cerrado que asegura este condicionante

1.11 Fotopolimerización por luz UV (SGC)

La tecnología *Solid Ground Curing* (SGC), data del año 1991, y se basa, al igual que la estereolitografía, en la solidificación de un fotopolímero o resina fotosensible [61]. En la fotopolimerización, sin embargo, se irradia con una lámpara de UV de gran potencia todos los puntos de la sección simultáneamente. La tecnología SGC realiza un curado de un fotopolímero capa a capa. En lugar de usar un láser explorador para realizar el curado de una capa dada, la capa completa se expone a una fuente de luz UV a través de una máscara que se coloca encima de la superficie de un polímero líquido. El proceso de endurecimiento requiere de 2 a 3 segundos por capa. Primeramente se genera un modelo CAD dividido por capas para lo cual se puede utilizar un software. Para cada capa se genera una máscara. Se distribuye una capa plana delgada

de fotopolímero líquido sobre la superficie de trabajo y se coloca la máscara encima, se expone entonces a una fuente UV de alta energía. El líquido expuesto a la fuente solidifica y el que queda oculto por la máscara queda en estado líquido. Acto seguido se limpia el área de trabajo retirando el líquido sobrante y se rellenan las áreas abiertas de la capa con cera caliente, la cual servirá de sostén al

enfriarse. Dentro de las consideraciones geométricas de esta técnica se tiene que el tamaño máximo de las piezas es de: 36 x 51 x 51cm, por lo que permite crear piezas grandes y complejas (como estructuras de proteínas, hélices de ADN, modelo de órganos, etc.) [62].

A continuación se presenta una tabla resumen sobre las características de estas técnicas de PR.

Tabla 3. Características de las principales tecnologías de prototipado rápido PR [51].

	SLA	SGC	SLS	LOM	FDM	Bioextrusión
Tecnología	Polimerización	Polimerización	Sinterización	Laminado	Deposición de filamentos	Deposición de polímero fundido
Láser	Si	No	Si	Si	No	No
Materiales	Fotopolímeros	Fotopolímeros	Polycarbonato Poliamidas Ceras	Papel Poliésteres poliamidas	ABS, ceras, Nylons, PLA (deben estar en forma de filamentos)	Polímeros termoplásticos en general. Poliésteres biodegradables
Tamaño de poros (μm)	-		45-100		100-1000	200-1000
Resolución (mm)	0,05	0,05	0,075	0,05	0,05	0,1
Precisión (mm)	$\pm 0,020$	$\pm 0,020$	$\pm 0,250$	$\pm 0,020$	$\pm 0,125$	$\pm 0,050$
Tamaño máximo de piezas (cm)	50x50x60	36x51x51	30x40	depende de lámina usada	30x30x30	25x30x40
Ventajas	Tecnología madura, rápida y alta precisión	Alta precisión, mejores propiedades mecánicas y no necesita de soporte	Material más económico y de mayor variedad, no necesita de soportes. No necesita de solventes. Alto radio superficie/ Volumen.	Alta precisión, y es más rápido que los otros métodos, materiales baratos	Materiales económicos y mayor variedad, no necesita de soportes, más rápido que SLA. No necesita de solventes. Alto radio superficie/ Volumen.	Materiales económicos y mayor variedad, no necesita de soportes ni de filamentos previamente formados. No necesita de solventes. Grandes tamaños de poros. Alto radio superficie/ Volumen. Permite la inclusión de porógenos.
Desventajas	Modelos traslucidos, quebradizos, necesita de soportes. Pueden tener restos de monómero.	Equipo de alta complejidad y grande que necesita de mucho espacio, y es tecnología cara. Pueden tener restos de monómero.	Las piezas tienen un aspecto laminado, tiene una baja tolerancia	Puede ocurrir deformación de las laminas	Piezas pueden tener apariencia granulada. Depende de que el material este en forma de filamento con diámetros específicos. Altas temperaturas de proceso	Piezas pueden tener alguna deformación, altos % de contracción. Altas temperaturas de proceso

1.12 Bioextrusión

La bioextrusión es una técnica de prototipaje rápido basada también en la técnica clásica de extrusión de polímeros [63], donde los andamios porosos, se hacen por capas de microfilamentos que son direccionalmente extruidos y alineados [64], como se muestra en la figura 13. Mientras que en la figura 14, se observan estructuras 3D obtenidas mediante la técnica de bioextrusión, donde los diámetros promedios de fibras son de 200-250 μm , así como los tamaños de poros.

En la figura 13 se muestra un esquema del equipo de deposición de fibras 3D. Dicho sistema procesa materiales variados con altas presiones y temperaturas, que van desde polímeros sintéticos y naturales, hasta biocompuestos, materiales de alta, media y baja viscosidad. Uno de los retos que tienen hoy día muchas investigaciones es tratar de llevar de manera directa ciertas líneas celulares durante el proceso de fabricación de este tipo de andamios 3D mediante bioextrusión.

Además, actualmente estos equipos pueden poseer un sistema de esterilización incorporado; que

permite la fabricación de andamios con diferentes configuraciones (basados en algún tipo de software), lo que conlleva a que se puedan tener diferentes geometrías de poros y diferentes porosidades y formas de interconectividad entre esos poros. Posee una plataforma y un sistema de deposición móvil en los planos x, y, z; lo que permite justamente construir las estructuras 3D con un cierto número de capas (figura 14). Como se muestra en la siguiente figura, las estructuras obtenidas pueden llegar a ser del orden de $\sim 100\text{-}200\ \mu\text{m}$.

A continuación, en la figura 15, se muestra que no solo se puede usar el sistema de bioextrusión para obtener andamios construidos con homopolímeros, sino que también se pueden usar polimezclas. En este caso se muestra una PLA/PCL (en diferentes rangos de composición p/p), se aprecia que a pesar de las diferencias en el punto de fusión de los polímeros que conforman esta mezcla, se pueden obtener estructuras interesantes y con buena estabilidad dimensional [65].

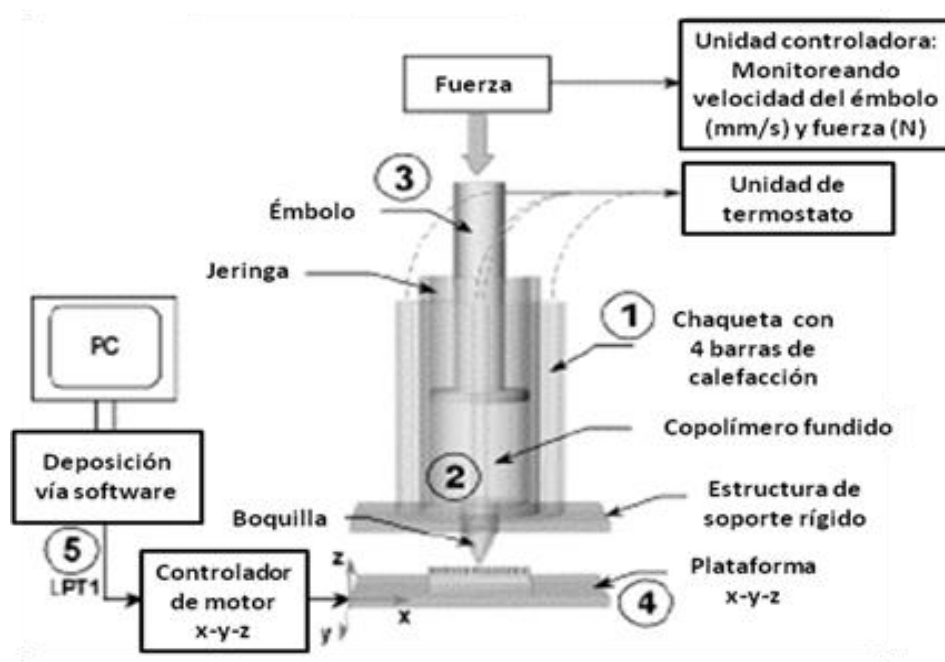


Figura 13. Esquema de un equipo de bioextrusión para deposición de fibras 3D [63].

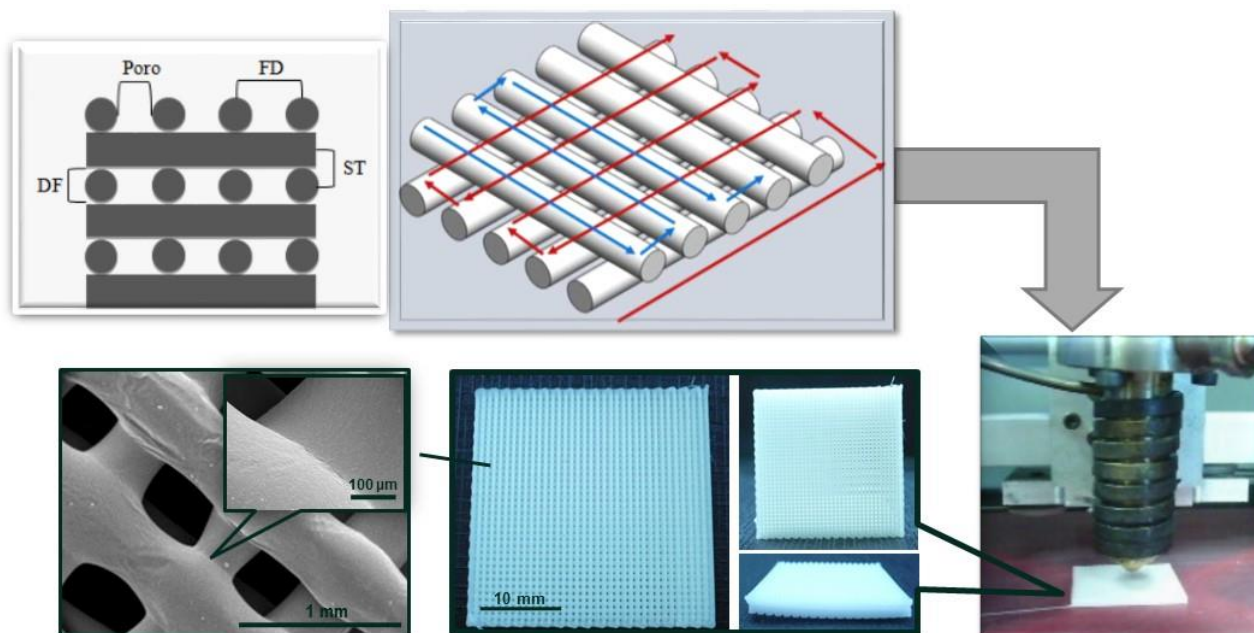


Figura 14. Esquema del desarrollo de estructuras 3D usando una bioextrusora. Fotografía de la maquina durante el proceso de fabricación de un andamio de PCL. Detalle visto por MEB.

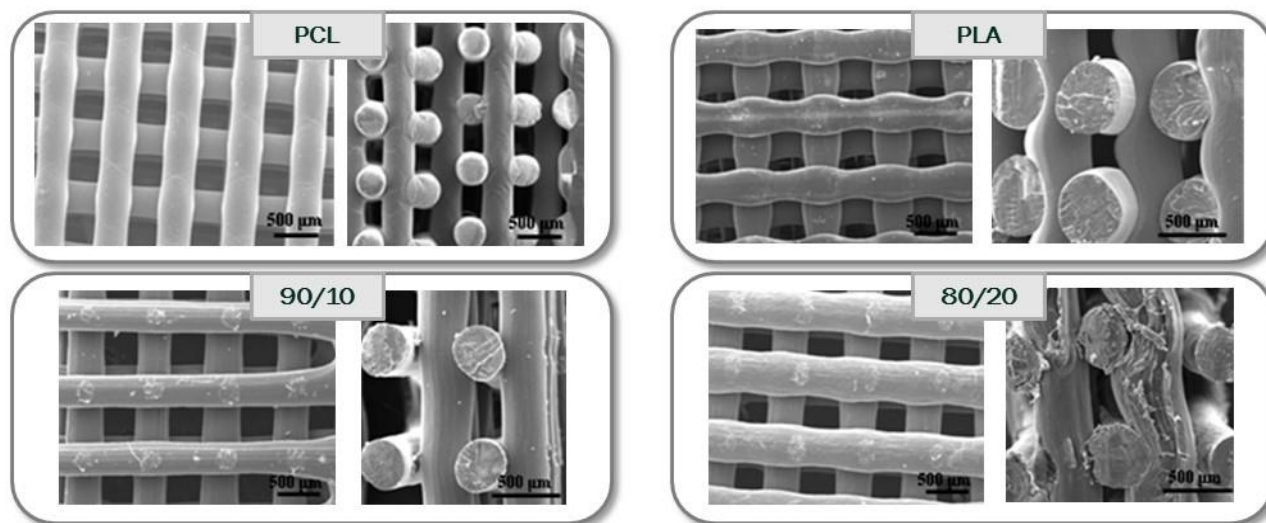


Figura 15. Micrografías MEB de andamios 3D obtenidas mediante bioextrusión, usando los homopolímeros PCL y PLA y polimezclas PLA/PCL 90:10 y 80/20 respectivamente.

1.13 Deposición de material fundido (FDM)

El modelado por deposición de material fundido (FDM, por sus siglas en inglés *Fused Deposition Modeling*) está basado en la deposición sobre una plataforma de capas de material fundido proveniente del calentamiento y ablandamiento de filamentos de polímeros para la fabricación del modelo [66]. Al mismo tiempo otros filamentos blandos forman

apoyo para las superficies libremente suspendidas del modelo, para poder ser construidas. El polímero más empleado en el filamento para el modelo es el ABS (acrilonitrilo butadieno estireno). La máquina de FDM posee una plataforma recubierta con una espuma densa y flexible que se mueve en sentido vertical (eje z) y un cabezal equipado con dos boquillas extrusoras del filamento calentado: una para la alimentación de las capas del modelo

diseñado y otra para la construcción de los soportes. Los filamentos se almacenan en la máquina, la cual es calentada al vacío. Debe evitarse la humedad del material dentro de la boquilla extrusora, de lo contrario se formarán ampollas que impedirán la continuidad de deposición del material fundido. Las boquillas de extrusión son alimentadas a través de dos guías giratorias conectadas a un motor que van transportando los filamentos almacenados en un rollo. El software utilizado por el equipo FDM es una combinación de CAD/CAM, no integrado a la máquina, ésta última se conecta al computador con el sistema CAM (siglas en inglés de manufactura asistida por computador), que se encarga del monitoreo de los comandos de construcción. Para cada capa se generan comandos por los cuales la boquilla va depositando el material fundido. Al finalizar cada capa el cabezal desciende y se lleva a cabo la deposición de más material en una nueva capa. La operación se repite hasta que el modelo haya culminado. Además del ABS, resinas termoplásticas adecuadas a este proceso son también usadas, lo cual incluyen poliésteres (como el PLA

últimamente muy empleado), polipropileno, elastómeros, [67]. La escasa o nula cantidad de material perdido durante y después del proceso implica una limpieza reducida del equipo. La figura 16, muestra un esquema del equipo FDM para prototipado rápido.

Las siguientes figuras 17, 18 y 19, muestran detalles de las geometrías que se pueden diseñar a través de un software de computador (como el *Rhinoceros* [68] que es un software libre usado por el CTI) y como estas geometrías pueden ser totalmente alcanzadas a través de un equipo de PR tipo FDM copiando fielmente la disposición en diferentes ángulos de los filamentos de cada capa de la estructura tridimensional. Posteriormente como esta disposición y buena sinterización entre filamentos e interconectividad entre los poros creados puede ser verificada usando la técnica de microscopia electrónica de barrido (como lo resume la figura 19).

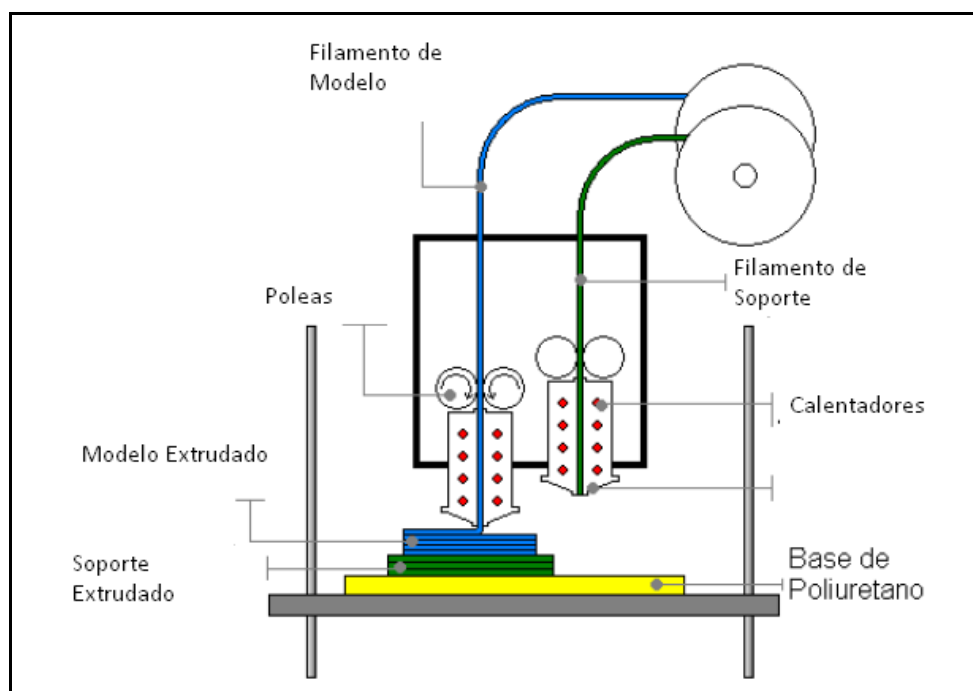


Figura 16. Esquema de una maquina FDM de prototipado rápido.

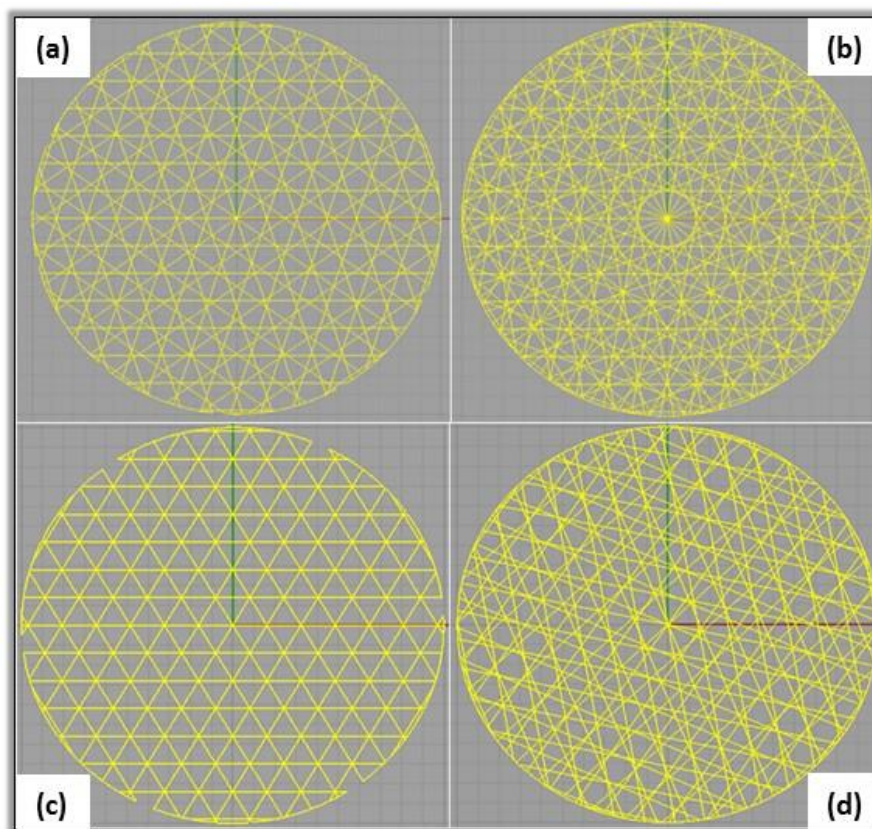


Figura 17. Diseño de andamios, usando el software *Rhinoceros*® program; considerando la orientación de la deposición de las fibras capa por capa. Vista superior del diseño. Orientación entre fibras: a) 36 °, b) 40 °, c) 56 ° d) 120 °.

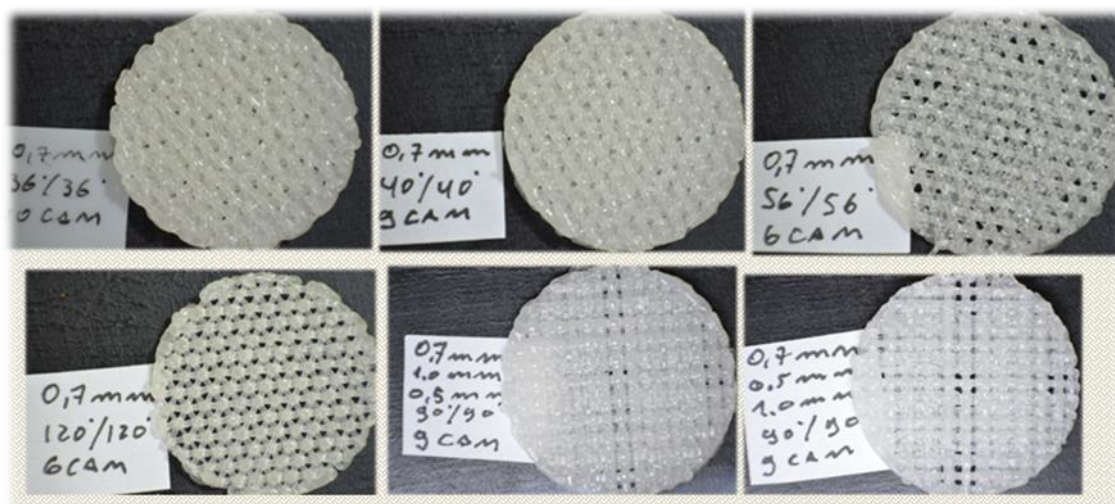


Figura 18. Fotografía de los andamios construidos mediante FDM, siguiendo las indicaciones pautadas por el software *Rhinoceros*® program; considerando la orientación de la deposición de las fibras y numero de capas (como se mostró en la figura 17 anterior).

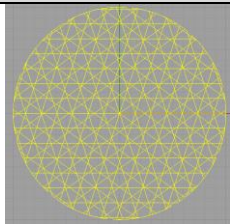
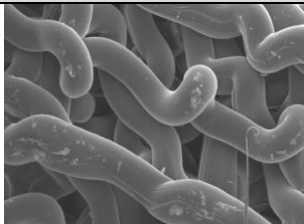
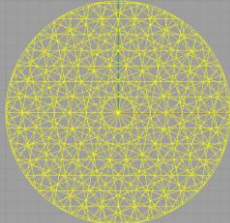
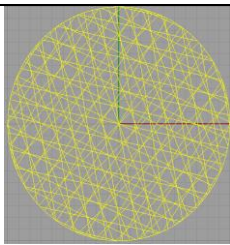
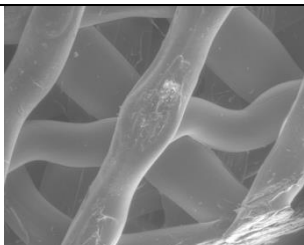
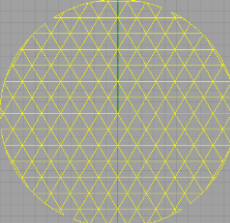
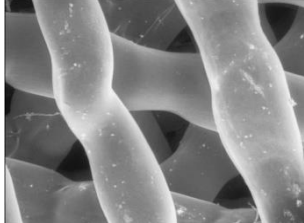
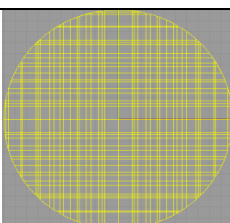
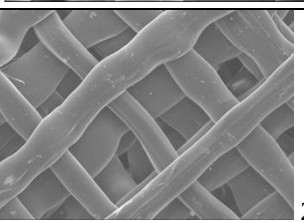
Parámetros	Rhinoceros®	Observación por MEB
0.7mm /36°/36°/ 10 layers		 200 μm
0.7mm /40°/40°/ 9 layers		 200 μm
0.7mm /56°/56°/ 6 layers		 200 μm
0.7mm /120°/120°/ 6 layers		 200 μm
0.7-0.5-1mm /90°/ 9 layers		 200 μm

Figura 19. Relación entre el diseño del andamio usando el software *Rhinoceros*® program, y la observación por MEB de la disposición real de las fibras. Se aprecia que la maquina FDM consigue copiar bien el sentido de deposición de las fibras de acuerdo al patrón de fibras diseñado.

1.14 Sistemas híbridos o de doble escala

Una de las grandes limitaciones que presentan los andamios construidos a través de bioextrusión o FDM es que generalmente se producen poros con tamaños de poros muy grandes, los cuales podrían ser para algunos sistemas celulares muy poco ventajosos para garantizar un adecuado proceso de

adhesión y proliferación celular. A diferencia que el *electrospinning*, como ya fue anteriormente expuesto, que logra biomimetizar bastante bien la matriz extracelular. La desventaja entonces de los sistemas bioextruidos o por FDM, unido con la ventaja de las estructuras obtenidas por el *electrospinning* pueden ser de alto interés para de

ese mundo proponer la construcción de un sistema híbrido, que vendría a ser realmente un sistema de doble escala [69].

Es así, como una de las estructuras tipo andamio donde se pueden combinar técnicas, es la construcción de los denominados sistemas híbridos (desde el punto de vista de varias técnicas usadas) o de doble escala (desde el punto de vista de los diferentes diámetros que se pueden alcanzar en los filamentos que conforman estas estructuras 3D). En este caso se pueden usar las técnicas de bioextrusión, o de FDM y *electrospinning*. Esto no solo permite la combinación de técnicas, sino también la combinación de materiales que pueden ser usados para la fabricación de estos novedosos sistemas.

En este caso, capa por capa se obtiene mediante las técnicas de FDM o Bioextrusión y con un patrón predefinido, un filamento de una masa fundida de polímero y el andamio 3D se va construyendo colocando capas una encima de la otra. De esta forma, la arquitectura 3D final está determinada, y

los filamentos que la constituyen son generalmente gruesos y con grandes tamaños de poros.

Luego de esto se puede incorporar la deposición de filamentos que estarán a micro y nanoescala utilizando *electrospinning*. Entonces, bien sea en la parte superior del andamio ya formado por bioextrusión o FDM, por ambas caras, o entre las capas que lo conforman, se puede aplicar la técnica de *electrospinning*, dejando así entre los poros una malla fina y que biomimetiza una matriz extracelular. La idea se muestra claramente en la figura 20, donde se presenta un esquema del proceso de dos pasos para la fabricación de andamios 3D de doble escala: (a) en primer lugar, una estructura de microfilamentos 3D de PLA fue construida capa por capa mediante un proceso de bioextrusión; (b) en segundo lugar, usando *electrospinning* se depositan fibras ultrafinas de PLA y/o PCL. En las figuras 21 y 22, se muestran detalles, usando microscopia electrónica de barrido, de este tipo de sistema combinado o híbrido.

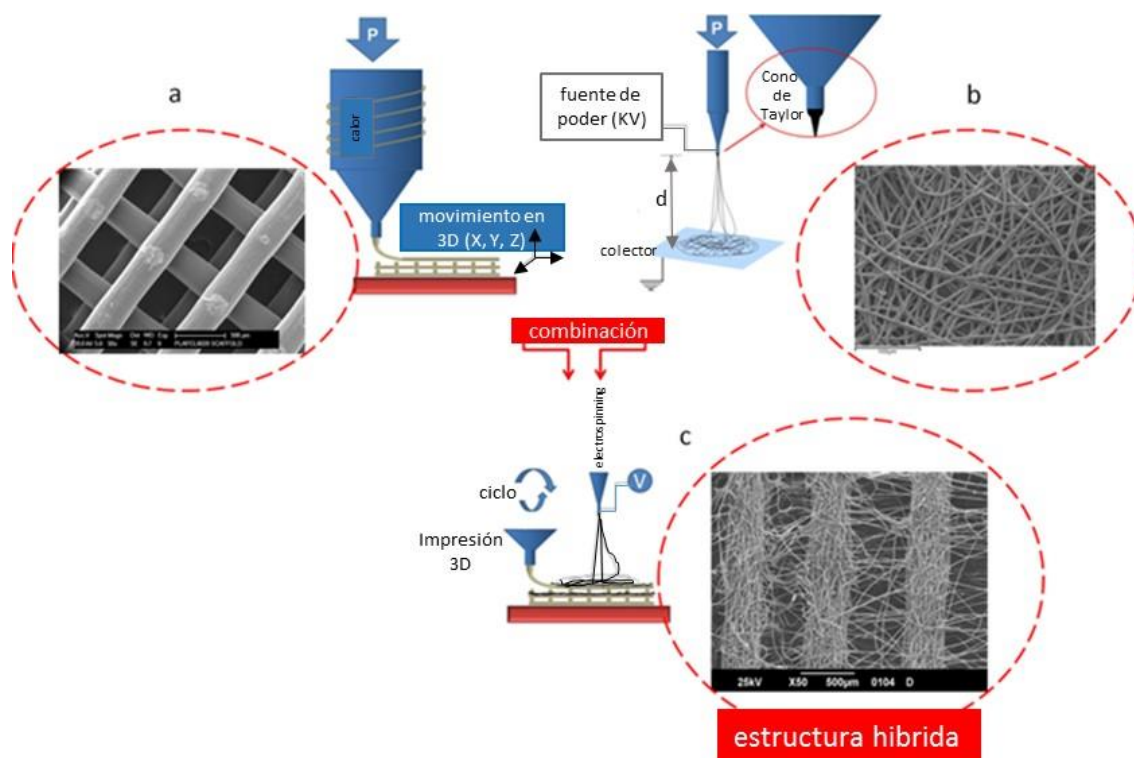


Figura 20. Diseño propuesto de como se pueden combinar las tecnologías (o materiales). Imagen (a) de impresión 3D (bioextrusión o FDM), con (b) la técnica de *electrospinning*; para construir (c) un sistema híbrido.

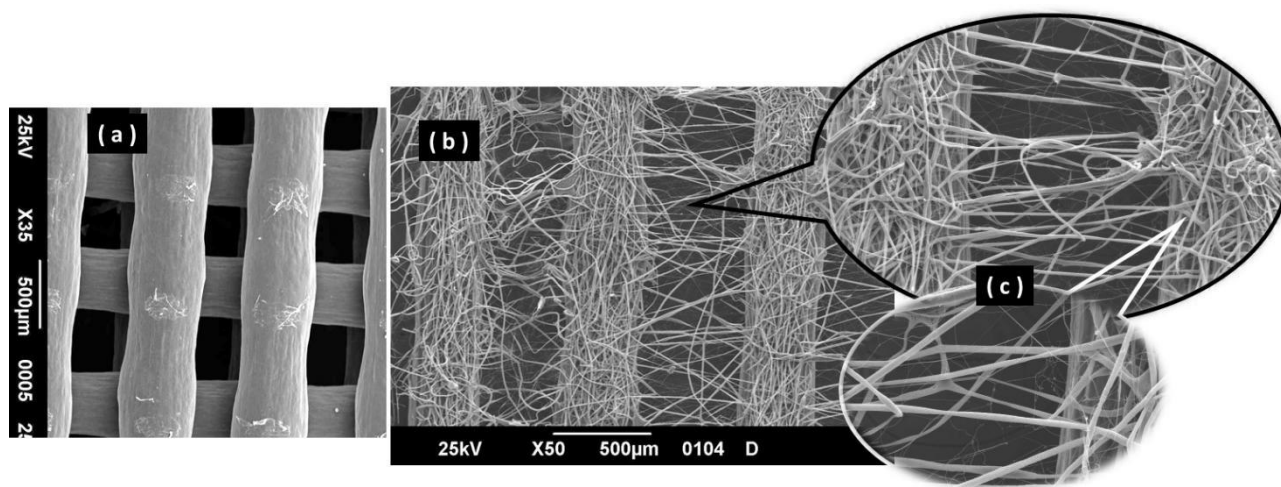


Figura 21. Micrografías SEM del andamio híbrido y a doble escala. (a) andamio 3D de PCL obtenido por bioextrusión, donde se muestran los macro poros. (b) imagen del sistema combinado después de la deposición de micro y nano fibras de PLA usando *electrospinning*. Estos filamentos muestran una orientación preferencial y cubren los macros poros creados por bioextrusión, generando un mejor soporte para cultivo celular. (c) detalle la buena adhesión que tienen los filamentos depositados por *electrospinning* sobre los filamentos previamente creados.

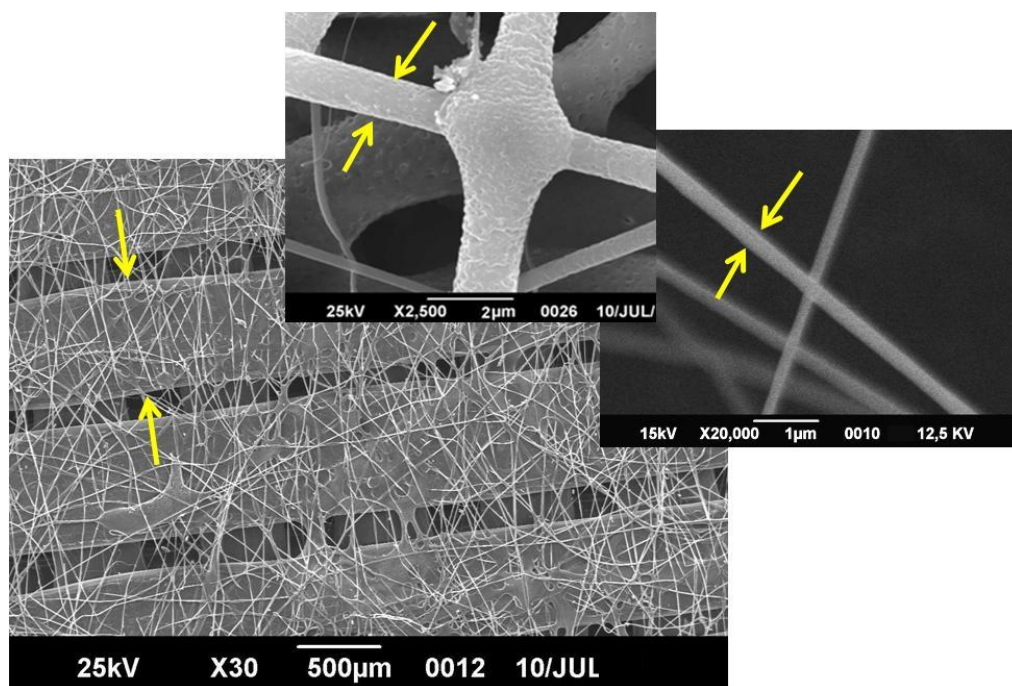


Figura 22. Microfotografía MEB de un sistema híbrido. La base construida por FDM usando PLA, y luego la deposición de fibras de PCL usando *electrospinning*. Se muestran (con las flechas) detalles de los diferentes niveles de diámetro que se pueden alcanzar en estos sistemas combinando tecnologías y materiales.

1.15 Otros tipos de andamios

1.15.1 Hidrogeles

Si bien los hidrogeles no son materiales que se preparen mediante el uso de alguna técnica de manufactura como las mencionadas anteriormente,

los mismos en base a su composición pueden presentar una estructura de red tridimensional tipo andamio, es decir porosa y con interconectividad, que los convierte en potenciales biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejidos [70].

Los hidrogeles son materiales poliméricos

reticulados naturales o sintéticos que al entrar en contacto con el agua, se hinchan y se vuelven blandos y elásticos [71, 72]. Una parte significativa de ellos no se disuelve debido a las reticulaciones (que pueden ser físicas y/o químicas), y debido a la flexibilidad de las cadenas del polímero, es posible que las moléculas de disolvente ingresen en la estructura tridimensional sin menoscabo de su estabilidad dimensional [73].

El carácter hidrófilo de estos geles es debido a la presencia de grupos hidrófilos dentro de la red polimérica 3D tales como: alcoholes, ácidos carboxílicos, amidas y ácidos sulfónicos, entre otros [74], estos geles pueden absorber desde bajos valores de agua (si son altamente reticulados y más rígidos, entre 10-20%) hasta $> 1000\%$ de su peso seco en agua. En base a su estructura química, pueden tener la capacidad de cambiar su comportamiento de hinchamiento, en respuesta a estímulos externos, tales como cambios en el pH, la fuerza iónica, temperatura [70, 75].

En el caso de los trabajos que dirigimos en nuestras investigaciones, trabajamos preferencialmente en sistemas denominados de red interpenetrada. Un hidrogel de Red interpenetrada (IPN) corresponde a una mezcla de dos o más polímeros reticulados, que pueden ser incompatibles, pero están entrelazados

físicamente, formando una estructura tridimensional, y que puede tener como beneficio las características físicas y químicas de la matriz y de la red interpenetrada que los conforma [71].

En el caso del trabajo desarrollado por J. Rojas y Sabino [76], en la formulación de hidrogeles en base acrilamida y con red IPN de oligosacáridos de quitosano y/o Polivinilalcohol, se lograron obtener apósitos flexibles los cuales podrían servir para los procesos de regeneración de piel que haya sufrido quemaduras graves. En esta investigación se verificó la capacidad de absorber y liberar fármacos como antibióticos, antiinflamatorios, etc. En la siguiente figura 23, se muestra uno de los apósitos (acrilamida/PVA) y su morfología interna observada mediante microscopía electrónica (MEB). En esa misma figura se muestran también hidrogeles obtenidos a partir de soluciones viscosas de quitosano, el cual fue reticulado usando genipina que es un agente reticulante extraído naturalmente y que posee carácter biocompatible.

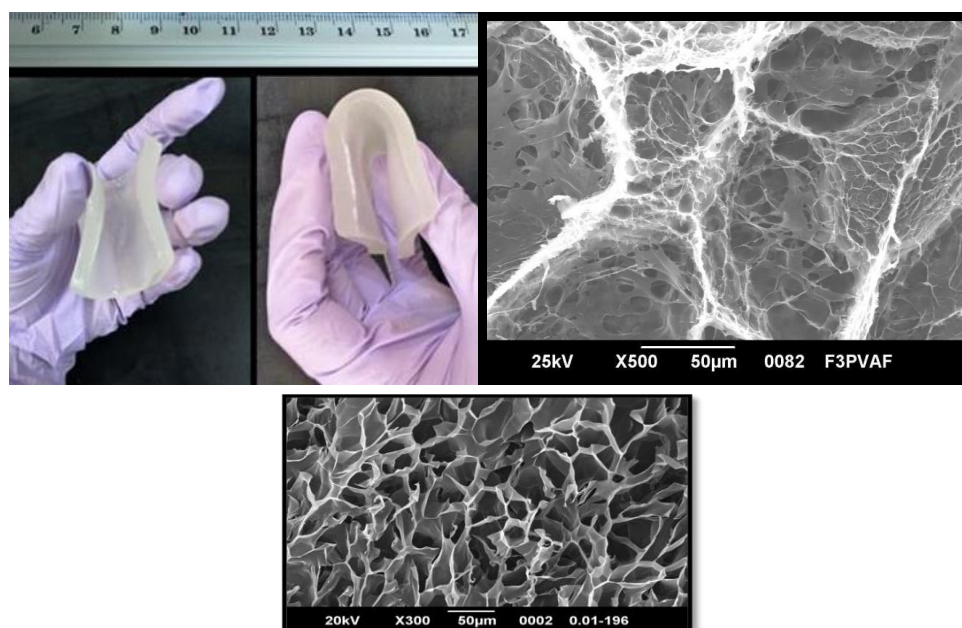


Figura 23. Superior: Fotografía de los andamios interpenetrados Acrilamida/PVA sintetizados en forma de láminas flexibles (apósitos), y su morfología interna observada por MEB. Inferior: morfología interna de hidrogeles de Quitosano reticulados con genipina.

1.15.2 Bioprinting

Bioprinting 3D es el proceso de creación de patrones o estructuras donde se colocan células en un espacio cerrado usando algunas de las tecnologías de impresión 3D, donde se espera que la función celular y su viabilidad se conservan dentro de la construcción previamente impresa [77,78]. En general, *Bioprinting* 3D utiliza el método de adicionar capa por capa para crear estructuras de tejido similar a las que se utilizan en campos de la ingeniería de tejidos. La técnica *Bioprinting* cubre una amplia gama de materiales. Actualmente, muchas nuevas investigaciones afirman que el *Bioprinting* se puede usar para imprimir tejidos y órganos para ayudar al suministro y la liberación de fármacos. Además, el *Bioprinting* 3D ha comenzado

a ser incorporado como un método para la impresión de andamios. Por ejemplo, según estos reportes, estos andamios se pueden utilizar para regenerar articulaciones y ligamentos [79]. La primera patente relacionada con esta tecnología fue presentada en los Estados Unidos en 2003, y luego de todo el proceso de análisis fue concedida en el 2006, por lo que la hace una de las técnicas más novedosas en la última década [80].

Entonces, esta tecnología de impresión, que puede ser usada para la impresión de órganos artificiales *Bioprinting* 3D [81], usa la analogía con la tecnología de prototipado rápido, y se puede dividir en tres pasos más importantes: pre-procesamiento, procesamiento y post-procesamiento (ver figura 24).

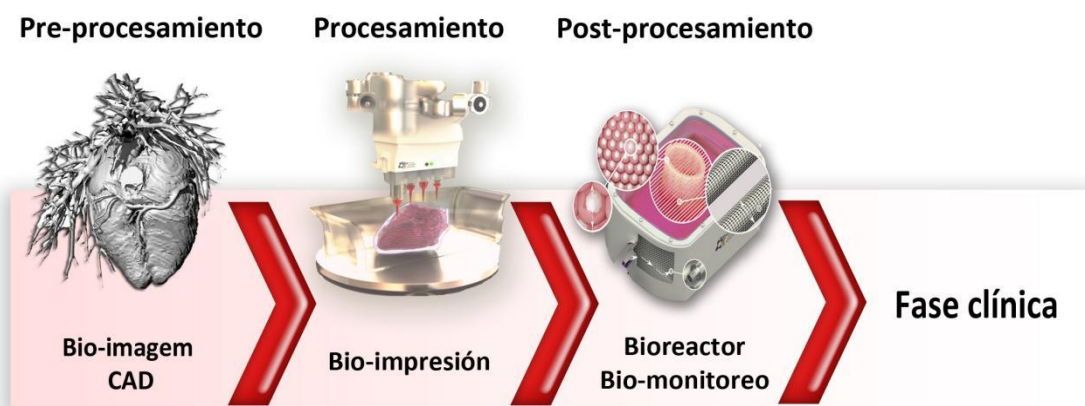


Figura 24. Etapas principales en la tecnología *Bioprinting* para impresión de órganos.

Etapa de Pre-procesamiento

La etapa de pre-procesamiento se puede definir como el desarrollo del diseño asistido por computador, es decir corresponde al "plano o modelo" del tejido humano u órgano en 3D, basado en el uso de modalidades de imágenes clínicas (como Tomografías) y softwares especiales de prototipado rápido [77,78]. Esto genera lo que se conoce como *Blueprint* que no es más que el archivo STL que conforma la instrucción real para el *bioprinter* robótico y manda hasta ese equipo las instrucciones de cómo imprimir o construir un tejido 3D. Esta es una etapa fundamental, ya que no es posible la bio-impresión de órganos y tejidos humanos sin el desarrollo de estos "planos o modelos" basados en CAD, como lo muestra la

figura 25.

Es por eso, que la realización de la tecnología de prototipado rápido es imposible sin las herramientas computacionales, la informática y el software correspondiente. La adquisición de imágenes clínicas utilizando modernas técnicas de imagenología, tomografías, resonancia magnética, etc., y transformándolas en diseño asistido por computador (CAD) y archivos STL generados son pasos realmente importantes y esenciales en el proceso de *Bioprinting*. Los modelos matemáticos podrían también ser utilizado para la cinética de predicción de la siembra de células, el crecimiento de tejido, la oxigenación y la vascularización en las construcciones de tejidos usando *Bioprinting* [82, 83].

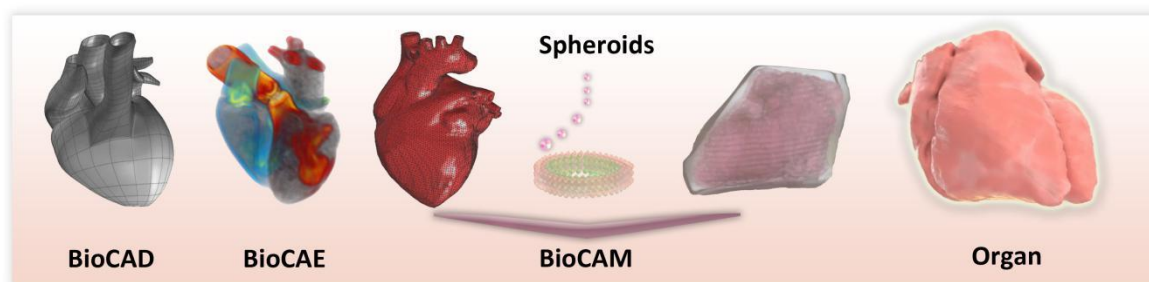


Figura 25. Del “plano o modelado” a las estructuras finales. Donde se plantea el uso de microparticulas (denominadas *spheroids*) que son colocadas por capas.

Etapa de Procesamiento

El procesamiento o el *Bioprinting* robótica (como tal) asistido por computador incluyen la preparación de la “*bioink*” tinta o esferoide que es una micro estructura de tejido auto-ensamblado; el desarrollo del “*bio-paper*” o hidrogel procesable y biocompatible; y el uso de “*bioprinter* robótico” que no es más que un dispensador robótico de alta precisión y controlado por un computador. Ya hay varios *bioprinters* 3D disponibles en el mercado y dispensador de robótica. El centro de tecnología CTI en Campinas (Sao Paulo – Brazil) cuenta con el equipo BIOFAB@CTI que es una bio-impresora 3D [84] que puede ser usada para estos fines.

Etapa de Post-procesamiento

El resultado inmediato de la técnica de *Bioprinting* no es el órgano funcional y viable [84]. Es importante darse cuenta de que se necesita de tiempo para que estos esferoides del tejido bio-impreso se fusionen y el tejido bio-impreso se compacte, remodele y madure, con la finalidad de tener entonces estructuras que correspondan a tejidos (neonatos) funcionales [86]. Es decir, con el fin de convertir estas estructuras bio-impresas en un tejido funcional o en un órgano adecuado para su implantación clínica en el cuerpo humano deberá efectuarse un proceso de fusión de tejidos, activación del proceso de remodelación tisular y la maduración del tejido funcional. Este proceso debe realizarse en cámara de perfusión diseñado especialmente o que son conocidos como “bioreactores”; y el tiempo que precisa para que esto ocurra es relativamente corto tiempo (requiere de días o semanas, no de meses). En un Bioreactor de perfusión basado en “la maduración acelerada del tejido” requiere de una monitorización no invasiva y no destructiva de la maduración del tejido bio-

impreso [87]. Esta etapa de post-procesamiento es probablemente el paso más esencialmente crucial en la tecnología de impresión de órganos, y para que este post-procesamiento sea eficaz así como la maduración de un tejido acelerado requerirá del desarrollo de nuevos tipos de bioreactores, de tecnologías de maduración de tejidos más eficientes, así como de métodos no-invasivos y un biomonitoreo no destructivo. Es por eso, que a pesar de que se hacen esfuerzos en este tipo de tecnología desde la última década, aun son muchos los retos que se deben vencer para poder garantizar el desarrollo de un tejido u órgano artificial a partir de esta novedosa tecnología.

2. CONCLUSIONES

Para satisfacer las necesidades de diversos tejidos en cuanto a sus procesos de reconstrucción y reemplazo, diversas estrategias de ingeniería han intentado proporcionar de manera artificial, soluciones biológicas permanentes.

Como componentes claves de cualquier aplicación de la ingeniería de tejidos, los andamios requieren para garantizar su biocompatibilidad de una alta porosidad, tamaño de poros e interconectividad, superficie o topografía y características químicas adecuadas para que ocurra la adhesión, proliferación y migración celular, así como también la difusión de nutrientes y vascularización. También requieren que sean biodegradables y con una buena integridad mecánica temporal.

La técnica de procesamiento de andamios que sea seleccionada puede tener un profundo efecto sobre las propiedades finales y la geometría de los andamios. Los esquemas de fabricación en esta revisión y su desarrollo en el tiempo ofrecen una solución práctica y prometedora para la fabricación de andamios que puedan reparar y regenerar diferentes tipos de tejidos (duro, suave, elástico,

etc.). Cada método presenta sus ventajas distintivas (por ejemplo la facilidad de procesamiento, la capacidad de incorporar moléculas bioactivas, o el aumento de las propiedades estructurales, entre otras) y sus limitaciones (ejemplo algunos polímeros son mejores para una técnica u otra, el uso de biopolímeros que a veces ofrecen buena biocompatibilidad, pero son difíciles de procesar y no presentan las mejores propiedades mecánicas, la posible presencia de restos de disolventes orgánicos, equipos sofisticados requeridos, y los costos, etc.). Por lo tanto no existe una técnica universal para la fabricación de andamios y para todas las aplicaciones de ingeniería de tejidos. Dependiendo del tipo de tejido y el grado de daño del tejido, del proceso de regeneración, y las propiedades del andamio se deben priorizar con el fin de seleccionar el método de fabricación y material más adecuado. En la actualidad, los "ingenieros de tejidos" y otros profesionales, dado el carácter multidisciplinario de esta interesante área, están trabajando para incorporar a los andamios moléculas bioactivas, fármacos y también el gran reto de incorporar líneas celulares durante el proceso de fabricación. El reto siempre ha sido también desarrollar materiales inteligentes y producir estructuras con propiedades mecánicas que coincidan con la de un tejido específico, y de esa manera mejorar el tiempo de producción y por tanto sus costos. Los hidrogeles se presentan además como otro tipo de estructura tridimensional porosa y con carácter blando que puede ayudar a los procesos regenerativos de ciertos tejidos. Actualmente, respecto a las técnicas de Bioimpresión, se están dedicando esfuerzos para poder entender y biomimetizar la generación de órganos artificiales, pero todavía no se tienen resultados contundentes, dado que no solo implica la generación de una estructura soporte sino que esta cumpla con las funciones metabólicas y fisiológicas características de cada órgano.

Finalmente, estas tecnologías y procedimientos aquí considerados van a permitir obtener esas interesantes estructuras 3D cuyo objetivo final es ayudar a que haya una integración tejido-implante, durante el proceso de regeneración, y mejorando considerablemente la biofuncionabilidad y biocompatibilidad del mismo.

3. AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo quieren agradecer a varias instituciones y personas relacionadas con

todos y cada uno de los resultados mostrados en este artículo de revisión.

Universidad Simón Bolívar (USB): GPUSB 1, Lab Superficies del Lab E, Lab de Alta Tensión, Grupo B5IDA, Departamento de Química, Decanato de Estudios de Postgrado, Decanato de Investigación, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM), Departamento de Química. División de Tecnologías Tridimensionales DT-3D, Centro de Tecnología e Informação CTI (Campinas-SP, Brasil). FAPESP Proceso: 2012/19302-4. Programa PCI/CTI, Processo Institucional CNPq 454796/2015-3, Processo da Bolsa: 170137/2016-3, CNPq *Regenerative Medicine project* 467643/2014-8 y *The Brazilian Institute of Biofabrication* (INCT-BIOFABRIS) 2008/57860-3.

4. REFERENCIAS

- [1]. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Principles of tissue engineering. Academic press Elsevier, NY, 3rd edition., 2007, Cap 1,4 y 5.
- [2]. Johnna S. Temeno, Antonios G. Mikos. Biomaterials. 2000; 21: 431-440.
- [3]. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. Polymer Degradation and Stability. 2010; 95: 2126-2146.
- [4]. Healy KE, Guldberg RE. J. Musculoskelet Neuronal Interact. 2007; 7(4): 328-330.
- [5]. Mansbridge J. J. of Biomaterials Science. 2008; 19: 955-968.
- [6]. Chang CH, Lin FH, Kuo TF, Liu HC. Biomedical Eng. App., Basis & Communications. 2005; 17:61-71.
- [7]. Walker JL, Santoro M. Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications. 2017 (January); pp 181–203.
- [8]. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Trends in Biotechnology. 2003; 21: 157-161.
- [9]. Korossis SA, Bolland F, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Topics in Tissue Engineering. 2005; Eds. N. Ashammakhi & R.L. Reis. pp 1-23.
- [10]. Norman JJ, Desai TA. Annals of Biomedical Eng. 2006; 34(1): 89–101.
- [11]. Yang XB, Bhatnagar RS, Li S, Oreffo ROC. Tissue Engineering. 2004; 10(7-8): 1148-1159.
- [12]. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Acta Biomaterialia. 2009; 5:1–13.
- [13]. Naira LS, Laurencin CT. Prog. Polym. Sci. 2007; 32:762–798.
- [14]. Van Vlierberghe S, Dubrue P, Schacht E.

- Biomacromolecules. 2011; 12 (5):1387–1408.
- [15]. Tessmar JK, Göpferich AM. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59: 274–291.
- [16]. Chua CK, Leong KF, Tan KH, Wiria FE, Cheah CM. *J. of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004; 15(10):1113–1121.
- [17]. Silva SS, Luna SM, Gomes ME, Benesch J, Pashkuleva I, Mano JF, Reis RL. *Macromol. Biosci*. 2008; 8:568–576.
- [18]. Kim TG, Park TG. *Tissue Engineering*. 2006; 12: 221–233.
- [19]. Iohara K, Fujita M, Aiji Y, Yoshikawa M, Watanabe H, Takashima A, Nakashima M. *J. of Endodontics*. 2016; 42(3): 397–401.
- [20]. Gerhardt LC, Boccaccini AR. *Materials*. 2010; 3: 3867–3910.
- [21]. Alvarez K, Nakajima H. *Materials*. 2009; 2: 790–832.
- [22]. Moon JH, Yang Sh. *Chem. Rev.* 2010; 110 (1): 547–574.
- [23]. Pietrucha K. *Int. Journal of Biological Macromolecules*. 2005; 36: 299–304.
- [24]. Porter MM, Imperio R, Wen M, Meyers MA, McKittrick J. *Advanced Functional Materials*. 2014; 24: 1978–1987.
- [25]. Grafahrend D, Heffels KH, Beer MV, Gasteier P, Möller M, Boehm G, Dalton PD, Groll J. *Nature Materials*. 2011; 10: 67–73.
- [26]. Butler MS, Buss AD. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 71: 919–929.
- [27]. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59: 207–233.
- [28]. Serra T, Planell JA, Navarro M. *Acta Biomaterialia*. 2013; 9: 5521–5530.
- [29]. Hollister SJ. *Advanced Materials*. 2009; 21(32–33): 3330–3342.
- [30]. Brito Y, Sabino MA, Ronca G, Müller AJ. *J. of Applied Polymer Science*. 2008; 110: 3848–3858.
- [31]. Caruso AB, Dunn MG. *J. of Biomedical Materials Research*. 2005; 73A (4): 388–397.
- [32]. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. *Int. J. Mol. Sci*. 2014; 15(3): 3640–3659.
- [33]. Zhao Q, Dunlop JWC, Qiu X, Huang F, Zhang Z, Heyda J, Dzubiella J, Antonietti M, Yuan J. *Nature Communications*. 2014; 5: 4293–4300.
- [34]. Kim B-S, Mooney DJ. *J. Biomed. Mater. Res*. 1998; 41: 322–332.
- [35]. Sabino MA, Albuérne J, Müller AJ, Brisson J, Prud'homme RE. *Biomacromolecules*. 2004; 5(2): 358–370.
- [36]. Loaiza MC, Bobadilla M, Müller AJ, Sabino MA. *Rev. LatinAm. Metal. Mat*. 2009; S2: 131–132.
- [37]. Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ. *Biomaterials*. 2003; 24: 181–194.
- [38]. Chaim IA, Sabino MA, Mendt M, Müller AJ, Ajami-H D. *J. of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2012; 6(4): 272–279.
- [39]. Salazar JR, Arias V, Sabino MA. *Rev. LatinAm. Metal. Mat*. 2011; S3: 20–21.
- [40]. Kim B-S, Mooney DJ. *Trends in Biotechnology*. 1998; 6(5): 224–230.
- [41]. Harris LD, Kim B-S, Mooney DJ. *J. Biomed Mater Res*. 1998; 42: 396–402.
- [42]. Thomson RC, Wake MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. *Advances in Polymer Science*. 2005; (122): 245–274.
- [43]. Widmer MS, Gupta PK, Lu L, Meszlenyi RK, Evans GRD, Brandt K, Savel T, Gurlek A, Patrick Jr. CW, Mikos AG. *Biomaterials*. 1998; 19: 1945–1955.
- [44]. Formhals A, Richard SG. US 1975504 A Patent: Process and apparatus for preparing artificial threads; 1934.
- [45]. Ahmed FE, Lalia BS, Hashaikeh R. *Desalination*. 2015; 356: 15–30.
- [46]. Valencia J, Rajesh DA, Malik M. *J. of Applied Polymer Science*. 2010; 115: 3130–3136.
- [47]. Hidalgo IA, Sojo F, Arvelo F, Sabino MA. *Molecular and Cellular Biomechanics*. 2013;10(2): 85–105.
- [48]. Cardozo C, Sabino MA, Ramírez J, Rodríguez JC, Martínez M. II Congreso Venezolano de Redes y Energía; 2009.
- [49]. Salazar JR, Hidalgo IA, Sabino MA. *Rev. LatinAm. Metal. Mat*. 2014; S6: 23–24.
- [50]. Kim JY, Jin G-Z, Park IS, Kim J-N, Chun SY, Park EK, Kim S-Y, Yoo J, Kim S-H, Rhie J-W, Cho D-W. *Tissue Engineering Part A*. 2010; 16(7): 2229–2236.
- [51]. Webb PA. *J. of Medical Engineering & Technology*. 2000; 24(4): 149–153.
- [52]. Yeong W-Y, Chua C-K, Leong K-F, Chandrasekaran M. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22(12): 643–652.
- [53]. Van Krevelen DWF, Poelman R. *The International Journal of Virtual Reality*. 2010; 9(2):1–20.
- [54]. Rezende RA, Pereira FDAS, Kemmoku BDT, Da Silva JVL, Mironov V, Kasyanov V, Vilbrandt T. *Innovative Developments in Virtual and Physical Prototyping: Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Research in Virtual and*

- Rapid Prototyping, Leiria, Portugal. 2011; pp: 121.
- [55]. Rengier F, Mehndiratta A, von Tengg-Koblighk H, Zechmann CM, Unterhinninghofen R, Kauczor H-U, Giese FL. *Int. J. of Computer Assisted Radiology and Surgery*. 2010; 5(4): 335-341.
- [56]. Choi SH, Cheung HH. *Computers in Industry*. 2008; 59: 477-488.
- [57]. Kruth JP, Wang X, Laoui T, Froyen L. *Assembly Automation*. 2003; 23(4): 357-371
- [58]. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. *Biomaterials*. 2010; 31: 6121-6130.
- [59]. Bartolo PJ, Mitchell G. *Rapid Prototyping Journal*. 2003. 9(3):150-156.
- [60]. Wimpenny DI, Bryden B, Pashby IR. *J. of Materials Processing Technology*. 2003; 138: 214-218.
- [61]. Liska R, Schuster M, Inführ R, Turecek C, Fritscher C, Seidl B, Schmidt V, Kuna L, Haase A, Varga F, Lichtenegger H, Stampfl J. *J. of Coatings Techn. & Res*. 2007; 4(4): 505-510.
- [62]. Zhang X, Zhou B, Zeng Y, Gu P. *Robotics and Computer Integrated Manufact.* 2002; 18: 41-51.
- [63]. Michaeli W, Frings W, Höcker H, Berghaus U. *Int. Polymer Processing*. 1993; 8(4): 308-318.
- [64]. Domingos M, Chiellini F, Gloria A, Ambrosio A, Bartolo PJ, Chiellini E. *Rapid Prototyping Journal*. 2013; 18(1): 56-67.
- [65]. Loaiza MC, Rezende RA, Da Silva JVL, Bartolo PJ, Sabino MA. *High Value Manufacturing: Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*. Eds Bártolo et.al. Taylor & Francis Group. UK ISBN: 978-1-138-00137-4.; 2014; pp: 183-187.
- [66]. Sood AK, Ohdar RK, Mahapatra SS. *Materials and Design*. 2009; 30: 4243-4252.
- [67]. Ahn S-H, Montero M, Odell D, Roundy Sh, Wright PK. *Rapid Prototyping Journal*. 2002; 8(4): 248 -257.
- [68]. Ozan O, Turkyilmaz I, Ersoy AE, McGlumphy EA, Rosenstiel SF. *J. of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009; 67(2): 394-401.
- [69]. Rezende RA, Sabino MA, Vladimir K, Baptista LS, Silva KR, Noritomi PY, Pereira FDAS, Wen X, Da Silva JVL, Mironov V. *The International Conference on Bioprinting, El Paso-Texas USA*, 2013.
- [70]. Coronado R, Pekerar S, Lorenzo AT, Sabino MA. *Polymer Bulletin*. 2011; 67(1): 101-124.
- [71]. Peñaranda J, Sabino MA. *Polymer Bulletin*. 2010; 65(5): 495-508.
- [72]. González N, Prin JL, Benítez JL, Ramírez A, García A, Ramírez M, Sabino MA, Rojas de Gáscue B. *Rev. LatinAm. Metal. Mat*. 2012; 32(1): 136-144.
- [73]. Gadea JL, Cesteros LC, Katime I. *European Polymer Journal*. 2013; 49: 3582-3589.
- [74]. Benoit DSW, Schwartz MP, Durney AR, Anset KS. *Nature Materials*. 2008; 7: 816-823.
- [75]. White EM, Yatvin J, Grubbs III JB, Bilbrey JA, Locklin J. *J. of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. 2013; 51: 1084-1099.
- [76]. Vieira JN, Posada JJ, Rezende RA, Sabino MA. *Materials Science and Eng C*. 2014; 37: 20-27.
- [77]. Mironov V, Reis N, Der B. *Tissue Engineering*. 2006; 12(4): 631-634.
- [78]. Rezende RA, Kasyanov V, Mironov V, Da Silva JVL. *Procedia Engineering*. 2015; 110: 151-158.
- [79]. Ma Y, Ji Y, Huang G, Ling K, Zhang X, Xu F. *Biofabrication*. 2015; 7(4): 044105.
- [80]. Sheehan T, Mironov V, Kasyanov V, R-Markwald R. *Recent Patents on Biomedical Engineering*. 2011; 4(1): 26-32.
- [81]. Rezende RA, Pereira FDAS, Kasyanov V, Kemmoku DT, Maia I, Da Silva JVL, Mironov V. *Procedia CIRP*. 2013; 5: 276-281.
- [82]. Murphy SV, Atala A. *Nature Biotechnology*. 2014; 32:773-785.
- [83]. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, Bareille R, Rémy M, Bordenave L, Amédée J, Guillemot F. *Biomaterials*. 2010; 31: 7250-7256.
- [84]. Rezende RA, Nogueira JA, Pereira FDAS, Mironov V, Da Silva JVL. *Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais COLAOB. Brasil*, 2012.
- [85]. Guillotin B, Guillemot F. *Trends in Biotechnology*. 2011; 29(4): 183-190.
- [86]. Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA, Lewis JA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113(12): 201521342.
- [87]. Ozturk MS, Lee VK, Zhao L, Dai G, Intes X. J. *Biomed. Opt*. 2013; 18(10):100501.