

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
DE *SCAFFOLDS* POLIMÉRICOS
PARA LA INGENIERÍA
DE TEJIDOS**

LAURA SANTOS ESTEVE

VNIVERSITAT Ò DE VALÈNCIA

[] **Escola Tècnica Superior d'Enginyeria**

Departament d'Enginyeria Química



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SCAFFOLDS POLIMÉRICOS PARA LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Programa de doctorado: Ingeniería Química, Ambiental y de Procesos

TESIS DOCTORAL

Realizada por:

Laura Santos Esteve

Dirigida por:

Dr. Àngel Berna Prats

València, 2013

Agradecimientos

Durante la realización de esta tesis, he tenido la oportunidad de encontrarme con muchas personas, primero en la Universidad Politécnica de Valencia donde obtuve el Diploma de Estudios Avanzados y posteriormente en la Universidad de Valencia, a las que quiero dar las gracias porque de todas ellas he podido aprender algo.

En primer lugar y de forma muy especial quiero agradecer a mi director, Dr. Àngel Berna, toda la confianza depositada en mi, paciencia durante la redacción de esta tesis, apoyo, ayuda, comprensión y hacer que trabajar con él resulte tan fácil. No tengo suficientes palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí. De nuevo le agradezco el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y hacer que mi sueño sea una realidad.

Al departamento de ingeniería química de la Universidad de Valencia (UV) por haberme acogido y haber resultado todo tan sencillo.

Al personal del servicio de microscopia electrónica de la UV, donde se consiguieron interesantes imágenes de los *scaffolds*, porque me ofrecieron su ayuda y consejo.

Al personal de secretaria del departamento de ingeniería química de la UV por su disponibilidad y ayuda en todos los trámites administrativos a lo largo de esta tesis.

A los técnicos de laboratorio del departamento de ingeniería química de la UV por estar siempre disponibles para facilitarme todo el material que necesitaba para realizar la parte experimental incluso cuando estaban desbordados de trabajo por el traslado.

Al grupo de investigación del laboratorio de aguas del departamento de ingeniería química de la UV que desinteresadamente me permitieron utilizar el material de este laboratorio y a todos los compañeros con los que he coincidido en este laboratorio por el trato recibido.

A la Dra. M^a Luz Cardona departamento de química orgánica de la UV, al Dr. Ernesto Simó del departamento de química analítica de la UV y al Dr. Rafael Borrás del departamento de microbiología y ecología de la UV por su amabilidad y generosidad al dejarnos material para realizar parte de los experimentos de esta tesis y así no tener que esperar durante mucho para realizarlos.

A la Dra. Marta Ibisate, al Dr. Claudio Jiménez, al Dr. Douglas Laurents y al Dr. Riyad Insanally por su apoyo. Al Dr. Florencio García por las conversaciones científicas tan interesantes del mundo de los ópalos. Al Dr. Hossein Hosseinkhani

por acogerme durante mi estancia en Japón. A la Dra. Amparo Cotolí y a la Dra. Teresa Gacerà por sus consejos y orientaciones. A la Dra. Marina Santos por su ayuda, ideas y consejos para la siguiente etapa a esta tesis. Especialmente quiero agradecer al profesor Milton Aravena por aconsejarme, creer en mí, apoyarme, además de compartir sus conocimientos sobre química orgánica.

A los doctores M^a Luisa Morales, Luis Olcina, M^a Dolores Pinazo, Silvestre Belenguer, Raúl García, Luis Pérez y Miguel Verdeguer por el interés mostrado en mi trabajo y lo que de ellos he podido aprender de medicina.

A Eugenia Borrás y Richard Campbell por estar siempre dispuestos a ayudar en las revisiones finales de los textos en inglés, a Elena Diez por sus sugerencias para el diseño del último póster y a Miguel Martínez por la realización de la portada de esta tesis.

Muchísimas gracias a todos

*Als meus pares,
Jesús i Maria*

ÍNDICE

Índice General

Resumen	15
Lista de figuras	33
Lista de tablas	47
1 Introducción	49
1.1 Ingeniería de tejidos	51
1.1.1 Fundamentos de la ingeniería de tejidos	51
1.1.1.1 Historia, definiciones y aplicaciones	51
1.1.1.2 Estrategias de la ingeniería de tejidos	56
1.1.1.2.1 Células	61
1.1.1.2.2 <i>Scaffolds</i>	63
1.1.1.2.3 Factores microambientales	64
1.1.2 Biomateriales.....	66
1.1.2.1 Definiciones	66
1.1.2.2 Generaciones de biomateriales	68
1.1.2.3 Clases de materiales	71
1.1.2.3.1 Polímeros	75
1.1.3 Diseño de los <i>scaffolds</i>	80
1.1.4 Métodos de fabricación de <i>scaffolds</i> poliméricos	91
1.1.4.1 Métodos convencionales de fabricación de <i>scaffolds</i>	92
1.1.4.1.1 Unión de fibras	92
1.1.4.1.2 Colado de sólidos en combinación con el	
lixiviado de partículas	94
1.1.4.1.3 Laminación de membranas	95
1.1.4.1.4 Espumado gaseoso	96
1.1.4.1.5 Separación de fases	97
1.1.4.1.6 Liofilización	100
1.1.4.2 Métodos de prototipado rápido de fabricación de	
<i>scaffolds</i>	101
1.1.4.2.1 Impresión tridimensional (3D-P)	102

1.1.4.2.2 Modelado por deposición en fundido (FDM)	104
1.1.4.2.3 Sinterización láser selectiva (SLS)	106
1.1.5.- Bibliografía	109
1.2 Objetivos	124
2 Nueva arquitectura fabricada con polímeros biocompatibles	127
2.1 Introducción	129
2.2 Materiales y métodos	134
2.2.1 Materiales	134
2.2.2 Métodos	135
2.2.2.1 Fabricación del <i>template</i> porogénico 3D	135
2.2.2.1.1 Primer procedimiento: obtención del <i>template</i> en un paso	135
2.2.2.1.2 Segundo procedimiento: obtención del <i>template</i> en dos pasos	135
2.2.2.2 Fabricación de los <i>scaffolds</i>	137
2.2.2.3 Porosidad	139
2.2.2.3.1 Porosidad de los <i>scaffolds</i>	139
i) Infiltración de líquido en los <i>scaffolds</i>	139
ii) Inmersión de los <i>scaffolds</i>	140
2.2.2.3.2 Porosidad de la tela	141
2.2.2.4 Propiedades mecánicas	141
2.2.2.5 Morfología	141
2.2.2.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	141
2.3 Resultados y discusión	142
2.3.1 Desarrollo del método y su influencia sobre la morfología	142
2.3.2 Porosidad	157
2.3.2.1 Porosidad de la tela de nylon	157
2.3.2.2 Porosidad del <i>scaffold</i> obtenido según el procedimiento 2.2.2.1.1	157
2.3.2.3 Porosidad del <i>scaffold</i> de PMMA- <i>i</i> -PMMA obtenido según el procedimiento 2.2.2.1.2	157

2.3.3 Propiedades mecánicas del <i>scaffold</i> fabricado a partir del <i>template</i> producido según el primer procedimiento (2.2.2.1.1)	159
2.4 Conclusiones	161
2.5 Recomendaciones	162
2.6 Bibliografía	163
3 Microestructuras tubulares con macroestructuras laminares o cilíndricas	169
3.1 Introducción	171
3.2 Materiales y métodos	175
3.2.1 Materiales	175
3.2.2 Métodos	178
3.2.2.1 Fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de tela ...	178
3.2.2.2 Fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de filamentos	180
3.2.2.3 Fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de filamentos sinterizados en atmósfera de disolvente .	183
3.2.2.4 Porosidad	183
3.2.2.4.1 Inmersión de los <i>scaffolds</i>	184
3.2.2.4.2 Inmersión de la muestra antes de eliminar el <i>template</i>	185
3.2.2.4.3 Medidas de masa y dimensiones	185
3.2.2.4.4 Análisis de imagen	186
3.2.2.5 Morfología	186
3.2.2.6 Medidas de hinchamiento (<i>Swelling</i>)	186
3.3 Resultados y discusión	187
3.3.1 Desarrollo del método y su influencia sobre la morfología	187
3.3.1.1 Fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de tela ...	188
3.3.1.2 Fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de filamentos (monofilamento y multifilamento)	191
3.3.1.3 Fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de filamentos (monofilamentos) sinterizados en	

atmósfera de disolvente	198
3.3.2 Porosidad	202
3.3.2.1 Porosidad de los <i>scaffolds</i> para las muestras obtenidas según el método 3.2.2.1 (fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de tela)	202
i) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.1 (inmersión de los <i>scaffolds</i>)	202
ii) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.2 (inmersión de la muestra antes de eliminar el <i>template</i>).....	202
3.3.2.2 Porosidad de los <i>scaffolds</i> para las muestras obtenidas según el método 3.2.2.2 (fabricación de <i>scaffolds</i> 3D con <i>templates</i> de filamentos).....	203
i) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.1 (inmersión de los <i>scaffolds</i>).....	203
ii) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.2 (inmersión de la muestra antes de eliminar el <i>template</i>).....	203
iii) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.3 (medidas de masa y dimensiones).....	205
iv) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.4 (análisis de imagen).....	205
3.3.3 Medidas de hinchamiento (<i>Swelling</i>)	208
3.4 Conclusiones	211
3.5 Recomendaciones	213
3.6 Bibliografía	215
4 Scaffolds biodegradables con un nuevo diseño arquitectónico ..	221
4.1 Introducción	223
4.2 Materiales y métodos	225
4.2.1 Materiales	225
4.2.2 Métodos.....	226
4.2.2.1 Fabricación del <i>template</i> tridimensional	226

4.2.2.2	Fabricación de los <i>scaffolds</i> y films de quitosano	226
4.2.2.3	Fabricación de los <i>scaffolds</i> y films de gelatina	227
4.2.2.4	Fabricación de los <i>scaffolds</i> y films de agarosa	228
4.2.2.5	Porosidad	228
4.2.2.5.1	Inmersión de los <i>scaffolds</i>	229
4.2.2.6	Morfología	229
4.3	Resultados y discusión	230
4.3.1	Desarrollo del método	230
4.3.2	Morfología de los <i>scaffolds</i> de quitosano	235
4.3.3	Morfología de los <i>scaffolds</i> de gelatina	243
4.3.4	Morfología de los <i>scaffolds</i> de agarosa	250
4.3.5	Porosidad de los <i>scaffolds</i>	255
4.4	Conclusiones	257
4.5	Recomendaciones	258
4.6	Bibliografía	260
5	Conclusiones generales	267
6	Apéndices.....	273
6.1	Seguridad	275
6.2	Símbolos	276
6.3	Acrónimos	277
6.4	DEA	279

Resumen

El desarrollo del campo de la Ingeniería de Tejidos (IT) surge ante la necesidad de dar solución a las deficiencias asociadas a la sustitución de tejidos (rechazos, escasez de donantes de tejidos, etc) cuando se han producido pérdidas irreparables de los mismos o no funcionan correctamente ya sea por lesiones traumáticas o enfermedades. El objetivo de esta disciplina es evitar los problemas anteriormente mencionados mediante la creación de sustitutos biológicos capaces de reemplazar el tejido dañado. Las estrategias de la IT para crear tejidos funcionales se fundamentan en la utilización de células, y/o *scaffolds* y factores microambientales. Aunque se han desarrollado productos mediante la terapia con células, muchos tipos de células necesitan *scaffolds* para guiar el desarrollo de nuevos tejidos con la función apropiada, servir como sustrato para la adhesión celular y al mismo tiempo proporcionar un soporte mecánico para el nuevo tejido que ha crecido.

Los *scaffolds* son biomateriales sólidos porosos tridimensionales que intentan imitar a la matriz extracelular nativa (ECM). Entre los desafíos de la IT se incluyen el diseño y la fabricación de los *scaffolds*. Este trabajo se propone aportar nuevos procedimientos y estructuras para la fabricación de estos materiales.

El diseño de los *scaffolds* dependiendo de las aplicaciones consideradas debe reunir diferentes características, pero una red de poros bien interconectados es necesaria para la mayoría de las aplicaciones de la ingeniería de tejidos con el fin de lograr un mejor transporte de nutrientes y facilitar la migración celular. También se suele requerir una porosidad elevada y una relación área superficial/volumen alta para el anclaje celular y el crecimiento de neo-tejidos así como para un transporte uniforme de células. Parámetros arquitectónicos de los poros tales como la geometría, el tamaño, la interconectividad, la orientación y la distribución también son importantes para el cultivo celular, el transporte de masa, la formación de tejido en tres dimensiones y las propiedades mecánicas teniendo en cuenta que las estructuras deben ser procesables fácilmente en estructuras tridimensionales.

Los *scaffolds* producidos mediante las técnicas convencionales son muy prometedores y han sido aplicados a una variedad de tejidos con un éxito variable. Sin embargo, según la literatura, los métodos convencionales ofrecen poca capacidad para controlar el tamaño, geometría, interconectividad y distribución espacial de los poros. Además, ninguna de las técnicas convencionales ha permitido construir *scaffolds* con una morfología altamente regular. Así, el prototipado rápido (RP) se ha visto como una alternativa viable

para lograr el control sobre la arquitectura del *scaffold*. Sin embargo, esta técnica ofrece una resolución limitada a escala micrométrica. Además el tamaño mínimo de los poros globales es de 100 μm .

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar métodos de síntesis de *scaffolds* poliméricos, basados en las técnicas convencionales, que permitan obtener nuevos diseños arquitectónicos con el objeto de utilizarlos en aplicaciones de la IT ya sea en el cultivo de tejidos o como una herramienta para estudios básicos de las interacciones entre las células o tejidos y el *scaffold* con el fin de desarrollar *scaffolds* óptimos para la IT. Específicamente, los objetivos de este trabajo son:

1.- Desarrollar el método convencional denominado colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas para:

a.- Obtener *scaffolds* con una morfología altamente regular con poros alineados e interconectados (Capítulo 2).

b.- Obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales tubulares abiertos orientados longitudinalmente con arquitecturas laminares y cilíndricas así como estructuras laminares con poros en forma de canales interconectados entre las capas. Sintetizarlos con diferentes estructuras macromoleculares (redes e IPN's), así como copolímeros con distintas relaciones hidrófilo/hidrófobo (Capítulo 3).

c.- Obtener una nueva estructura porosa interconectada en la que se puedan obtener *microscaffolds* dentro de los macroporos del *scaffold* (Capítulo 4).

d.- Obtener *scaffolds* que muestren un gradiente de porosidad (Capítulo 4).

2.- Caracterizar los *scaffolds* obtenidos.

Para obtener una estructura altamente regular con poros alineados e interconectados, es decir objetivo 1a), se partió de una estructura regular. Concretamente, tela de poliamida 6,6 (nylon). Con el objeto de obtener *scaffolds* con un grosor mayor, se procedió a ensamblarlas constituyendo este ensamblaje un *template*. La utilización de este *template* daría lugar a estructuras no interconectadas. Sin embargo, el problema de la interconexión se puede resolver formando un ensamblaje unitario, es decir que cada una de las capas de tela apiladas estén conectadas formando uniones efectivas, mediante la sinterización con temperatura. Se determinó el programa de sinterización, que consistió en una isoterma a 220°C durante 10 min, y posteriormente se comprobó mediante DSC que el programa de sinterización determinado produce la unión firme entre las láminas probablemente debido a un proceso que implica la fusión de

pequeños cristales y la recristalización de fibras individuales en contacto unas con otras ya que se aprecia un pequeño pico endotérmico entre 225-245°C, previo a la zona de fusión del material (260°C), creado probablemente en el paso isoterma del tratamiento ya que este pico endotérmico está ausente en el termograma de la tela de nylon comercial.

Una vez determinado el programa de sinterización se desarrollaron dos procedimientos para la obtención del *template*. En el primer procedimiento se obtuvo el *template* directamente mediante el proceso de sinterización tal como se ha descrito anteriormente, mientras que en el segundo procedimiento antes de proceder con la sinterización térmica de las telas de nylon apiladas, éstas se comprimieron a 180°C con diferentes condiciones de tiempo y presión con el objeto de evaluar la influencia de estos parámetros en el proceso de síntesis de los *scaffolds* en el grosor del *scaffold*, la morfología de los poros y la porosidad. Se eligió 180°C con el objeto de que se produjera una deformación permanente de las telas de nylon apiladas ya que ésta es mucho mayor que la T_g del nylon.

Una vez obtenido el *template*, se colocó en un molde (placas). Cantidades apropiadas, de una mezcla líquida homogénea, de monómero(s), agente entrecruzador e iniciador térmico radicalario se vertieron en el molde y se polimerizó obteniéndose una red polimérica. Concluido el proceso de polimerización se eliminó el *template* porogénico con ácido nítrico. Alternativamente, para la obtención de redes interpenetradas (IPN's), la red polimérica junto con el *template* se dejó en reposo con la mezcla líquida homogénea y posteriormente se polimerizó. Seguidamente se eliminó el *template* porogénico con ácido nítrico.

Los monómeros utilizados para la obtención de los *scaffolds* pertenecen a la familia de los acrilatos y metacrilatos. Concretamente, se han utilizado como monómeros el acrilato de etilo (EA), metacrilato de metilo (MMA), metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) como entrecruzador, que polimerizados dan lugar a polímeros bioestables. Estos polímeros bioestables son biocompatibles y se utilizan actualmente en diversas aplicaciones biomédicas. Se ha sintetizado esta estructura con PMMA, PEA y copolímeros con distintas composiciones de PEA-co-PHEMA, ya que se trata de polímeros con características distintas, con estructuras macromoleculares de red polimérica y homoIPN's (con el objeto de poder reforzar la estructura).

Los *scaffolds* se han caracterizado morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), densimetrías (porosidad total) y se eligió el *scaffold* de PMMA según el primer procedimiento para estudiar sus propiedades mecánicas (DMTA).

Los dos procedimientos revelaron que son factibles para obtener *scaffolds* con estructuras muy ordenadas. Se han obtenido *scaffolds* con canales

cilíndricos ortogonales alineados paralelamente con una conectividad controlada, que se obtiene por la sinterización de las telas de nylon. La porosidad y la morfología del poro se pueden variar aplicando el segundo procedimiento, es decir aplicando presión.

Por otra parte, para obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales tubulares abiertos orientados longitudinalmente sin interconexión (objetivo 1b) con una estructura externa en forma de lámina se procedió de forma similar a la descrita en el objetivo 1a, a diferencia de que se partió de un *template* que consistió en telas de poliacrilonitrilo (PAN), con un diámetro de monofilamento de la hebra de aproximadamente 11 μm , que no se sinterizaron, y posteriormente se eliminó el *template* con N,N-Dimetilformamida (DMF). Por otra parte, para la obtención de *scaffolds* con una estructura externa cilíndrica, se partió de dos *templates* diferentes, monofilamentos y hebras de PAN, con un diámetro de monofilamento de aproximadamente 42 y 14 μm respectivamente. Se desarrollaron dos procedimientos, uno para los monofilamentos y otro para las hebras. Los monofilamentos se agruparon en un haz, que se introdujo en un tubo cilíndrico de vidrio. Entonces, se tensó el haz con el fin de que los monofilamentos quedaran alineados y paralelos. Posteriormente, se selló uno de los extremos del tubo cilíndrico y se llenó a vacío con las cantidades apropiadas, de una mezcla líquida homogénea, de monómero(s), agente entrecruzador e iniciador térmico radicalario. Después, se polimerizó obteniendo una red polimérica. Para la obtención de *scaffolds* reforzados (IPN's), el *scaffold* junto al *template* obtenido en la primera polimerización se introdujo en un tubo cilíndrico de vidrio de mayor diámetro por lo que la fase de hinchamiento estuvo determinada por el diámetro del segundo cilindro utilizado, a diferencia de la estructura laminar que se hincho hasta el equilibrio. Posteriormente se eliminó el *template* con N,N-Dimetilformamida (DMF). Por otra parte, el proceso de obtención del *template* a partir de hebras consistió en recubrir cada una con una disolución saturada de hebras de PAN en DMF. Posteriormente, se dejaron secar a temperatura ambiente con el objetivo de estudiar si la mezcla monomérica podía penetrar entre cada uno de los monofilamentos que constituyen la hebra. Después, se procedió de manera similar a la descrita para los monofilamentos de PAN a diferencia de que la segunda polimerización se realizó en el mismo tubo cilíndrico que la primera polimerización.

Por otra parte, con el objeto de evaluar la viabilidad de los procedimientos y poder obtener estas estructuras con materiales poliméricos con diferentes propiedades físicas y químicas, en el diseño de experimentos se utilizaron monómeros que dan lugar a hidrogeles (PEA-co-PHEMA), con distintas relaciones hidrófilo (PHEMA)/hidrófobo (PEA), y no hidrogeles (PEA y PMMA) con estructuras macromoleculares de red (PEA, PEA-co-PHEMA y PMMA) y de IPN [PEA-*i*-PHEMA, PEA-*i*-(PEA-co-PHEMA), (PEA-co-PHEMA)-*i*-(PEA-co-PHEMA), PMMA-*i*-PMMA y PMMA-*i*-PHEA] con el objeto de reforzar las estructuras.

Para la obtención de estructuras laminares con poros en forma de canales interconectados entre las capas, utilizando como material porogénico PAN, el procedimiento de sinterización térmica (objetivo 1a) no resultó efectivo. Para obtener el *template*, se desarrolló un proceso de sinterización en atmósfera de disolvente, con el objeto de generar una disolución parcial de la superficie de los monofilamentos que pueda producir una unión firme entre éstos. Para preparar el *template* se alinearon monofilamentos de PAN formando una capa. Posteriormente, se prepararon 4 capas más de manera similar y se colocaron sucesivamente una encima de otra de tal forma que los monofilamentos de una capa respecto a otra formasen un ángulo de aproximadamente 90°. Después, el conjunto de las cuatro capas se mojó con una disolución de DMF y se secó con papel de filtro. Posteriormente, se colocó en atmósfera de disolvente (DMF) durante 2 h. Después, se dejó evaporar el disolvente durante 24 h. De esta forma se pretendía conseguir la sinterización de los monofilamentos.

Los *scaffolds* se han caracterizado morfológicamente mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), densimetrías (porosidad total) y medidas de hinchamiento.

Los distintos procedimientos revelaron que son factibles para obtener estructuras porosas. Se han obtenido *scaffolds* con arquitecturas laminares con poros tubulares orientados longitudinalmente tanto abiertos (*template* de tela de PAN) como interconectados (*template* de monofilamentos de PAN sinterizados con atmósfera de disolvente) así como arquitecturas cilíndricas con poros tubulares orientados longitudinalmente abiertos y paralelos (*template* de monofilamentos o hebras de PAN). Estas estructuras se pueden obtener con distintos materiales, estructuras macromoleculares (redes e IPN's), diámetro de poro y rugosidades. La porosidad también se puede modificar variando la cantidad de monofilamentos utilizados para construir el *template* y/o al obtener la IPN.

Por otra parte, para la obtención de una nueva estructura porosa interconectada en la que se puedan obtener *microscaffolds* dentro de los macroporos del *scaffold* (objetivo 1c) así como la obtención de *scaffolds* que muestren un gradiente de porosidad (objetivo 1d), se han utilizado polímeros biodegradables. Concretamente, se ha utilizado quitosano con diferentes concentraciones, gelatina y agarosa. Tanto el quitosano como la gelatina están aprobados por la FDA para diferentes aplicaciones médicas, además de estar disponibles comercialmente mientras que la agarosa es un hidrogel biocompatible que se utiliza en productos cosméticos entre otros.

En este caso, para construir el *template* se llenó una placa Petri con microesferas de PEMA macizas, huecas y huecas rellenas de microesferas más pequeñas y se sinterizaron mediante un proceso que consistió en una isoterma de 130°C durante 65 min. Para la obtención de los *scaffolds* de quitosano, se

disolvieron copos de quitosano en una disolución acuosa de ácido acético 1M para formar disoluciones poliméricas homogéneas al 0.8, 1.5 y 2.9% en peso. Un paralelepípedo obtenido del template tridimensional, se colocó en una placa Petri. Posteriormente, la disolución de quitosano se vertió gota a gota y a temperatura ambiente sobre el template hasta que la placa Petri se llenó con la disolución de quitosano. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente dándoles la vuelta para ayudar a la disolución a que penetrase en la matriz permitiendo que fluyese en el template paralelepipedico por todas las caras externas. Después, la disolución de quitosano junto con el template se secó para eliminar el disolvente. Posteriormente, se eliminó el template porogénico con etanol. Los *scaffolds* de gelatina y agarosa se obtuvieron de forma similar a diferencia del disolvente, temperatura de disolución del polímero, temperatura de infiltración en el template, concentración polimérica, tiempos de secado y de extracción del template con etanol.

Los *scaffolds* se han caracterizado morfológicamente mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y densimetrías (porosidad total).

Mediante el procedimiento desarrollado, se ha obtenido un novedoso diseño de *scaffold* poroso 3D que consiste en *microscaffolds* dentro de algunos poros del *scaffold* con una interconectividad completa. Los *microscaffolds* tienen una estructura de poro bien interconectada y abierta. Por otra parte, se han obtenido *scaffolds* de quitosano con gradiente de porosidad en la dirección longitudinal y transversal utilizando altas concentraciones de quitosano. La porosidad de los *scaffolds* de quitosano obtenidos a partir de soluciones al 0.8, 1.5 y 2.9% en peso varía en un intervalo muy pequeño y es mayor que la de los *scaffolds* de gelatina y agarosa obtenidos en similares condiciones.

Los resultados demuestran la viabilidad de este método para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación de una gran variedad de estructuras y proporcionar nuevas estructuras para su estudio en la ingeniería de tejidos, concretamente los *scaffolds* de quitosano con gradiente de porosidad pueden ser útiles para la regeneración de tejidos nativos que poseen gradientes a través de su volumen espacial como sucede en el hueso, la piel o el cartílago y los *scaffolds* con *microscaffolds* en los poros del *scaffold* tal vez podrían servir como una herramienta para estudios básicos de las interacciones entre las células o tejidos y el *scaffold* con el fin de desarrollar *scaffolds* óptimos para la ingeniería de tejidos.

Resum

El desenvolupament del camp de l'Enginyeria de Teixits (ET) sorgeix davant la necessitat de donar solució a les deficiències associades a la substitució de teixits (rebutjos, escassetat de donants de teixits, etc) quan s'han produït pèrdues irreparables d'aquests o no funcionen correctament ja sigui per lesions traumàtiques o malalties. L'objectiu d'aquesta disciplina és evitar els problemes anteriorment esmentats mitjançant la creació de substituïts biològics capaços de reemplaçar el teixit danyat. Les estratègies de la ET per crear teixits funcionals es fonamenten en la utilització de cèl·lules, i/o *scaffolds* i factors microambientals. Tot i que s'han desenvolupat productes mitjançant la teràpia amb cèl·lules, molts tipus de cèl·lules necessiten *scaffolds* per guiar el desenvolupament de nous teixits amb la funció apropiada, servir com a substrat per l'adhesió cel·lular i alhora proporcionar un suport mecànic per al nou teixit que ha crescut.

Els *scaffolds* són biomaterials sòlids porosos tridimensionals que intenten imitar a la matriu extracel·lular nativa (ECM). Entre els reptes de la ET s'inclouen el disseny i la fabricació dels *scaffolds*. Aquest treball es proposa aportar nous procediments i estructures per a la fabricació d'aquests materials.

El disseny dels *scaffolds* depenent de les aplicacions considerades ha de reunir diferents característiques, però una xarxa de porus ben interconnectats és necessària per a la majoria de les aplicacions de l'enginyeria de teixits per tal d'aconseguir un millor transport de nutrients i facilitar la migració cel·lular. També se sol requerir una porositat elevada i una relació àrea superficial/volum alta per l'ancoratge cel·lular i el creixement de neo-teixits així com per a un transport uniforme de cèl·lules. Paràmetres arquitectònics dels porus com ara la geometria, la mida, la interconnectivitat, l'orientació i la distribució també són importants per al cultiu cel·lular, el transport de massa, la formació de teixit en tres dimensions i les propietats mecàniques tenint en compte que les estructures han de ser processables fàcilment en estructures tridimensionals.

Els *scaffolds* produïts mitjançant les tècniques convencionals són molt prometedors i han estat aplicats a diferents teixits amb un èxit variable. No obstant això, segons la literatura, els mètodes convencionals ofereixen poca capacitat per controlar la mida, geometria, interconnectivitat i distribució espacial dels porus. A més, cap de les tècniques convencionals ha permès construir *scaffolds* amb una morfologia altament regular. Així, el prototipat ràpid (RP) s'ha vist com una alternativa viable per aconseguir el control sobre l'arquitectura del *scaffold*. No obstant això, aquesta tècnica ofereix una resolució

limitada a escala micromètrica. A més la mida mínima dels porus globals és de 100 µm.

El principal objectiu d'aquest treball és desenvolupar mètodes de síntesi de *scaffolds* polimèrics, basats en les tècniques convencionals, que permetin obtenir nous dissenys arquitectònics per tal de utilitzar-los en aplicacions de la ET ja sigui en el cultiu de teixits o com una eina per a estudis bàsics de les interaccions entre les cèl·lules o teixits i el *scaffold* amb la finalitat de desenvolupar *scaffolds* òptims per a l'ET. Específicament, els objectius d'aquest treball són:

1. - Desenvolupar el mètode convencional anomenat colat de sòlids en combinació amb el lixiviat de partícules per:

a. - Obtenir *scaffolds* amb una morfologia altament regular amb porus alineats i interconnectats (Capítol 2).

b. - Obtenir *scaffolds* amb una morfologia de porus en forma de canals tubulars oberts orientats longitudinalment amb arquitectures laminars i cilíndriques així com estructures laminars amb porus en forma de canals interconnectats entre les capes. Sintetitzar-los amb diferents estructures macromoleculares (xarxes i IPN's), així com copolímers amb diferents relacions hidròfil /hidròfob (Capítol 3).

c. - Obtindre una nova estructura porosa interconnectada en què es puguin obtenir *microscaffolds* dins dels macroporus del *scaffolds* (Capítol 4).

d. - Obtenir *scaffolds* que mostrin un gradient de porositat (Capítol 4).

2. - Caracteritzar els *scaffolds* obtinguts.

Per obtenir una estructura altament regular amb porus alineats i interconnectats, és a dir objectiu 1a), es va partir d'una estructura regular. Concretament, tela de poliamida 6,6 (niló). Per tal d'obtenir *scaffolds* amb un gruix major, es van acoblar les teles constituint aquest acoblament un *template*. La utilització d'aquest *template* donaria lloc a estructures no interconnectades. No obstant això, el problema de la interconnexió es va resoldre formant un acoblament unitari, és a dir que cadascuna de les capes de tela apilades estiguin connectades formant unions efectives, mitjançant la sinterització amb temperatura. Es va determinar el programa de sinterització, que va consistir en una isoterma a 220°C durant 10 min, i posteriorment es va comprovar mitjançant DSC que el programa de sinterització determinat produeix la unió ferma entre les làmines probablement a causa d'un procés que implica la fusió de petits cristalls i la recristal·lització de fibres individuals en contacte unes amb altres ja que s'aprecia un petit pic endotèrmic entre 225-245°C, previ a la zona

de fusió del material (260°C), creat probablement en el pas isoterm del tractament ja que aquest pic endotèrmic està absent al termograma de la tela de niló comercial.

Un cop determinat el programa de sinterització es van desenvolupar dos procediments per a l'obtenció del *template*. En el primer procediment es va obtenir el *template* directament mitjançant el procés de sinterització tal com s'ha descrit anteriorment, mentre que en el segon procediment abans de procedir amb la sinterització tèrmica de les teles de niló apilades, aquestes es van comprimir a 180°C amb diferents condicions de temps i pressió per tal d'avaluar la influència d'aquests paràmetres en el procés de síntesi dels *scaffolds* en el gruix del *scaffolds*, la morfologia dels porus i la porositat. Es va triar 180°C per tal que es produís una deformació permanent de les teles de niló apilades ja que aquesta és molt més gran que la T_g del niló.

Una vegada obtingut el *template*, es va col·locar en un motlle (plaques). Quantitats apropiades, d'una mescla líquida homogènia, de monòmer(s), agent entrecruador i iniciador tèrmic radicalari es van abocar en el motlle i es va polimeritzar obtenint una xarxa polimèrica. Conclòs el procés de polimerització es va eliminar el *template* porogènic amb àcid nítric. Alternativament, per a l'obtenció de xarxes interpenetrades (IPN's), la xarxa polimèrica juntament amb el *template* es va deixar en repòs amb la mescla líquida homogènia i posteriorment es polimeritzà. Seguidament es va eliminar el *template* porogènic amb àcid nítric.

Els monòmers utilitzats per a l'obtenció d'aquests *scaffolds* pertanyen a la família dels acrilats i metacrilats. Concretament, s'han utilitzat com monòmers l'acrilat d'etil (EA), metacrilat de metil (MMA), metacrilat de 2-hidroxietil (HEMA) i dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA) com entrecruador, que polimeritzats donen lloc a polímers bioestables. Aquests polímers bioestables són biocompatibles i s'utilitzen actualment en diverses aplicacions biomèdiques. S'ha sintetitzat aquesta estructura amb PMMA, PEA i copolímers amb diferents composicions de PEA-co-PHEMA, ja que es tracta de polímers amb característiques diferents, amb estructures macromoleculares de xarxa polimèrica i homoIPN's (per tal de poder reforçar l'estructura).

Els *scaffolds* s'han caracteritzat morfològicament mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada (SEM), densimetries (porositat total) i es va triar el *scaffold* de PMMA segons el primer procediment per estudiar les seves propietats mecàniques (DMTA).

Els dos procediments van revelar que són factibles per obtenir *scaffolds* amb estructures molt ordenades. S'han obtingut *scaffolds* amb canals cilíndrics ortogonals alineats paral·lelament amb una connectivitat controlada, que s'obté

per la sinterització de les teles de niló. La porositat i la morfologia del porus es poden variar aplicant el segon procediment, és a dir aplicant pressió.

D'altra banda, per obtenir *scaffolds* amb una morfologia de porus en forma de canals tubulars oberts orientats longitudinalment sense interconnexió (objectiu 1b) amb una estructura externa en forma de làmina es va procedir de forma similar a la descrita en l'objectiu 1a, a diferència de que es va partir d'un *template* que va consistir en teles de poliacrilonitril (PAN), amb un diàmetre de monofilament del fil d'aproximadament 11 μm , que no es sinteritzaren, i posteriorment es va eliminar el *template* amb N,N-Dimetilformamida (DMF). D'altra banda, per obtenir *scaffolds* amb una estructura externa cilíndrica, es va partir de dos *templates* diferents, monofilaments i fils de PAN, amb un diàmetre de monofilament d'aproximadament 42 i 14 μm respectivament. Es van desenvolupar dos procediments, un per als monofilaments i un altre per als fils. Els monofilaments es van agrupar en un feix, que es va introduir en un tub cilíndric de vidre. Aleshores, es va tensar el feix amb la finalitat que els monofilaments quedessin alineats i paral·lels. Posteriorment, es va segellar un dels extrems del tub cilíndric i es va omplir a buit amb les quantitats apropiades, d'una mescla líquida homogènia, de monòmer(s), agent entrecreuador i iniciador tèrmic radicalari. Després, es polimeritzà obtenint una xarxa polimèrica. Per obtenir *scaffolds* reforçats (IPN's), el *scaffold* juntament amb el *template* obtingut en la primera polimerització es va introduir en un tub cilíndric de vidre de major diàmetre de manera que la fase de inflament va estar determinada pel diàmetre del segon cilindre utilitzat, a diferència de l'estructura laminar que es va inflar fins l'equilibri. Posteriorment es va eliminar el *template* amb N,N-Dimetilformamida (DMF). D'altra banda, el procés d'obtenció del *template* a partir de fils va consistir en recobrir cadascun amb una dissolució saturada de fils de PAN en DMF. Posteriorment, es van deixar assecar a temperatura ambient amb l'objectiu d'estudiar si la mescla monomèrica podia penetrar entre cadascun dels monofilaments que constitueixen el fil. Després, es va procedir de manera semblant a la descrita per als monofilaments de PAN a diferència que la segona polimerització es va realitzar en el mateix tub cilíndric que la primera polimerització.

D'altra banda, per tal d'avaluar la viabilitat dels procediments i poder obtenir aquestes estructures amb materials polimèrics amb diferents propietats físiques i químiques, en el disseny d'experiments es van utilitzar monòmers que donen lloc a hidrogels (PEA-co-PHEMA), amb diferents relacions hidròfil (PHEMA)/hidròfob (PEA), i no hidrogels (PEA i PMMA) amb estructures macromoleculares de xarxa (PEA, PEA-co-PHEMA i PMMA) i de IPN [PEA-*i*-PHEMA, PEA-*i*-(PEA-co-PHEMA), (PEA-co-PHEMA)-*i*-(PEA-co-PHEMA), PMMA-*i*-PMMA i PMMA-*i*-PHEA] per tal de reforçar les estructures.

Per obtenir estructures laminars amb porus en forma de canals interconnectats entre les capes, utilitzant com a material porogènic PAN, el procediment de sinterització tèrmica (objectiu 1a) no va resultar efectiu. Per obtenir el *template*, es va desenvolupar un procés de sinterització en atmosfera de dissolvent, per tal de generar una dissolució parcial de la superfície dels monofilaments que pugui produir una unió ferma entre aquests. Per preparar el *template* es van alinear monofilaments de PAN formant una capa. Posteriorment, es van preparar 4 capes més de manera similar i es van col·locar successivament una damunt d'una altra de manera que els monofilaments d'una capa respecte a una altra formessin un angle d'aproximadament 90°. Després, el conjunt de les quatre capes es va mullar amb una dissolució de DMF i es va assecar amb paper de filtre. Posteriorment, es va col·locar en atmosfera de dissolvent (DMF) durant 2 h. Després, es va deixar evaporar el dissolvent durant 24 h. D'aquesta manera es pretenia aconseguir la sinterització dels monofilaments.

Els *scaffolds* s'han caracteritzat morfològicament mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada (SEM), densimetries (porositat total) i mesures d'inflament.

Els diferents procediments van revelar que són factibles per obtenir estructures poroses. S'han obtingut *scaffolds* amb arquitectures laminars amb porus tubulars orientats longitudinalment tant oberts (*template* de tela de PAN) com interconnectats (*template* de monofilaments de PAN sinteritzats amb atmosfera de dissolvent) així com arquitectures cilíndriques amb porus tubulars orientats longitudinalment oberts i paral·lels (*template* de monofilaments o fils de PAN). Aquestes estructures es poden obtenir amb diferents materials, estructures macromoleculares (xarxes i IPN's), diàmetre de porus i rugositats. La porositat també es pot modificar variant la quantitat de monofilaments utilitzats per construir el *template* i/o en obtenir la IPN.

D'altra banda, per l'obtenció d'una nova estructura porosa interconnectada en què es puguin obtenir *microscaffolds* dins dels macroporus del *scaffold* (objectiu 1c) i l'obtenció de *scaffolds* que mostrin un gradient de porositat (objectiu 1d), s'han utilitzat polímers biodegradables. Concretament, s'ha utilitzat quitosà amb diferents concentracions, gelatina i agarosa. Tant el quitosà com la gelatina estan aprovats per la FDA per a diferents aplicacions mèdiques, a més d'estar disponibles comercialment mentre que l'agarosa és un hidrogel biocompatible que s'utilitza en productes cosmètics entre altres.

En aquest cas, per construir el *template* es va omplir una placa Petri amb microesferes de PEMA massisses, buides i buides farcides de microesferes més petites i es sinteritzaren mitjançant un procés que va consistir en una isoterma de 130°C durant 65 min. Per obtenir els *scaffolds* de quitosà, es van dissoldre flocs de quitosà en una dissolució aquosa d'àcid acètic 1M per formar

dissolucions polimèriques homogènies al 0.8, 1.5 i 2.9% en pes. Un paral·lelepípede obtingut del *template* tridimensional, es va col·locar en una placa Petri. Posteriorment, la dissolució de quitosà es va abocar gota a gota i a temperatura ambient sobre el *template* fins que la placa Petri es va omplir amb la dissolució de quitosà. Les mostres es van deixar reposar a temperatura ambient girant-les per ajudar a la dissolució a què penetrés en la matriu permetent que fluís al *template* paral·lelepípedic per totes les cares externes. Després, la dissolució de quitosà juntament amb el *template* es va assecat per eliminar el dissolvent. Posteriorment, es va eliminar el *template* porogènic amb etanol. Els *scaffolds* de gelatina i agarosa es van obtenir de forma similar a diferència del dissolvent, temperatura de dissolució del polímer, temperatura d'infiltració al *template*, concentració polimèrica, temps d'assecat i d'extracció del *template* amb etanol.

Els *scaffolds* s'han caracteritzat morfològicament mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada (SEM) i densimetries (porositat total).

Mitjançant el procediment desenvolupat, s'ha obtingut un nou disseny de *scaffold* porós 3D que consisteix en *microscaffolds* dins d'alguns porus del *scaffold* amb una interconnectivitat completa. Els *microscaffolds* tenen una estructura de porus ben interconnectada i oberta. D'altra banda, s'han obtingut *scaffolds* de quitosà amb gradient de porositat en la direcció longitudinal i transversal utilitzant altes concentracions de quitosà. La porositat dels *scaffolds* de quitosà obtinguts a partir de solucions al 0.8, 1.5 i 2.9% en pes varia en un interval molt petit i és més gran que la dels *scaffolds* de gelatina i agarosa obtinguts en condicions similars.

Els resultats demostren la viabilitat d'aquest mètode per obtenir *scaffolds*, obrir una línia nova per a la formació d'una gran varietat d'estructures i proporcionar noves estructures per al seu estudi en l'enginyeria de teixits, concretament els *scaffolds* de quitosà amb gradient de porositat poden ser útils per a la regeneració de teixits nadius que tenen gradients a través del seu volum espacial com succeeix en l'os, la pell o el cartílag i els *scaffolds* amb *microscaffolds* en els porus del *scaffold* potser podrien servir com una eina per a estudis bàsics de les interaccions entre les cèl·lules o teixits i el *scaffold* amb la finalitat de desenvolupar *scaffolds* òptims per a l'enginyeria de teixits.

Abstract

The development of the Tissue Engineering (TE) field arises from the need to give a solution to the deficiencies associated with the replacement of tissues (rejections, donor tissue shortage, etc.) when they have been lost or do not work properly either by trauma or disease. The purpose of this field is to avoid the aforementioned problems through the development of biological substitutes capable of replacing the damaged tissue. TE approaches to create functional tissues are based on the use of cells and/or scaffolds and microenvironmental factors. Although, products have been developed by cell therapy, many cell types need scaffolds to guide the development of new tissues with the appropriate function, serve as a substrate for cell adhesion and at the same time provide mechanical support for the new tissue that has grown.

Scaffolds are three dimensional porous solids biomaterials that try to mimic the native extracellular matrix (ECM). TE challenges include the design and manufacturing of scaffolds among others. This work aims to provide new procedures and structures for the production of these materials.

Depending on the considered applications, scaffold design must meet different requirements but a well interconnected pore network is needed for most tissue engineering applications, to achieve better nutrient transport and facilitate cell migration. High porosity and high surface area to volume ratio is also required for cell attachment and neo-tissue growth as well as uniform cell delivery. Pore architecture parameters such as the geometry, the size, the interconnectivity, the orientation and the distribution are also important parameters for cell seeding, mass transport, three dimensional tissue formation and mechanical properties considering that the structures should be easily processed into three-dimensional structures.

Scaffolds produced by conventional techniques hold great promise and have been applied to a variety of tissues with varying success. However, according to the literature, conventional methods provide little capability to control precisely size, geometry, interconnectivity and spatial distribution of the pores. Moreover, none of the conventional techniques has allowed researchers to build scaffolds with a highly regular morphology. As a result, rapid prototyping (RP) has been seen as a viable alternative for achieving control over scaffold architecture. However, this technique provides limited micro-scale resolution. Furthermore the minimum size of global pores is 100 μm .

The main objective of this work is to develop synthesis methods of polymeric scaffolds, based on conventional techniques, which allow to obtain new architectural designs in order to be used in TE applications either in tissue

culture or as a tool for basic studies of the interactions between cells or tissues and the scaffold in order to develop optimal scaffolds for TE. Specifically, the objectives of this work are to:

1. - Develop the solvent casting and particulate leaching conventional method in order to:

a. - Obtain scaffolds with a highly regular morphology with aligned and interconnected pores (Chapter 2).

b. - Obtain scaffolds with a pore morphology in the form of open tubular channels which are longitudinally oriented with laminar and cylindrical architectures as well as laminar structures with pores in the form of interconnected channels between the layers. Synthesizing them with different macromolecular structures (networks and IPN's), and copolymers with different hydrophilic/hydrophobic ratios (Chapter 3).

c. - Obtain a new interconnected porous structure where microscaffolds can be generated inside the macropores of the scaffold (Chapter 4).

d. - Obtain scaffolds that show a gradient porosity (Chapter 4).

2. - Characterize the obtained scaffolds.

To obtain a highly regular structure with aligned interconnected pores, i.e. objective 1a), a regular structure was used. Specifically, polyamide 6.6 (nylon) fabric was used. In order to obtain thicker scaffolds, the nylon fabrics were assembled forming a template. The use of this template would result in non-interconnected structures. However, the interconnection problem can be solved by forming a unitary assembly; that is to say, each of the stacked fabric layers should be connected to form effective joints by thermal sintering. It was determined the sintering program, which consisted of an isotherm at 220°C for 10 minutes, and then it was tested, by DSC, that the determined sintering program produced a firm bonding between the sheets probably by a process involving small crystal melting and recrystallization of individual fibers in touch with each other since the thermogram shows a small endothermic peak between 225-245°C prior to the fusion zone of the material (260°C), created probably in the isothermal step of the treatment since this endothermic peak is absent from the thermogram of raw nylon fabric.

Once the sintering program was determined, two procedures were developed for obtaining the template. In the first procedure, the template was obtained directly through the sintering process as described above, while in the second procedure the stacked nylon fabrics were compressed at 180°C under different pressure and time conditions before proceeding with the thermal sintering in order to evaluate the influence of these parameters on the synthesis

process of the scaffolds on the thickness of the scaffold, the pore morphology and the porosity. 180°C was chosen to produce a permanent deformation of the stacked nylon fabrics because this temperature is much higher than the T_g of nylon.

Once the template was obtained, it was placed in a mould (plates). Appropriate amounts of a homogeneous liquid mixture of monomer(s), crosslinking agent and thermal radical initiator were poured into the mould and polymerized to give a polymer network. Once the polymerization process was complete, the template was removed using nitric acid. Alternatively, to obtain interpenetrating polymer networks (IPN's), the polymer network together with the template was allowed to stand with the homogeneous liquid mixture and then it was polymerized. After that, the porogenic template was removed using nitric acid.

The monomers used for preparing the scaffolds belong to the acrylates and methacrylates family. Specifically, it has been used ethyl acrylate (EA), methyl methacrylate (MMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as monomers and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as crosslinker, which give rise to biostable polymers when they are polymerized. These biostable polymers are biocompatible and currently used in various biomedical applications. This structure has been synthesised in PMMA, PEA and PEA-co-PHEMA copolymers in different compositions, as they are polymers with different characteristics, with macromolecular structures of polymer network and homoIPN's (with the object of being able to strengthen the structure).

Scaffolds were morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM), densimetries (overall porosity) and the PMMA scaffold, according to the first procedure, was chosen to study their mechanical properties (DMTA).

The two procedures showed to be feasible for obtaining scaffolds with highly ordered structures. It has been obtained scaffolds with orthogonal cylindrical channels, which are parallel aligned with controlled connectivity, which is obtained by the nylon fabrics sintering. The porosity and the pore morphology can be varied with the second process, i.e. by applying pressure.

On the other hand, the method for obtaining scaffolds with a pore morphology in the form of longitudinally oriented open tubular channels without interconnection (objective 1b) and with a laminar shaped external structure was similar to the one described in the objective 1a, unlike the template which consisted of polyacrylonitrile (PAN) fabrics, with a strand's monofilament diameter of approximately 11 µm, which was not sintered and then the template was removed with N, N-dimethylformamide (DMF). However, to obtain scaffolds with a cylindrical shaped external structure two different templates were used,

PAN monofilaments and PAN strands with a monofilament diameter of about 42 and 14 μm respectively. Two methods were developed, one for the monofilaments and another for the strands. The monofilaments were grouped into a bundle, which was introduced into a cylindrical glass tube. Then, the bundle was tightened so that the monofilaments could be aligned and parallel. Then, the tube was sealed by one end and the appropriate amounts of a homogeneous liquid mixture of monomer(s), crosslinking agent and radical thermal initiator were vacuum injected in the cylindrical glass tube. Afterward, the polymerization was carried out obtaining a polymer network. To prepare reinforced scaffolds (IPN's), the scaffold together with the template obtained in the first polymerization was placed into a bigger cylindrical glass tube, so the swelling was determined by the diameter of the second cylinder used, unlike the laminar structure which swelled until the equilibrium. Finally, the template was removed with N, N-dimethylformamide (DMF). On the other hand, the method for obtaining the template from strands consisted in coating them with a saturated PAN strands solution in DMF. Then, they were allowed to dry at room temperature with the aim of studying whether the monomer mixture could penetrate between each monofilament which forms the strand. Afterward, the procedure was similar to the one described for PAN monofilament, unlike the second polymerization was carried out in the same cylindrical tube as the first polymerization.

Moreover, in order to assess the viability of the methods and to obtain these structures in polymeric materials with different chemical and physical properties, it was used, in the design of experiments, monomers which give rise to hydrogels (PEA-*co*-PHEMA), with different hydrophilic (PHEMA)/hydrophobic (PEA) relationships, and no hydrogels (PEA and PMMA) with macromolecular structures of network (PEA, PEA-*co*-PHEMA and PMMA) and IPN [PEA-*i*-PHEMA, PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA), (PEA-*co*-PHEMA)-*i*-(PEA-*co*-PHEMA), PMMA-*i*-PMMA and PMMA-*i*-PHEA] with the aim of reinforcing the structures.

To produce laminar structures with pores in the form of interconnected channels between the layers, using PAN as porogenic material, the thermal sintering process (objective 1a) was not effective. To obtain the template, it was developed a process which consist of sintering under solvent atmosphere, in order to generate a partial dissolution of the surface of the monofilaments which could produce a firm bond between them. To prepare the template, PAN monofilaments were aligned forming a layer. Then, 4 layers more were prepared similarly and they were placed one over another so that the monofilaments of one layer over another formed an angle of approximately 90°. Afterward, the four layers were wetted with a DMF solution and then dried with filter paper. Subsequently, it was placed under solvent atmosphere (DMF) for 2 h. Then, the solvent was allowed to evaporate for 24 h. In this way, it was intended for the monofilaments to sinter.

The scaffolds were morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM), densimetries (overall porosity) and swelling measurements.

The different methods showed to be feasible for obtaining porous structures. Scaffolds with laminar architectures which consist of longitudinally oriented tubular pores both open (PAN fabric template) and interconnected (PAN monofilament template sintered in solvent atmosphere) were obtained, as well as cylindrical architectures with longitudinally oriented tubular pores which are open and parallel (PAN strand's monofilament template). These structures are available in different materials, macromolecular structures (networks and IPN's), pore diameter and roughness. The porosity can also be modified by varying the amount of monofilaments used to build the template and/or to obtain the IPN.

Moreover, to obtain a new interconnected porous structure where microscaffolds can be generated inside the macropores of the scaffold (aim 1c), as well as scaffolds that show a gradient in the porosity (aim 1d); biodegradable polymers has been used. Specifically, chitosan with different concentrations, gelatin and agarose has been used. Both chitosan and gelatin are approved by the FDA for different medical applications; moreover they are commercially available while agarose is a biocompatible hydrogel that is used in cosmetics between others.

In this case, to build the template, a Petri dish was filled with PEMA microspheres, which were solid, hollow and stuffed microspheres and they were sintered by a process consisting of an isothermal at 130°C for 65 min. To prepare chitosan scaffolds, chitosan flakes were dissolved in glacial acetic acid aqueous solution 1M to form homogeneous polymer solutions at 0.8, 1.5 and 2.9 wt%. A three-dimensional parallelepiped obtained from the template was placed in a Petri dish. Then, chitosan solution was poured over it drop by drop at room temperature until the Petri dish was filled up with the chitosan solution. Then, the samples were allowed to stand at room temperature turning it on its side to help the solution to permeate into the matrix, allowing it to flow into the parallelepiped template flowed by all the external faces. After that, the chitosan solution together with the template was dried to remove the solvents. Subsequently, the porogenic template was removed with ethanol. The gelatin and agarose scaffolds were obtained similarly, unlike the solvent, temperature for polymer dissolution, infiltration temperature into the template, polymer concentration, drying and template extraction times.

The scaffolds were morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM) and densimetries (overall porosity).

Using the developed method, a novel 3D porous scaffold design which consists of microscaffolds inside some of the pores of the scaffold, with a full interconnectivity has been obtained. The microscaffolds have a well and open

interconnected pore structure. Moreover, chitosan scaffolds with a gradient porosity along the longitudinal and transversal direction by using high chitosan concentrations, have been obtained. The overall porosity of chitosan scaffolds obtained from solutions at 0.8, 1.5 and 2.9% by weight varies in a very small range and it is higher than that of gelatin and agarose scaffolds obtained with similar conditions.

The results demonstrate the viability of this method for obtaining *scaffolds*, opening a new line to form a variety of structures and providing new structures for tissue engineering studies, specifically chitosan scaffolds with a gradient porosity may be helpful for the regeneration of native tissues which possess gradients across its spatial volume as in bone, cartilage or skin and scaffolds with *microscaffolds* inside the pores of the scaffold perhaps may serve as a tool for basic studies of the interactions between cells or tissues and the scaffold in order to develop optimal scaffolds for tissue engineering.

Lista de figuras

	Página
Figura 1.1: Datos estadísticos de países del Eurotransplant desde el año 2000 hasta el 2009. (Eurotransplant International Foundation, www.eurotransplant.nl , 2010).	53
Figura 1.2: Datos estadísticos de los donantes de órganos, pacientes transplantados y pacientes en lista de espera en Estados Unidos desde el año 2000 al 2009. (United Network for Organ Sharing, http://www.unos.org/docs/About_UNOS.ppt , 2010).	53
Figura 1.3: Visión general del campo multidisciplinar de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (Hutmacher et al. 2007).	56
Figura 1.4: Clasificación de las tres estrategias de la ingeniería de tejidos. 1) Células aisladas, 2) <i>scaffolds</i> y 3) células con <i>scaffolds</i> . (Khamdemhosseini et al. 2005).	57
Figura 1.5: Etapas implicadas en la ingeniería de tejidos según la estrategia 3 (Dvir et al. 2011).	58
Figura 1.6: Transplante de condrocitos en el cóndilo femoral derecho. Las células se aíslan por medio de una digestión enzimática de tejido normal. Posteriormente, se cultivan en medios específicos para aumentar el número de células y finalmente se implantan en el paciente (Tubo, 2008).	59
Figura 1.7: Diferenciación de tejidos humanos (Department of Health and Human Services, 2001).	63
Figura 1.8: Interacción entre las etapas del diseño de los <i>scaffolds</i> (Luo et al. 2007).	81
Figura 1.9: Estructura jerárquica de los dientes humanos, donde se representan las características tubulares en función de la posición en referencia a la unión dentina-esmalte (UDE). En las proximidades de la UDE, distribución de baja densidad de los túbulos y pequeño tamaño. Túbulos de gran tamaño y alta densidad se observan en las proximidades de la pulpa (Katz et al. 2007).	82

Figura 1.10: Estructura jerárquica del hueso humano (Katz et al. 2007).	83
Figura 1.11: Diagrama esquemático que muestra las limitaciones de difusión en <i>scaffolds</i> para la ingeniería de tejidos con estructuras esponjosas (Sachlos y Czernuszka, 2003).	85
Figura 1.12: Distintos enfoques para vascularizar tejidos. Independientemente, cada método se puede aplicar directamente <i>in vivo</i> para facilitar la angiogénesis. Las flechas más grandes indican la integración de los métodos <i>in vitro</i> e implantación del tejido junto con el <i>scaffold</i> vascularizado. Las líneas punteadas indican la aplicación directa <i>in vivo</i> de uno o varios métodos (Kaully et al. 2010).	86
Figura 1.13: Micrografía SEM de un <i>scaffold</i> de PGA (Thomson et al. 2000).	93
Figura 1.14: Micrografía SEM de un <i>scaffold</i> de PLGA utilizando partículas de cloruro sódico como porógeno (Thomson et al. 2000).	94
Figura 1.15: Ejemplo de un <i>scaffold</i> de PLLA con forma de nariz (Thomson et al. 2000).	95
Figura 1.16: Micrografía SEM de un <i>scaffold</i> de PLLA obtenido mediante la técnica de gas foaming (Tsivintzelis et al. 2007).	97
Figura 1.17: Micrografías SEM de <i>scaffolds</i> de L-PLA preparados a partir de una disolución al 5% en peso. a) dioxano puro (separación de fases sólido-líquido), b) mezcla dioxano agua (separación de fases líquido-líquido) (Schugens et al. 1996b).	98
Figura 1.18: Síntesis de un <i>scaffold</i> de PHEMA mediante la técnica de separación de fases durante la polimerización (Karp et al. 2003).	99
Figura 1.19: Micrografía SEM de un <i>scaffold</i> de PHEMA producido a partir de una mezcla de agua: HEMA (80:20), EGDMA (1% mol relativo a HEMA) y DPAP (0.1% relativo al HEMA) (Baker et al. 2009).	99
Figura 1.20: Micrografía SEM de un <i>scaffold</i> de quitosano obtenido por la técnica de <i>freeze-drying</i> (Madihally y Matthew, 1999).	100
Figura 1.21: Micrografía ESEM de un <i>scaffold</i> hidratado de	101

pululano/dextrano (75/25) (Autissier et al. 2010).

Figura 1.22: Secuencia de operación de la técnica de impresión tridimensional (Wu et al. 1996). 102

Figura 1.23: *Scaffold* producido mediante impresión tridimensional con canales interconectados. (A) Estructura completa. (B) Vista en detalle de la estructura de canales interconectados con un diámetro de aproximadamente 500 μm (Leukers et al. 2005). 103

Figura 1.24: Diagrama esquemático del proceso de extrusión y fusión mediante FDM (Zein et al. 2002). 104

Figura 1.25: Micrografía SEM de un *scaffold* de polietileno de alta densidad obtenido mediante FDM (Leong et al. 2003). 105

Figura 1.26: Micrografías SEM, donde se muestra la deposición continua del material (a) y la oclusión del poro en los bordes del *scaffold* en las direcciones x e y (b) (Leong et al. 2003). 106

Figura 1.27: Proceso esquemático de fabricación de la técnica SLS (Smith et al. 2007). 107

Figura 1.28: *Scaffold* de PLC producido mediante la técnica SLS. Tamaño de poro 1.75 mm $x=y=z$ (Williams et al. 2005). 107

Figura 2.1a: Diagrama esquemático para la síntesis de: (A) IPN secuencial y (B) IPN simultánea (Suresh et al. 2011). 131

Figura 2.1b: Representación esquemática de: a) Full-IPN y b) Homo-IPN. 131

Figura 2.2: Micrografía SEM del tejido de poliamida 6,6 (nylon). Barra de escala 1 mm. 134

Figura 2.3: Descripción esquemática del proceso de obtención del *template* según el primer procedimiento. 135

Figura 2.4: Diagrama esquemático que muestra la compresión de las telas para la obtención del *template* según el segundo procedimiento. 136

Figura 2.5: Diagrama esquemático del proceso de fabricación de *scaffolds* 3D con estructura macromolecular de red y de IPN. 137

Figura 2.6: Micrografía SEM de la superficie exterior del <i>template</i> de 8 capas. Barra de escala 500 μm .	142
Figura 2.7: Micrografía SEM de la sección transversal del <i>template</i> de 8 capas. En la parte izquierda de la imagen se puede observar la superficie exterior del <i>template</i> . Barra de escala 500 μm .	142
Figura 2.8: Termograma de DSC de la tela de nylon comercial.	143
Figura 2.9: Termograma de DSC de la región de fusión de la tela de nylon comercial (O) y de la tela de nylon tratada (\square).	143
Figura 2.10: Micrografía SEM del <i>template</i> de nylon obtenido en el que se señalan algunos puntos de interconexión. Barra de escala 200 μm .	144
Figura 2.11a: Micrografía SEM de la superficie exterior del <i>scaffold</i> de PMMA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 1 mm.	145
Figura 2.11b: Detalle de los canales de la superficie exterior del <i>scaffold</i> de PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro de poro de interconexión es de $67 \pm 5 \mu\text{m}$. Barra de escala 200 μm .	145
Figura 2.12a: Sección transversal del <i>scaffold</i> de PMMA, 1% en peso EGDMA. La superficie exterior de la muestra se puede ver a la izquierda de la imagen. Barra de escala 1 mm.	145
Figura 2.12b: Detalle de los canales de la superficie exterior del <i>scaffold</i> de PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $72 \pm 6 \mu\text{m}$. Barra de escala 200 μm .	145
Figura 2.13: Micrografía SEM de la superficie exterior del <i>template</i> de 20 capas. Barra de escala 2 mm.	147
Figura 2.14: Sección transversal del <i>template</i> de 20 capas. En la parte izquierda de la imagen se puede observar la superficie exterior del <i>template</i> . Barra de escala 2 mm.	147
Figura 2.15: Efectos de de la compresión de las preformas (Chen et al. 2001a).	148
Figura 2.16: Cambio del grosor del <i>template</i> en función del tiempo de compresión térmica a 180°C y a una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6 \text{ Pa}$ (\blacktriangle), $(70 \pm 3) 10^6 \text{ Pa}$ (\blacklozenge) y de $(13.2 \pm 0.5) 10^7 \text{ Pa}$ (\blacksquare) para una preforma	148

de 33 capas.

Figura 2.17: Grosor por capa vs el número de capas a presión atmosférica ($\approx 0.1 \cdot 10^6$ Pa) (\blacktriangle) y a $(67 \pm 3) \cdot 10^6$ Pa (\blacksquare). 149

Figura 2.18: *Nesting* de las capas de nylon en el *template* obtenido según el procedimiento 2.2.2.1.1. Barra de escala 500 μm . 150

Figura 2.19: Micrografías SEM de la superficie exterior de los *scaffolds* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA producidos a partir de *templates* de 33 capas de nylon según las condiciones de la **tabla 2.1**. Barra de escala 800 μm . 151

Figura 2.20: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA a partir de un *template* de 33 capas de nylon a $(30.41 \pm 0.07) \cdot 10^6$ Pa. La sección transversal se muestra en la parte derecha de la imagen y la superficie exterior en la izquierda. Barra de escala 300 μm . 152

Figura 2.21: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA a partir de un *template* de 33 capas de nylon a $(13.2 \pm 0.5) \cdot 10^7$ Pa. La sección transversal se muestra en la parte derecha de la imagen y la superficie exterior en la izquierda. Barra de escala 200 μm . 152

Figura 2.22: Micrografías SEM de la sección transversal de los *scaffolds* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA producidos a partir de *templates* de 33 capas de nylon según las condiciones de la **tabla 2.1**. Barra de escala 500 μm . 153

Figura 2.23: Micrografía SEM de la sección transversal ampliada de la muestra 7 (**tabla 2.1**) de la **figura 2.22**. Barra de escala 100 μm . 154

Figura 2.24: Micrografía SEM de la sección transversal ampliada de la muestra 8 (**tabla 2.1**) de la **figura 2.22**. Barra de escala 100 μm . 154

Figura 2.25a: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-*co*-PHEMA]-*i*-[PEA-*co*-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 70/30. Barra de escala 2 mm. 155

Figura 2.25b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-*co*-PHEMA]-*i*-[PEA-*co*-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 70/30. Barra de escala 500 μm . 155

Figura 2.26a: Micrografía SEM de la sección transversal del <i>scaffold</i> de PEA- <i>i</i> -PEA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 1 mm.	155
Figura 2.26b: Detalle de los canales de la sección transversal del <i>scaffold</i> de PEA- <i>i</i> -PEA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 500 μ m.	155
Figura 2.27a: Micrografía SEM de la sección transversal del <i>scaffold</i> de [PEA- <i>co</i> -PHEMA]- <i>i</i> -[PEA- <i>co</i> -PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 90/10. Barra de escala 1 mm.	156
Figura 2.27b: Detalle de los canales de la sección transversal del <i>scaffold</i> de [PEA- <i>co</i> -PHEMA]- <i>i</i> -[PEA- <i>co</i> -PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 90/10. Barra de escala 500 μ m.	156
Figura 2.28a: Micrografía SEM de la sección transversal del <i>scaffold</i> de [PEA- <i>co</i> -PHEMA]- <i>i</i> -[PEA- <i>co</i> -PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 50/50. Barra de escala 2 mm.	156
Figura 2.28b: Detalle de los canales de la sección transversal del <i>scaffold</i> de [PEA- <i>co</i> -PHEMA]- <i>i</i> -[PEA- <i>co</i> -PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 50/50. Barra de escala 500 μ m.	156
Figura 2.29: Efecto de la presión y el tiempo sobre la porosidad de los <i>scaffolds</i> de PMMA- <i>i</i> -PMMA, 1% en peso EGDMA obtenidos a partir de <i>templates</i> según las condiciones de la tabla 2.1 . 60 min (◆), 90 min (■) y 180 min (▲) y 33 piezas de nylon.	158
Figura 2.30: Módulo dinámico, E' , en función de la temperatura, a 1 Hz, del <i>scaffold</i> de PMMA 1% en peso EGDMA (□) y del PMMA en bloque 1% en peso EGDMA (O).	160
Figura 2.31: Factor de pérdidas mecánicas, $\tan \delta$, en función de la temperatura, a 1 Hz, del <i>scaffold</i> de PMMA 1% en peso EGDMA (O) y del PMMA en bloque 1% en peso EGDMA (□).	160
Figura 3.1: Representación esquemática de las sucesivas etapas que acontecen después de la implantación de un biomaterial (Kasemo, 2002).	172
Figura 3.2: Esquema de la formación de un coágulo de pequeñas células sanguíneas y proteínas adsorbidas a la superficie ("formación de trombos") (Tirrell et al. 2002).	173
Figura 3.3: Micrografía SEM de la superficie de la tela de PAN tal y	176

como la suministra el proveedor. Barra de escala 800 μm .

Figura 3.4: Micrografía SEM del corte transversal la tela de PAN tal y como la suministra el proveedor. Barra de escala 700 μm . 176

Figura 3.5: Micrografía SEM de los monofilamentos del tejido de PAN que constituyen la hebra. Barra de escala 30 μm . 177

Figura 3.6: Micrografía SEM de los monofilamentos de PAN utilizados para producir los *templates*. Barra de escala 50 μm . 177

Figura 3.7: Diagrama esquemático del proceso de fabricación de *scaffolds* 3D con macroestructura laminar y con estructura macromolecular de red y de IPN. 178

Figura 3.8: Diagrama esquemático del montaje para la fabricación de *scaffolds* con geometría cilíndrica. Primero, se llena el tubo con los filamentos y se infiltra a vacío el monómero(s), agente entrecruzador e iniciador (a). Posteriormente, se polimeriza en un baño termostático (b). 180

Figura 3.9: Diagrama esquemático del proceso de fabricación de *scaffolds* 3D con macroestructura cilíndrica y con estructura macromolecular de red y de IPN. 181

Figura 3.10: Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA fabricado a partir de tela de PAN en forma de malla. Detalle de la inversa de las hebras que contienen multitud de canales. Barra de escala 200 μm . 189

Figura 3.11: Micrografía SEM de la superficie del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. Detalle de la inversa del entrelazamiento de las hebras. Barra de escala 500 μm . 189

Figura 3.12: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA fabricado a partir de tela de PAN en forma de malla. Barra de escala 40 μm . 189

Figura 3.13: Detalle de los canales del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $11 \pm 1 \mu\text{m}$. Barra de escala 10 μm . 189

Figura 3.14: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de tela de PAN en forma de malla. Barra de escala 40 μm . 190

- Figura 3.15:** Detalle de los canales del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $11 \pm 1 \mu\text{m}$. Barra de escala $10 \mu\text{m}$. 190
- Figura 3.16:** Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PHEA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de tela de PAN en forma de malla. El diámetro del canal es de $11.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$. Barra de escala $30 \mu\text{m}$. 190
- Figura 3.17a:** Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*co*-PHEMA (70:30), 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. En la parte izquierda de la imagen se aprecia la sección transversal del *scaffold*. Barra de escala $200 \mu\text{m}$. 192
- Figura 3.17b:** Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*co*-PHEMA (70:30), 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $42 \pm 2 \mu\text{m}$. Barra de escala $50 \mu\text{m}$. 192
- Figura 3.18a:** Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. En la parte izquierda de la imagen se aprecia la sección transversal del *scaffold*. Barra de escala $500 \mu\text{m}$. 192
- Figura 3.18b:** Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $42 \pm 5 \mu\text{m}$. Barra de escala $50 \mu\text{m}$. 192
- Figura 3.19a:** Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-PHEMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $44 \pm 5 \mu\text{m}$. Barra de escala $50 \mu\text{m}$. 193
- Figura 3.19b:** Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-PHEMA, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver a la derecha de la imagen. Barra de escala $200 \mu\text{m}$. 193
- Figura 3.20a:** Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 70:30, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $42 \pm 3 \mu\text{m}$. Barra de escala $50 \mu\text{m}$. 193
- Figura 3.20b:** Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 70:30, 1% en peso EGDMA. La sección 193

transversal de la muestra se puede ver a la izquierda de la imagen. Barra de escala 800 μm .

Figura 3.21a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 50:50, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $42 \pm 4 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm . 194

Figura 3.21b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 50:50, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver a la derecha de la imagen. Barra de escala 500 μm . 194

Figura 3.22a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 30:70, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $41 \pm 4 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm . 194

Figura 3.22b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 30:70, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver en la parte inferior de la imagen. Barra de escala 500 μm . 194

Figura 3.23a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de una homo-IPN de PEA-*co*-PHEMA 70:30, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $41 \pm 4 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm . 195

Figura 3.23b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de una homo-IPN de PEA-*co*-PHEMA 70:30, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 200 μm . 195

Figura 3.24: Micrografía SEM del *scaffold* de PEA, 1% en peso EGDMA con forma de disco obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. Barra de escala 2 mm. 195

Figura 3.25: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de hebras de PAN recubiertas con una disolución de DMF y hebras de PAN, en la que se muestra con mayor aumento algunos ejemplos de canales con superficies internas rugosas. El diámetro medio del canal es de aproximadamente $14 \pm 2 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm . 196

- Figura 3.26:** Micrografía SEM del *scaffold* de (PEA-co-PHEMA)-i-(PEA-co-PHEMA) con una relación PEA/PHEMA 30:70, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de monofilamentos de PAN, donde se aprecia la textura rugosa de la superficie interior del canal. Barra de escala 50 μm . 196
- Figura 3. 27:** Micrografías SEM de *scaffolds* con diferentes características donde E.M, T y C representan estructura macromolecular (red o IPN), tamaño y composición respectivamente 197
- Figura 3. 28:** A) Imagen transversal de los dientes humanos. B) Micrografía SEM de la dentina en la que se muestra el material sólido dentina y los microtúbulos dentinarios en dirección perpendicular desde la pared pulpar hacia la unión dentina esmalte (Lin et al. 2011). 198
- Figura 3.29:** Micrografía SEM del *template* de monofilamentos de PAN unidos con atmósfera de disolvente. Barra de escala 200 μm . 199
- Figura 3.30:** Detalle de la unión de los monofilamentos de PAN. Barra de escala 70 μm . 199
- Figura 3.31:** Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de la unión de monofilamentos de PAN unidos con atmósfera de disolvente. Barra de escala 200 μm . 202
- Figura 3.32:** Detalle de las interconexiones entre las capas del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 20 μm . 202
- Figura 3. 33:** Micrografía SEM en la que se muestran en blanco algunos poros debido al contacto entre monofilamentos. Barra de escala 80 μm . 206
- Figura 3.34:** Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA fabricado a partir de tela de PAN en forma de malla. Barra de escala 50 μm . 206
- Figura 3.35:** Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA-i-PMMA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 40 μm . 206
- Figura 3.36:** Micrografía SEM mostrando con elipses blancas algunas zonas en las que la escala de grises es prácticamente la misma en la superficie del *scaffold* y en la pared interna del poro. Barra de escala 80 μm . 207
- Figura 3. 37:** Relación de hinchamiento de las muestras, según las composiciones de la **tabla 3.3**, en agua destilada y a temperatura 209

ambiente en función del tiempo.

Figura 3.38: *EWC* de las muestras, según las composiciones de la **tabla 3.3**, en agua destilada y a temperatura ambiente en función del tiempo. 210

Figura 3.39: Detalle de la **figura 3.38**. 211

Figura 4.1: Micrografía SEM de las microesferas de PEMA polidispersas tal y como las suministra el proveedor, con un diámetro medio de aproximadamente $412 \pm 119 \mu\text{m}$ en la que se muestran algunas microesferas huecas que están rellenas de otras más pequeñas. Barra de escala $700 \mu\text{m}$. 225

Figura 4.2: Micrografía SEM del *template* de PEMA obtenido donde se señalan con flechas blancas algunos cuellos de interconexión. Barra de escala 1 mm. 231

Figura 4.3: Micrografía SEM del *template* de PEMA en el que se muestra mediante flechas blancas algunos cuellos de interconexión entre las microesferas. El número 1 corresponde a una microesfera hueca rellena al menos con una microesfera que también está sinterizada con la microesfera que la contiene (microesfera 1). Barra de escala $300 \mu\text{m}$. 232

Figura 4.4: Micrografía SEM del *template* de PEMA en la que se muestran los distintos tipos de microesferas utilizadas. Barra de escala 2 mm. 233

Figura 4.5: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de quitosano al 2.9% en peso. La superficie exterior de la muestra se puede ver a la izquierda de la imagen. Barra de escala 1 mm. 234

Figura 4.6: Fotografía digital de los *scaffolds* de quitosano con diferentes formas geométricas obtenidos mediante la modificación del método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas. 236

Figura 4.7: Micrografías SEM de la superficie exterior del *scaffold* de quitosano al 0.8% en peso (a) y de las secciones transversales de los *scaffolds* de quitosano al 1.5% en peso (b) y 2.9% en peso (c). Barra de 237

escala 1 mm.

Figura 4.8: Micrografías SEM de la sección transversal en el núcleo interno de los *scaffolds* de quitosano con diferentes contenidos de quitosano: (a) 0.8% en peso, (b) 1.5% en peso y (c) 2.9% en peso. Barra de escala (a), (b) y (c) 3, 1 y 2 mm respectivamente. 238

Figura 4.9: Detalle de la morfología de los poros y de las gargantas de interconexión en la región exterior (a) y en el núcleo interno (b) del *scaffold* de quitosano al 0.8% en peso. Barra de escala 200 μm . 239

Figura 4.10: Micrografía SEM representativa de la sección transversal del *scaffold* de quitosano al 2.9% en peso mostrando el gradiente de densificación. Barra de escala 600 μm . 241

Figura 4.11: Micrografías SEM de los *microscaffolds* de quitosano al 0.8 % en peso (a), 1.5% en peso (b), 2.9% en peso (c) y 0.8% en peso (d). Barra de escala (a), (b), (c) y (d) 100, 200, 80 y 60 μm respectivamente. 242

Figura 4.12: Imágenes estereoscópicas de los *scaffolds* de gelatina al 25 % en peso obtenidos mediante la modificación del método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas con diferentes formas geométricas, paralelepípeda (a) y cúbica (b). Barra de escala (a) y (b) 2 y 1 mm respectivamente. 244

Figura 4.13: Micrografías SEM de los *scaffolds* de gelatina al 25% en peso en las que se muestra la estructura interna. Barra de escala 1 mm. 245

Figura 4.14: Micrografías SEM en las que se muestra en detalle la morfología esférica de los poros y las gargantas de interconexión del *scaffold* de gelatina al 25% en peso. Barra de escala de izquierda a derecha y de arriba abajo, 900, 800, 400 y 200 μm . 246

Figura 4.15: Micrografía SEM de la región exterior (derecha) e interior (izquierda) del *scaffold* de gelatina al 25% en peso. Barra de escala 2 mm. 248

Figura 4.16: Micrografías SEM de los *microscaffolds* de gelatina al 25% en peso. Barra de escala (a), (b) y (c) 100, 200 y 100 μm respectivamente. 249

Figura 4.17: Micrografías SEM de los *scaffolds* de agarosa al 2.9% en 251

peso. Barra de escala de izquierda a derecha y de arriba abajo 1 y 1mm y 600 y 600 μm respectivamente.

Figura 4.18: Micrografías SEM en las que se muestra en detalle la morfología esférica de los poros y las gargantas de interconexión del *scaffold* de agarosa al 2.9% en peso. Barra de escala de izquierda a derecha y de arriba abajo 300, 100 y 400 μm respectivamente. 252

Figura 4.19: Micrografía SEM del *microscaffold* de agarosa al 2.9% en peso. Barra de escala 100 μm . 253

Figura 4.20: Micrografías SEM de los *scaffolds* de agarosa al 2.9% en peso cubiertos por una fina membrana de agarosa. Barra de escala (a), (b) y (c) 3, 2 y 2 mm respectivamente. 254

Lista de tablas

	Página
Tabla 1.1: Selección de biomateriales clasificados según su naturaleza con ejemplos de sus aplicaciones en dispositivos médicos (Binyamin, 2006).	73
Tabla 1.2: Ventajas y desventajas de materiales que se utilizan en el cuerpo humano (Park, 2000).	75
Tabla 1.3: Técnicas estándar de esterilización y su aplicación para el PLA-PGA (Athanasίου et al. 1996).	89
Tabla 2.1: Condiciones de presión, número de piezas y tiempo utilizadas para la obtención del <i>template</i> porogénico 3D. Donde N° representa número. La muestra (-) se estropeó.	136
Tabla 2.2: Sistemas preparados en este estudio. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.	139
Tabla 3.1: Diámetro de los monofilamentos de los <i>templates</i> utilizados en este estudio donde M indica monofilamento.	177
Tabla 3.2: Polímeros obtenidos con distintas estructuras macromoleculares y composiciones.	182
Tabla 3.3: Composición de las muestras, donde R e I indican red polimérica e IPN respectivamente, M muestra y T ^a es la temperatura de secado. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.	182
Tabla 3.4: Porosidad de los <i>scaffolds</i> y densidad aparente (de los <i>scaffolds</i> y las muestras), mediante los procedimientos 3.2.2.4.1 y 3.2.2.4.2 (antes de eliminar el <i>template</i>), obtenidos a partir de tela de PAN según el procedimiento 3.2.2.1 con una estructura macromolecular de red y de IPN. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso.	203
Tabla 3.5: Densidad aparente de los <i>scaffolds</i> y las muestras según los métodos 3.2.2.4.1 y 3.2.2.4.2 respectivamente con una estructura	204

macromolecular de IPN obtenidas según el método 3.2.2.2. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.

Tabla 3.6: Porosidad de los *scaffolds* obtenidos a partir de monofilamentos de PAN según el procedimiento 3.2.2.2 con una estructura macromolecular de IPN. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso. 204

Tabla 3.7: Porcentaje en masa de monofilamentos utilizados para la obtención de los *scaffolds* (Monof.), densidad aparente de las muestras y porosidad de los *scaffolds* obtenidos a partir de monofilamentos de PAN según el procedimiento 3.2.2.2 con una estructura macromolecular de red donde D. a. m representa la densidad aparente según el método. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso. 205

Tabla 4.1: Medidas de los tamaños de poro, de los tamaños de las gargantas de interconexión y la porosidad de los distintos *scaffolds* de quitosano obtenidos, donde C. es la concentración, D. m. p es el diámetro medio de los poros y D. m. g. i es el diámetro medio de las gargantas de interconexión. 256

Tabla 4.2: Medidas de la porosidad de los distintos *scaffolds* de gelatina y agarosa obtenidos. 256

Tabla 6.1: Información de seguridad de las sustancias utilizadas. Donde NFPA, Inflam., Reactiv., T_r, TLV y nd representan: asociación nacional contra el fuego, inflamabilidad, reactividad, Flash point, valor límite umbral y no disponible respectivamente. 276

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Ingeniería de tejidos

1.1.1 Fundamentos de la ingeniería de tejidos

Prometeo, es un símbolo apropiado para la medicina regenerativa. Como castigo por robar el fuego a los dioses y dárselo a la humanidad, Zeus mandó encadenarlo a una roca y envió un águila para que comiese su hígado cada día. Sin embargo, el hígado de Prometeo fue capaz de regenerarse por si mismo cada día, lo que le permitió sobrevivir (Vacanti y Vacanti, 2007).

La medicina regenerativa es un campo multidisciplinar, relativamente nuevo, que tiene por objeto la sustitución, reparación o restauración de la función normal de órganos/tejidos dañados por medio de terapias seguras, efectivas y con consistencia, que utiliza células vivas administradas solas o en combinación con materiales especialmente diseñados (Polak, 2010).

Por lo tanto, el concepto de la regeneración de tejidos no es nuevo como lo demuestra la famosa leyenda de Prometeo (Polak, 2010).

1.1.1.1 Historia, definiciones y aplicaciones

Las enfermedades relacionadas con la edad son cada vez más importantes en las sociedades occidentales debido a que la esperanza de vida de la población ha aumentado. La mayoría de los problemas de salud que afectan a las personas mayores se producen cuando los órganos vitales y los tejidos son menos eficientes y no funcionan adecuadamente (Jones et al. 2006). Por otra parte, independientemente de la edad, también se producen pérdidas irreparables de tejido (Ikada, 2006) o insuficiencia de órganos (Kuling y Vacanti, 2004; Shieh y Vacanti, 2005) debido a lesiones traumáticas, cáncer, así como enfermedades autoinmunes o genéticas (Mikos, 2003).

Los tratamientos actuales incluyen la medicación, por ejemplo en los casos de dolor, presión arterial alta, diabetes etc, (Mikos 2003; Shieh y Vacanti, 2005) consiguiendo aumentar la esperanza de vida o mejorando la calidad de vida de estos pacientes. Sin embargo, la mayoría de los fármacos presentan efectos secundarios incluyendo la necrosis tisular y reacciones de hipersensibilidad entre otros (Williams, 1991). Además, en algunos casos el tratamiento farmacológico no funciona (Ikada, 2006).

Alternativamente, se dispone de los tratamientos quirúrgicos que utilizan prótesis artificiales, como pueden ser las prótesis de cadera para restablecer la función articular y los implantes que incluyen los marcapasos para regular el

ritmo cardiaco. Al igual que en el caso anterior, logran aumentar la esperanza de vida o mejorar la calidad de vida. Aunque, cada vez son más sofisticados, todavía están limitados para abordar las deficiencias estructurales o de volumen que acompañan a la pérdida de tejidos. Por otro lado, un problema importante es la distorsión y el rechazo del implante (Yuksel et al. 2005). Otra limitación surge cuando se utilizan en pacientes en edad de crecimiento, ya que las prótesis e implantes no crecen a medida que lo hace el paciente (Shieh y Vacanti, 2005; Samadikuchaksaraei, 2007). Un ejemplo concreto, lo podemos ver en la limitada vida útil de los implantes ortopédicos debido a que no tienen ni la capacidad para autoregenerarse, ni para mantener el suministro de sangre, ni para modificar su repuesta frente a estímulos como la carga mecánica a diferencia de los tejidos vivos que si lo hacen (Jones et al. 2006).

Otra opción son los trasplantes de tejidos, que incluyen los xenoinjertos, aloinjertos y autoinjertos. Los xenoinjertos son injertos de tejido procedente de otra especie, éstos tienen la ventaja de encontrarse en gran cantidad, pero tienen riesgos como el rechazo inmunológico, degeneración in situ y transmisión de enfermedades (Jones et al. 2006). Los aloinjertos son injertos de tejido de la misma especie pero con distinto genotipo, es decir trasplantes de otro paciente. Las limitaciones de los aloinjertos son la escasez de donantes (Rose et al. 2004), el riesgo de transmisión de enfermedades y el rechazo inmunológico (Jones et al. 2006). Los autoinjertos son injertos procedentes de la misma especie con el mismo genotipo, es decir injertos de tejido del propio paciente. Los autoinjertos son considerados el mejor método (Jones et al. 2006) ya que evitan muchos de los problemas asociados con el rechazo inmune (Thomson et al. 1995). Sin embargo, el trasplante de tejido autólogo similar es limitado o imposible si la pérdida de tejido es demasiado grande como en el caso de quemaduras graves, o si el tejido tiene funciones metabólicas especializadas. Como resultado, la utilidad del trasplante mediante autoinjertos es mayor cuando el objetivo es sustituir déficits estructurales o de volumen y no metabólicos. Por otro lado los autoinjertos presentan el problema adicional de la morbilidad en la zona donante (Rose et al. 2004; Yuksel et al. 2005).

El trasplante de órganos es otra opción y ha tenido éxito con órganos vitales como el hígado y los riñones. Sin embargo, también tiene limitaciones como la escasez de donantes de órganos y el riesgo permanente de complicaciones inmunológicas (Yuksel et al. 2005; Shieh y Vacanti, 2005).

Independientemente del reto científico e intelectual, existe una necesidad médica evidente de desarrollar alternativas a los trasplantes de órganos debido a la disparidad que hay en todo el mundo entre los pacientes en lista de espera para el trasplante de órganos y la disponibilidad de donantes de órganos (Zimmermann et al. 2006). En las **figuras 1.1** y **1.2**, se representa esta diferencia en los países del Eurotransplant y en Estados Unidos.

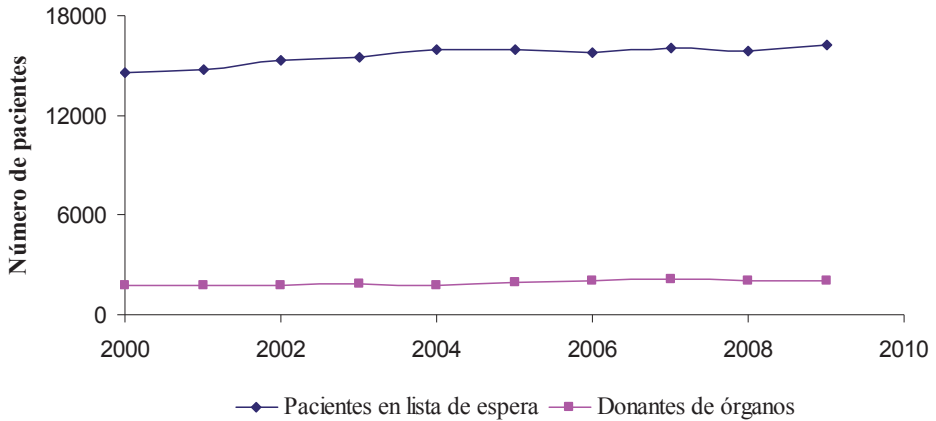


Figura 1.1: Datos estadísticos de países del Eurotransplant desde el año 2000 hasta el 2009. (Eurotransplant International Foundation, www.eurotransplant.nl, 2010).

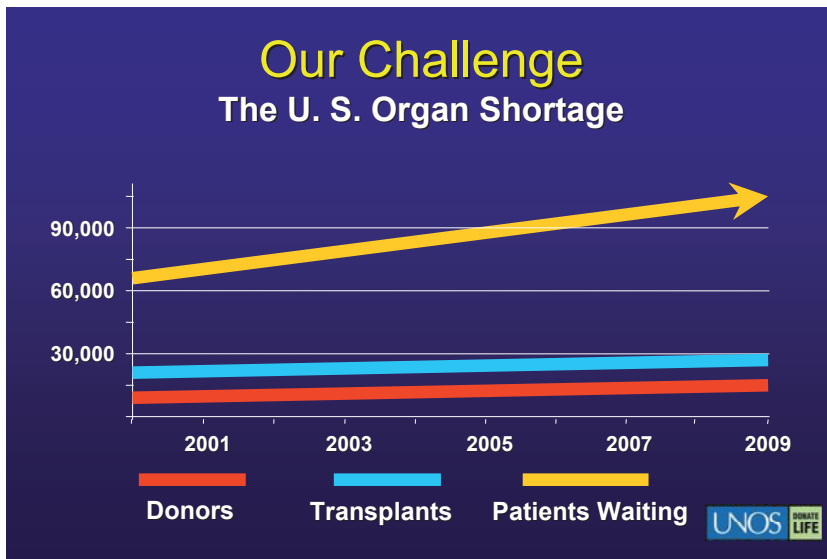


Figura 1.2: Datos estadísticos de los donantes de órganos, pacientes transplantados y pacientes en lista de espera en Estados Unidos desde el año 2000 al 2009. (United Network for Organ Sharing, http://www.unos.org/docs/About_UNOS.ppt, 2010).

Ante la tremenda necesidad de órganos y tejidos así como todos los problemas mencionados anteriormente, surge el concepto de ingeniería de tejidos (Drury y Mooney, 2003; Yuksel et al. 2005; Lv et al. 2005; Khamdemhosseini et al. 2005), cuando varios investigadores se dieron cuenta

de que cuando las células se colocaban lo suficientemente cerca entre sí formaban estructuras idénticas a las formadas por estas células en un cuerpo vivo (Jagur-Grodzinski, 2006). De esta forma surge una posible alternativa a la reconstrucción (Ikada, 2006) y al transplante de tejidos y órganos (Falke y Atala, 2000).

El término ingeniería de tejidos fue oficialmente definido en 1988 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias por Salak y Fox como:

“...la aplicación de los principios y los métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida hacia el conocimiento fundamental de las relaciones entre estructura y función en tejidos de mamíferos normales y patológicos; y el desarrollo de los sustitutos biológicos para recuperar, mantener o mejorar la funcionalidad de los tejidos” (Samadikuchaksaraei, 2007; Hutmacher et al. 2007).

Sin embargo, Langer y Vacanti en 1993, condensaron la definición anterior como:

“...un campo interdisciplinar en el que se aplican los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida con el objeto de desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido u órgano” (Langer y Vacanti, 1993).

También podemos encontrar en la literatura otras definiciones más o menos similares a la anterior.

Posteriormente, se introdujo el término medicina regenerativa con el surgimiento de las células madre. Para algunos investigadores, el término medicina regenerativa se reserva para la tecnología con células madre, mientras que para otros es un término amplio en el que la ingeniería de tejidos representa únicamente sustitución y no reparación o regeneración. En cambio, otros investigadores utilizan los dos términos indistintamente (Vacanti y Vacanti, 2007).

Con este nuevo término así como de las áreas que incluye, el National Institute of Health (NIH) en 2008 definió la ingeniería de tejidos /medicina regenerativa como (National Institute of Health, <http://www.tissue-engineering.net/index.php?seite=whatiste>, 2008):

“...un campo multidisciplinar emergente que comprende a la biología, medicina, e ingeniería que es probable que revolucione las formas de mejorar la salud y la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo por restablecer, mantener, o mejorar la función del tejido y órgano. Además de tener una aplicación terapéutica, donde el tejido es cultivado en un paciente o fuera del paciente y transplantado, la ingeniería de tejidos puede tener aplicaciones donde el tejido se hace *in vitro* y se utiliza para evaluar el

metabolismo y la respuesta de fármacos, la toxicidad y la patogenicidad. El fundamento de la ingeniería de tejidos/medicina regenerativa ya sea para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico es la capacidad de explotar las células vivas. La investigación de la ingeniería de tejidos incluye las siguientes áreas:

- 1) Biomateriales: incluyendo biomateriales novedosos que están diseñados para dirigir la organización, el crecimiento y diferenciación de las células en el proceso de formación del tejido funcional, proporcionando tanto señales físicas como químicas.
- 2) Células: incluyendo la habilitación de metodologías para la proliferación y diferenciación de las células, la adquisición de la fuente apropiada de células como las células autólogas, las células alogénicas, las células xenogénicas, las células madre, las células de ingeniería genética y la manipulación inmunológica.
- 3) Biomoléculas: incluyendo los factores angiogénicos, factores de crecimiento, factores de diferenciación y proteínas morfogénicas óseas.
- 4) Aspectos de diseño ingenieriles: incluyendo la expansión celular en dos dimensiones, el crecimiento de tejidos en tres dimensiones, bioreactores, vascularización, el transporte y almacenamiento de células y tejidos (envases biológicos).
- 5) Aspectos biomecánicos del diseño: incluyendo las propiedades de los tejidos nativos, la identificación de las propiedades mínimas requeridas de los tejidos de ingeniería, las señales mecánicas que los regulan, y su eficacia y seguridad.
- 6) Informática para apoyar la ingeniería de tejidos: secuenciación de genes y proteínas, análisis de expresión genética, expresión de proteínas y el análisis de la interacción, análisis de imagen celular cuantitativo, análisis de tejido cuantitativo, simulación computacional de tejido y modelado celular, fabricación de tejido digital, sistemas automatizados de control de la calidad, herramientas de extracción de datos (*data mining tools*), e interfaces informáticas clínicas”.

Según la definición anterior, podemos decir que las aplicaciones de la ingeniería de tejidos se pueden clasificar de una forma amplia en aplicaciones terapéuticas, donde el tejido crece en el paciente o fuera de él y se transplanta, y aplicaciones de diagnóstico, donde el tejido se fabrica *in vitro* y se utiliza para evaluar la toxicidad, patogenicidad, metabolismo de fármacos, etc (Griffith, 2002).

La idea de la ingeniería tisular se forjó con la unión de la experiencia ganada en diversos campos, como la biología celular, la bioquímica y la biología

molecular y su posterior aplicación a la ingeniería de nuevos tejidos. El rol de la ingeniería química y biológica fue fundamental para la aplicación racional de los principios de los sistemas vivos. La tercera arma de conocimiento fue proporcionada por la terapéutica humana dada por médicos y cirujanos (Falke y Atala, 2000).

Hoy, muchos grupos de investigación y científicos de diversas áreas colaboran activamente para desarrollar tejidos análogos que permitan a los médicos mejorar, mantener y restaurar la función de un órgano (Falke y Atala, 2000). En la **figura 1.3**, se muestra una visión general del campo multidisciplinar de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (Hutmacher et al. 2007).

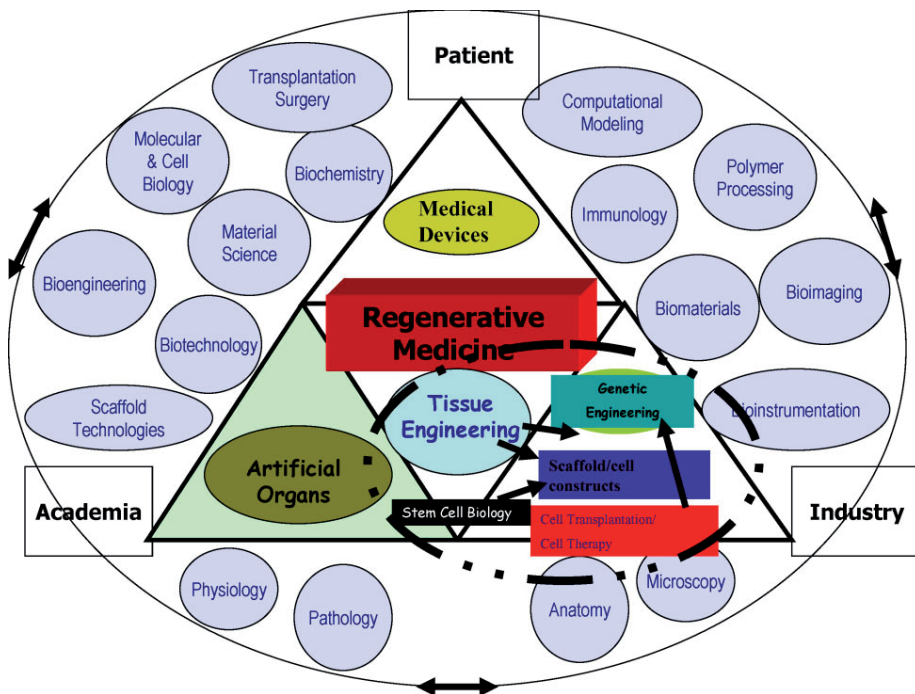


Figura 1.3: Visión general del campo multidisciplinar de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (Hutmacher et al. 2007).

1.1.1.2 Estrategias de la ingeniería de tejidos

En general, las estrategias de la ingeniería tisular se clasifican dentro de tres categorías: 1) utilización de células aisladas, 2) utilización de *scaffolds* acelulares que sean capaces de inducir la regeneración de tejido, y 3) utilización

de células y *scaffolds*. Cada una de estas estrategias se puede reforzar con factores microambientales *in vitro* antes de su aplicación como sustituto de los tejidos. En la **figura 1.4**, se muestran las tres estrategias (Shanmugasundaram et al. 2001; Khamdemhosseini et al. 2005).

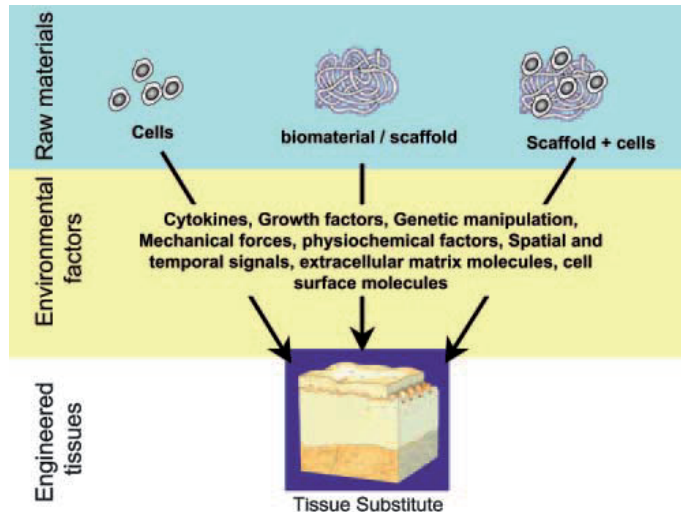


Figura 1.4: Clasificación de las tres estrategias de la ingeniería de tejidos. 1) Células aisladas, 2) *scaffolds* y 3) células con *scaffolds*. (Khamdemhosseini et al. 2005).

Sin embargo, otros autores entienden que el concepto subyacente de la ingeniería de tejidos es fabricar tejidos nuevos y funcionales utilizando células vivas, que suelen ir ligadas, de alguna manera con una matriz o *scaffold* para guiar el desarrollo del tejido (Vacanti y Vacanti, 2007; Hodges y Atala, 2008), es decir las estrategias 2 y 3 mencionadas anteriormente. En la estrategia 3, se aíslan células del paciente por medio de una pequeña biopsia, se expanden en el cultivo, se siembran en un *scaffold* tridimensional y finalmente se implanta en el mismo paciente (Yang et al. 2001; Ikada, 2006; Rezwan et al. 2006). En la **figura 1.5**, se pueden ver las distintas etapas implicadas en la ingeniería de tejidos según la estrategia 3, donde: las células se aíslan del paciente (a) y se cultivan *in vitro* en superficies dimensionales para conseguir una expansión eficiente (b). A continuación, las células se siembran en *scaffolds* junto con factores de crecimiento, pequeñas moléculas y micro y/o nanopartículas. Los *scaffolds* sirven como soporte mecánico y como material que determina la forma, y sus poros proporcionan la transferencia de masa y eliminación de desechos (c). La "construcción" se cultiva aún más en bioreactores para proporcionar las condiciones óptimas para la organización en tejidos funcionales (d). Posteriormente la "construcción" se transplanta en el defecto para restaurar

la función (e) (Dvir et al. 2011). Alternativamente, mediante la estrategia 2, las células pueden migrar al *scaffold* después de la implantación de éste, es decir, un proceso de regeneración *in vivo* sin ninguna etapa *in vitro* (Thomson et al. 1995; Rezwan et al. 2006; Vacanti y Vacanti, 2007). Algunos autores denominan a este último proceso regeneración de tejidos en lugar de ingeniería de tejidos (Eisenbarth, 2007).

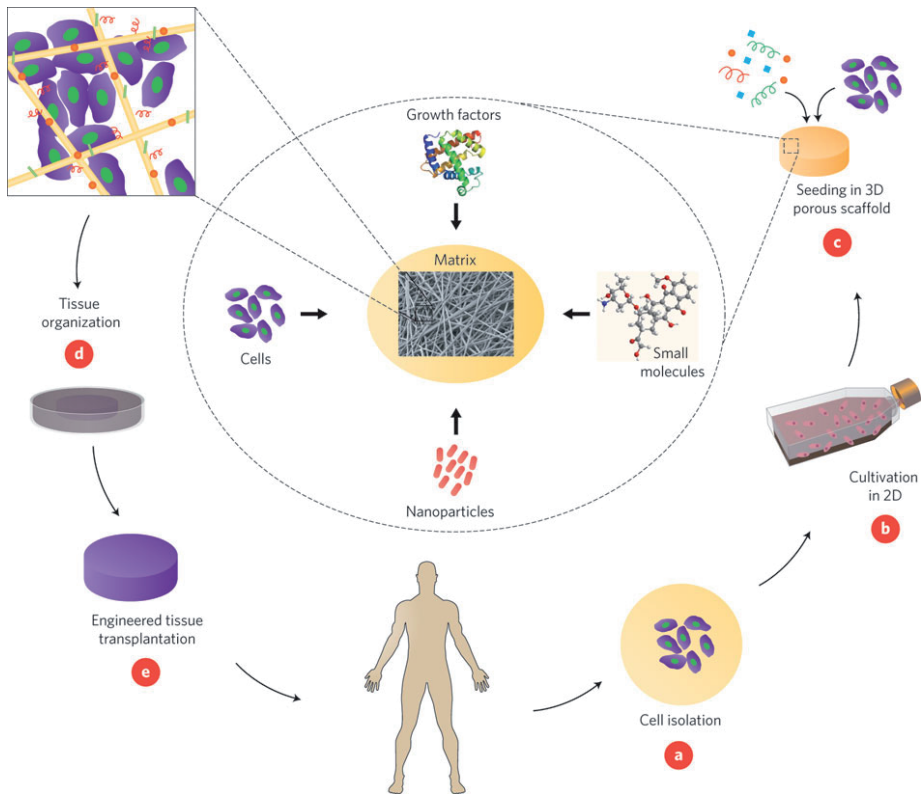


Figura 1.5: Etapas implicadas en la ingeniería de tejidos según la estrategia 3 (Dvir et al. 2011).

La estrategia 1, está basada únicamente en células a diferencia de las estrategias 2 y 3 que utilizan *scaffolds*. Esta técnica también se define como trasplante celular y consiste en que las células (por ejemplo: condrocitos con un colgajo periostial, miocardiocitos en el músculo cardiaco, células de la médula ósea hematopoyéticas) en un volumen pequeño y láminas celulares (células más matriz extracelular (ECM), por ejemplo: piel cultivada en láminas epidérmicas), se inyectan o transplantan en el cuerpo (Hutmacher et al. 2007).

Podemos encontrar en el mercado productos que se han desarrollado mediante esta técnica a partir de células autólogas. Concretamente, Genzyme Biosurgery ha desarrollado Epicel® (producto permanente para reemplazar piel de pacientes con quemaduras graves) y Carticel® (producto basado en condrocitos para lesiones del cartílago articular). En los dos casos, las células se obtienen a partir de una pequeña biopsia del tejido del paciente. Estas células se expanden mediante cultivos y finalmente se implantan en el paciente (Furth y Atala, 2008). La diferencia entre Epicel® y Carticel® estriba en que en el caso de Epicel®, las células extraídas del paciente se cultivan en una capa de células de ratón, obteniéndose láminas que posteriormente se transplantan en el paciente; mientras que en el caso de Carticel® no se transplantan láminas si no que se inyectan células. En la **figura 1.6**, se muestran las distintas etapas para la obtención de Carticel®.

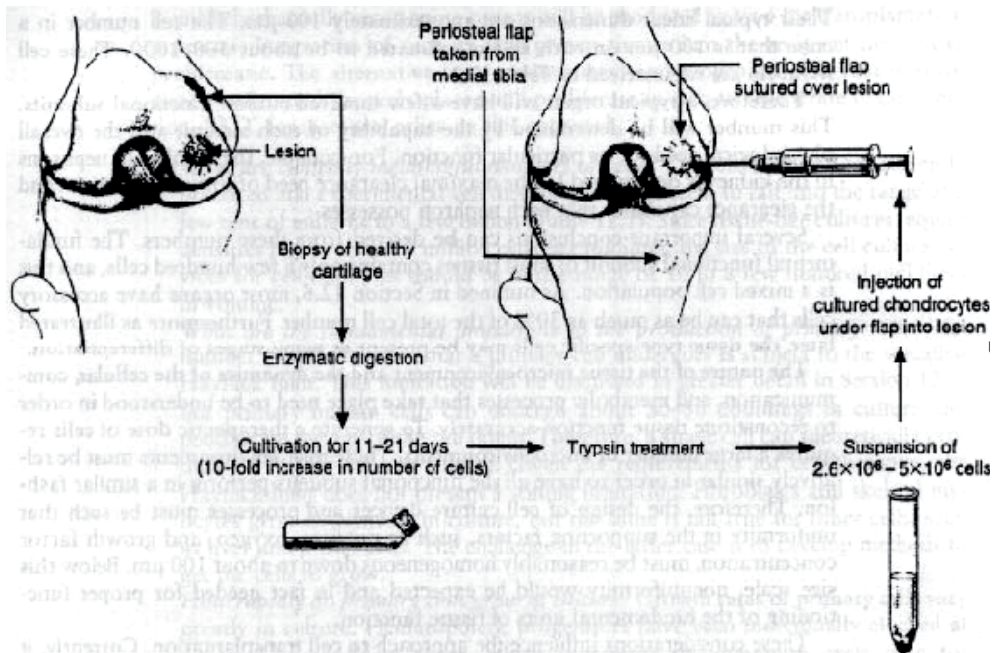


Figura 1.6: Transplante de condrocitos en el cóndilo femoral derecho. Las células se aíslan por medio de una digestión enzimática de tejido normal. Posteriormente, se cultivan en medios específicos para aumentar el número de células y finalmente se implantan en el paciente (Tubo, 2008).

Aunque se han desarrollado productos mediante la terapia con células como se ha visto anteriormente; muchos tipos de células aisladamente no son capaces

de formar tejidos por si mismas (Schugens et al. 1996a; Mikos et al. 1996; Yang et al. 2002; Sachlos y Czermuszka, 2003; Zhou et al. 2005). Además, tanto la regeneración de piel como la de cartílago mediante células tienen limitaciones; en el caso de la regeneración de piel, un problema clínico es la formación de cicatrices (Gerlach et al. 2008) y en la regeneración de cartílago nos encontramos con limitaciones como el limitado potencial de los condrocitos para expandirse, así como la tendencia a desdiferenciarse en monocapas y no sintetizar matriz cartilaginosa (Shah et al. 2008).

En los tejidos vivos, las células, de acuerdo a su información genética y a su entorno forman estructuras tridimensionales (Falke y Atala, 2000; Jones et al. 2006; Liu et al. 2008) que contribuyen de forma significativa al desarrollo de la función biológica de los tejidos y proporcionan las condiciones adecuadas de nutrición y la organización espacial de las células (Wintermantel et al. 1996). Las células aisladas pueden modificar su microentorno localmente (Isenberg y Wong, 2006), pero no pueden reproducir la complejidad del entorno natural de la célula (Evans et al. 2006) y rara vez son capaces de organizarse en los niveles requeridos para desarrollar la función de los tejidos (Evans et al. 2006; Isenberg y Wong, 2006). En cultivos *in vitro*, las células no crecen formando estructuras tridimensionales que definan la forma anatómica del tejido si no que migran aleatoriamente formando estructuras (capas) bidimensionales de células (Sachlos y Czermuszka, 2003).

Se sabe que la composición química, biológica y la organización estructural de los tejidos son factores clave para la función de éstos (Isenberg y Wong, 2006) y por otro lado se ha demostrado que la organización tridimensional de las células a menudo está relacionada con la adhesión celular (una de las primeras interacciones que ocurren entre la célula y la ECM) (Nori et al. 2008). La ECM está compuesta por diversas moléculas como colágeno, glicoproteínas, ácido hialurónico, proteoglicanos, glucosaminoglicanos, elastina y fibrina, además de otras tales como factores de crecimiento, citoquinas y diversos enzimas. La ECM tiene múltiples funciones pero, en general, proporciona los sitios de adhesión para las células, controla en gran medida las propiedades mecánicas del tejido y sirve como una plantilla que guía y mantiene las relaciones espaciales entre distintos tipos de células para conseguir la función apropiada del tejido (Isenberg y Wong, 2006). La interacción dinámica entre las células y la ECM contribuye a la migración celular, proliferación, diferenciación, forma, metabolismo y la consecuente muerte celular (Falke y Atala, 2000).

Los trasplantes de células son principalmente útiles para la sustitución de pequeñas áreas de tejido (Stocum, 2008). Por lo general, la regeneración natural y la reparación de un defecto de tejido de gran tamaño mediante el suministro de células únicamente, para el sitio defectuoso, son difíciles debido a que la ECM también se pierde durante el proceso de lesión (Huang y Fu, 2010).

Por otro lado, también se sabe que muchos tipos de células son dependientes del anclaje celular (Thomson et al. 1995; Yang et al. 2002; Hodges y Atala, 2008), es decir, su función depende de las interacciones específicas entre el sustrato (ECM) y la célula, y por tanto transplantar directamente este tipo de células sin un soporte conlleva a la muerte celular (Hodges y Atala, 2008) o a la pérdida de la función (Thomson et al. 1995). En otras palabras, las células requieren microentornos específicos que incluyen la presencia de un sustrato para que puedan proliferar y desarrollar su función específica o diferenciarse (Schugens et al. 1996a; Mikos et al. 1996; Shieh y Vacanti, 2005; Huang y Fu, 2010).

Por tanto, combinar células con *scaffolds* para producir tejidos y órganos se ha convertido en el procedimiento mayoritario en el campo de la ingeniería de tejidos (Rosso et al. 2004; Shieh y Vacanti, 2005), es decir las estrategias 2 y 3 mencionadas anteriormente; donde los *scaffolds* actúan como un *template* para guiar la formación de tejido nuevo y como sustratos para promover la adhesión celular, manteniendo la función diferenciada sin dificultar la proliferación (Shanmugasundaram et al. 2001; Thomson et al. 2000; Mao et al. 2003; Vats et al. 2003; Peppas et al. 2006). Es decir, actúan como una ECM artificial (Mao et al. 2003; Ikada, 2006; Hodges y Atala, 2008) para organizar a las células en estructuras tridimensionales (Drury y Mooney, 2003) imitando la estructura del tejido nativo (Khamdemhosseini et al. 2005).

Podemos deducir, que la ingeniería de tejidos utiliza tres factores clave para la creación de tejidos y órganos que son: células, factores microambientales (señales químicas y mecánicas con el fin de “persuadir” a las células de que formen tejidos) (Griffith, 2002) y *scaffolds* (Mikos, 2003; Vats et al. 2003; Ikada, 2006; Hutmacher et al. 2007)

1.1.1.2.1 Células

El punto de partida para cualquier intento a la hora de diseñar un “sustituto” ya sea de un tejido u órgano, es tener en cuenta qué células (procedencia, origen) se van a utilizar, que no tengan patógenos ni contaminantes, así como disponer de una cantidad suficiente (Nerem, 2007). Obtener una adecuada “fuente” de células es un gran desafío ya que la capacidad de expansión de muchos tipos de células de tejidos adultos es limitada (Liu et al. 2008) y en otras ocasiones, no son accesibles fácilmente (Shieh y Vacanti, 2005).

En la ingeniería de tejidos, hay distintos tipos de células que se pueden utilizar (Vats et al. 2003; Cortesini, 2005); si nos basamos en el origen, las células se clasifican en: autólogas, alogénicas y xenogénicas (Ikada, 2006) donde cada una de ellas tiene sus ventajas e inconvenientes como se mencionó anteriormente.

Las células, también las podemos clasificar en función del grado de diferenciación (Ikada, 2006); éstas pueden ser: células maduras (células diferenciadas) o células madre. Las células madre son células no diferenciadas que son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en distintos tipos de células (Shieh y Vacanti, 2005) e incluyen células madre adultas, células madre embrionarias y células madre germinales (Vats et al. 2003; Cortesini, 2005; Nerem, 2007; Ahsan et al. 2008).

Las células madre adultas, son células no diferenciadas que se encuentran en tejidos diferenciados (Department of Health and Human Services, 2001) y son capaces de formar más de un tipo de célula pero normalmente dentro del mismo linaje, es decir son multipotentes (Ahsan et al. 2008). Las células madre embrionarias proceden de la masa celular interna del blastocisto, (una etapa temprana del embrión (4-5 días)) y son pluripotentes, es decir pueden diferenciarse en los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo) (Zimmermann et al. 2006) y las células madre germinales, se aíslan de la cresta gonadal del embrión que finalmente da lugar a los óvulos y espermatozoides en el adulto y al igual que las embrionarias son pluripotentes (Ahsan et al. 2008). En la **figura 1.7**, se muestra la diferenciación de los tejidos humanos.

Una de las principales razones por las que las células madre han atraído tanta atención en los últimos años es por su alta capacidad para proliferar (Samadikuchaksaraei, 2007); de todas ellas, hay un interés considerable por las células madre germinales (Ikada, 2006) y células madre embrionarias ya que éstas pueden diferenciarse en todos los tipos de células (Evans et al. 2006; Nerem, 2007) además de proliferar en un estado no diferenciado pero pluripotente (Cortesini, 2005).

Aunque como se ha mencionado anteriormente las células madre germinales y embrionarias tienen la ventaja de tener el mayor potencial para diferenciarse en diferentes tejidos (Evans et al. 2006), por cuestiones éticas y legales aún están en debate (Shieh y Vacanti, 2005; Cortesini, 2005; Nerem, 2007).

Una alternativa posible para generar células madre embrionarias evitando las controversias éticas y políticas es la clonación terapéutica, también denominada transferencia nuclear o clonación nuclear donde el núcleo de una célula somática se inyecta en un oocito enucleado no fertilizado, para generar un embrión (Freshney et al. 2007). Teóricamente, esta técnica proporciona una "fuente" ilimitada de células transplantables (Cortesini, 2005).

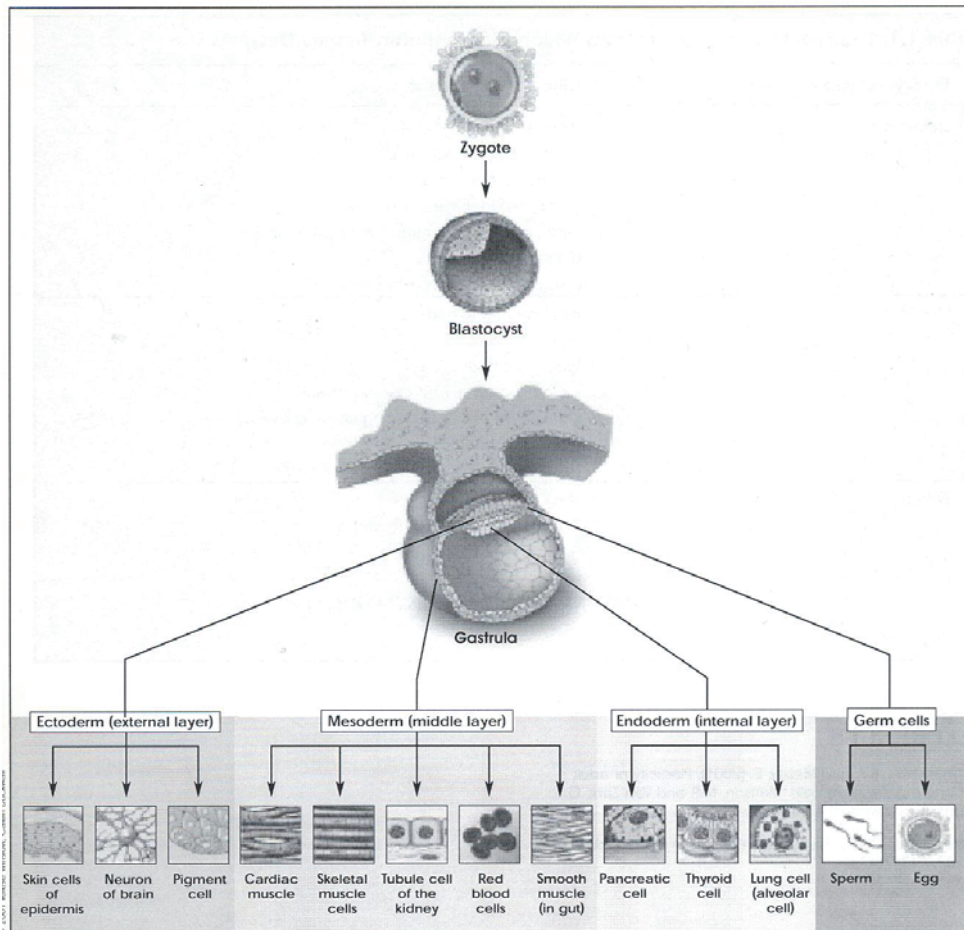


Figura 1.7: Diferenciación de tejidos humanos (Department of Health and Human Services, 2001).

1.1.1.2.2 Scaffolds

La ingeniería de tejidos utiliza ECM artificiales para formar tejidos nuevos a partir de células. Estas ECM artificiales se diseñan para poner en contacto los tipos de células deseados en un entorno tridimensional adecuado (Khamdemhossseini et al. 2005), también para proporcionar el soporte mecánico necesario hasta que los tejidos nuevos que se forman estén estructuralmente estabilizados y para que se den las señales específicas que guían la expresión genética de las células que forman el tejido (Levenberg et al. 2004). Una aproximación para diseñar las ECM artificiales para la ingeniería de tejidos, es imitar, tanto como sea posible, la estructura y función biológica de la

ECM nativa tanto en su composición química como en su estructura física (Hosseinkhani et al. 2006), es decir, imitar las funciones de las moléculas de la ECM que se hallan en los tejidos. Esta ECM nativa, actúa como un andamiaje para que las células estén lo suficientemente próximas para que se ensamblen y formen tejidos, controla la estructura del tejido y regula el fenotipo celular (Rosso et al. 2004).

De esta forma, con la selección del tipo de célula, el siguiente reto en imitar a la naturaleza es desarrollar una arquitectura tridimensional organizada con características funcionales que imiten a un tejido específico, y/o un “vehículo” de reparto para las células. De hecho, debido a la interrelación de la estructura y función en las células y tejidos, sería poco probable tener las características funcionales adecuadas sin la arquitectura apropiada en tres dimensiones (Nerem, 2007). Estas arquitecturas tridimensionales (*scaffolds*), se definen como biomateriales sólidos porosos tridimensionales (Freed y Guilak, 2007) que intentan imitar la función de la ECM (Salvay y Shea, 2006; Huang y Fu, 2010) y sus funciones principales son: 1) servir como sustrato para la adhesión de las células, facilitando la localización y liberación (suministro) de las células a los lugares específicos del cuerpo cuando se implantan, 2) proporcionar un soporte mecánico temporal para el tejido nuevo que ha crecido, definiendo y manteniendo una estructura tridimensional y 3) guiar el desarrollo de nuevos tejidos con la función apropiada (Rosso et al. 2004; Jardini et al. 2010).

Así, la ECM artificial (*scaffold*) debe proporcionar el soporte mecánico suficiente para soportar las fuerzas *in vivo* y mantener un espacio potencial para el desarrollo del tejido (Hodges y Atala, 2008). Además, este soporte mecánico (*scaffold*) debe mantenerse hasta que el tejido formado tenga suficiente integridad mecánica para sostenerse por él mismo y por otro lado, las células que componen el tejido formado deben expresar los genes adecuados para mantener la función específica de los tejidos formados (Rosso et al. 2004).

1.1.1.2.3 Factores microambientales

El microentorno celular es una red de componentes estructurales y funcionales que proporcionan estímulos mecánicos y químicos que influyen en la función y destino celular (Owen y Schoichet, 2010). Entender como utilizar microentornos artificiales para controlar la función celular y encontrar el *scaffold* adecuado para facilitar este control, son las piedras angulares para futuros esfuerzos en la ingeniería de tejidos (Liu et al. 2008).

La función de las células *in vivo* está dirigida por muchas señales. Estas señales, incluyen moléculas y el entorno mecánico, es decir, las fuerzas físicas a las que la célula y la ECM está expuesta. Por tanto, el microentorno celular es un

factor importante si queremos reproducir exactamente las características del tejido nativo mediante la ingeniería de tejidos (Vacanti y Vacanti, 2007).

Las células, que componen los tejidos que se producen mediante la ingeniería de tejidos, deben expresar los genes adecuados para mantener la función específica del tejido creado. La función de las células sembradas depende en gran medida de: 1) los receptores específicos de la superficie de las células (por ejemplo, las integrinas, una superfamilia de glicoproteínas de membrana que participan en la adhesión de células con la ECM y de una célula con otra célula, siendo consideradas como el mayor y más importante grupo de receptores para proteínas de la ECM) que las células utilizan para interactuar con el biomaterial, 2) las interacciones con el entorno de las células y 3) la presencia de factores de crecimiento (proteínas que se segregan de forma endógena en el cuerpo por las mismas células (autocrina) o como resultado de la comunicación con las células vecinas (paracrina) y juegan un papel clave en la proliferación y diferenciación de las células)(Rosso et al. 2004; Ikada, 2006).

Los factores mencionados anteriormente, se pueden controlar mediante la incorporación o integración de distintas señales en la ECM artificial (*scaffold*). Estas señales pueden ser moléculas biológicamente activas o el resultado de someter a la ECM artificial a estímulos mecánicos (Rosso et al. 2004).

Moléculas biológicamente activas, como las moléculas de adhesión celular (fibronectina, colágeno IV, y muchas otras) y los factores de crecimiento, proporcionan a las superficies del biomaterial las propiedades de adhesión que son adecuadas para la fijación de determinados tipos de células. Las moléculas biológicamente activas interactúan con las células a través de los receptores de la superficie celular, o inician las vías de señalización intracelulares, que desencadenan la expresión o represión de genes, y alteran los productos proteínicos que regulan el comportamiento celular. Por tanto, la incorporación selectiva de moléculas biológicamente activas en los *scaffolds* hace posible un ajuste fino del comportamiento de la célula (Zhang et al. 2005).

El otro tipo de señales que representan un aspecto importante durante el desarrollo de un tejido u órgano son las fuerzas mecánicas del entorno. Fuerzas mecánicas, tales como la gravedad, el esfuerzo cortante, compresión, tensión, vibración y presión, influyen en el desarrollo del tejido ya que dirigen los comportamientos celulares (Zhang et al. 2005) a través de un mecanismo denominado mecanotransducción. Este mecanismo consiste en que cuando se aplica una fuerza a las células que crecen en los *scaffolds*, éstas perciben los cambios en el entorno físico y transmiten la señal mecánica a las señales bioquímicas intracelulares a través de las señales de transducción (Nori et al. 2008).

En resumen, la ingeniería de tejidos es un campo emergente e interdisciplinar de la ingeniería biomédica y tiene por objeto la regeneración de nuevos tejidos biológicos para la sustitución de tejidos u órganos dañados con células sembradas y cultivadas en “*scaffolds* inteligentes” (Rosso et al. 2004). Según Gupta, la inteligencia de un material es la capacidad de éste para recibir, transmitir o procesar un estímulo y responder mediante la producción de un efecto útil. Por ejemplo, los hidrogeles son “inteligentes” en el sentido de que pueden percibir estímulos y responder mostrando cambios en su estado físico o comportamiento químico dando lugar a la liberación de forma controlada de medicamentos (Gupta et al. 2002).

Desde un punto de vista ingenieril y de la ciencia de los materiales, los tejidos se pueden considerar como *composites* celulares que constan de células y ECMs (Mao et al. 2003). Las células sintetizan matrices de tejidos nuevos, mientras que el *scaffold* (ECM artificial) proporciona el entorno apropiado a las células para poder cumplir sus funciones de manera eficaz (Ikada, 2006). En otras palabras, las ECM artificiales proporcionan señales a las células mientras las células sintetizan sus propias ECMs (Mao et al. 2003). La función de las moléculas biológicamente activas es facilitar y promover a las células para que regeneren tejidos nuevos (Jagur-Grodzinski, 2006; Hutmacher et al. 2007). En la actualidad, algunos productos están disponibles en el mercado de la ingeniería de tejidos de la piel y cartílago.

Se espera que los tejidos producidos mediante la ingeniería de tejidos puedan ofrecer una alternativa a las terapias actuales para tratar la pérdida o insuficiencia de la función del tejido. El desarrollo de ECMs sintéticas es un componente crítico de este campo y la investigación en esta área se basa en el entendimiento de las moléculas de la ECM nativa y sus interacciones con las células vivas. Las matrices desarrolladas para la ingeniería de tejidos a su vez pueden proporcionar un nuevo sistema experimental para dilucidar los mecanismos por los cuales las ECMs nativas regulan el desarrollo del tejido (Rosso et al. 2004).

1.1.2 Biomateriales

1.1.2.1 Definiciones

El término biomaterial, se ha utilizado indistintamente tanto para describir a los materiales derivados de fuentes biológicas como a los materiales utilizados para terapias en el cuerpo humano (Griffith, 2000).

En la literatura, podemos encontrar distintas definiciones del término biomaterial. Por ejemplo, en la segunda conferencia para el Consenso de Definiciones en Biomateriales (1992), se definió el término biomaterial como

“material destinado a funcionar en conjunto con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, mejorar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del organismo” (Leeuwenburgh et al. 2008; Williams, 2009; Peña y Alvarado, 2010). En cambio, Black en el mismo año da la siguiente definición: “Los biomateriales son materiales de origen natural o hechos por el hombre que se utilizan para dirigir, complementar o reemplazar las funciones de tejidos vivos del cuerpo humano” (Ramakrishna et al. 2001; Katti, 2004). Otras definiciones incluyen, “término que se utiliza para indicar los materiales que constituyen parte de los implantes médicos, dispositivos extracorpóreos, y desechables que se han utilizado en medicina, cirugía, odontología y medicina veterinaria, así como en todos los aspectos de la atención de la salud del paciente” (Dee et al. 2002).

El común denominador en todas las definiciones que se han propuesto para el término biomaterial es el reconocimiento indiscutible de que los biomateriales son distintos de otras clases de materiales debido a los criterios especiales de biocompatibilidad que deben cumplir (Dee et al. 2002). De hecho, los investigadores utilizan las palabras biocompatibilidad y biomaterial para indicar el comportamiento biológico de los materiales, de modo que los materiales que son biocompatibles se denominan biomateriales; siendo la biocompatibilidad un término descriptivo que indica la capacidad de un material para desempeñar una respuesta apropiada con el huésped en una aplicación específica (Ramakrishna et al. 2001, Murali y Yeo, 2004; Jandt, 2007).

Wintermantel et al. (1996) ampliaron la definición anterior y distinguieron entre compatibilidad superficial y estructural de un implante. La compatibilidad superficial significa la idoneidad química, biológica y física (incluyendo la morfología superficial) de la superficie del implante con el tejido huésped; mientras que la compatibilidad estructural se refiere a la óptima adaptación al comportamiento mecánico del tejido huésped, es decir, se refiere a las propiedades mecánicas del material del implante, como el módulo elástico (módulo de Young) y resistencia mecánica, al diseño del implante y la transmisión de carga óptima en la interfase implante y tejido. Así, la interacción óptima entre el biomaterial y el huésped se alcanza cuando la compatibilidad superficial y estructural se cumplen (Ramakrishna et al. 2001).

Actualmente, se utilizan muchos biomateriales en medicina ya sean implantes (suturas, placas óseas, reposiciones articulares, ligamentos, injertos vasculares, válvulas de corazón, lentes intraoculares, implantes dentales, etc.), dispositivos médicos (biosensores, corazones artificiales, tubos para la sangre, etc.) (Ramakrishna et al. 2001), sistemas de liberación controlada de fármacos o *scaffolds* (Langer y Tirrell, 2004) para reemplazar y/o reestablecer las funciones de los tejidos u órganos lesionados o degenerados, para ayudar en los

procesos de curación, para corregir anomalías y de este modo mejorar la calidad de vida de los pacientes (Ramakrishna et al. 2001).

1.1.2.2 Generaciones de biomateriales

El uso de los biomateriales se remonta a las antiguas civilizaciones; por ejemplo, se han encontrado ojos, orejas, dientes y narices artificiales en las momias egipcias (Ramakrishna et al. 2001); los egipcios y los etruscos utilizaron implantes metálicos para la fijación de fracturas (Narayan, 2010); los etruscos también sustituían dientes con puentes que hacían con huesos de bueyes (Eisenbarth, 2007); los chinos y los indios utilizaron ceras, pegamentos y tejidos para reconstruir partes del cuerpo defectuosas o que habían desaparecido (Ramakrishna et al. 2001) y los romanos utilizaban piernas artificiales de madera (Yarlagadda et al. 2005).

La edad moderna de la ciencia de los biomateriales empezó a finales de 1800 con dos innovaciones clave: la aplicación de las técnicas quirúrgicas asépticas, y por tanto reduciendo el potencial de las complicaciones relacionadas con la infección (Park, 2000; Narayan, 2010) y las técnicas de radiografía que permiten la visualización de las estructuras del esqueleto (Binyamin et al. 2006). Sin embargo, no hubo un desarrollo selectivo de los biomateriales basado en criterios científicos; en cambio, los dispositivos formados de materiales que habían sido diseñados, sintetizados y fabricados para diversas necesidades industriales (por ejemplo; la industria textil, aeroespacial y la industria de defensa) fueron utilizados en forma de ensayo y error en los cuerpos de animales y los seres humanos (Dee et al. 2002). Así, las respuestas del huésped a estos materiales (por ejemplo: madera, pegamento, caucho, hierro, oro, zinc, vidrio e incluso tejidos de organismos) eran muy variables. Algunos materiales eran tolerados y otros no, e incluso bajo ciertas condiciones (características del tejido huésped y procedimiento quirúrgico) algunos materiales eran tolerados por el organismo mientras que los mismos materiales eran rechazados en otra situación (Ramakrishna et al. 2001), con lo que los resultados frecuentemente eran impredecibles (Dee et al. 2002).

La evolución de los biomateriales así como su disponibilidad clínica durante los últimos 60 años, según Hench y Polack (2002), se puede clasificar en tres generaciones. Estas generaciones, no deben interpretarse únicamente desde un punto de vista cronológico sino también conceptual, ya que cada generación representa la evolución tanto en los requisitos como en las propiedades de los materiales implicados. Esto significa, que en la actualidad aún se sigue investigando y desarrollando biomateriales que según sus propiedades se pueden considerar de la primera o segunda generación. Los materiales que cada nueva generación introduce no necesariamente reemplazan los de las generaciones anteriores (Navarro et al. 2008).

En la primera generación de biomateriales, aproximadamente desde 1950 y hasta 1980 (Schoen, 2004), se utilizaron materiales que se podían obtener fácilmente del entorno (Hench y Polak, 2002; Navarro et al. 2008), es decir la mayoría de los materiales de los implantes eran adaptaciones de los materiales comerciales existentes con mayores niveles de pureza para eliminar la liberación de sustancias tóxicas y reducir al máximo la corrosión (Hench y Thompson, 2010), con el objeto de reemplazar los tejidos que se habían perdido debido a enfermedades o heridas (Narayan, 2010).

El objetivo de todos los biomateriales utilizados en la primera generación era lograr una adecuada combinación de las propiedades físicas para que coincidiesen con las del tejido reemplazado con una respuesta tóxica del huésped mínima. Una característica común de la mayoría de los materiales utilizados era su inactividad biológica (biológicamente inertes (Navarro et al. 2008; Hench y Thompson, 2010), es decir provocaban una respuesta mínima por parte del huésped (Schoen, 2004)). El principio básico, era reducir a un mínimo la respuesta inmune al cuerpo extraño (Hench y Polak, 2002). Así, en esta primera generación, se buscaban materiales que proporcionaban 1) propiedades mecánicas para el uso previsto, 2) resistencia a la corrosión y 3) ausencia de efectos perjudiciales como carcinogenicidad, toxicidad, alergias e inflamación (Narayan, 2010).

Una característica común de estos biomateriales es que después de la implantación, crece una capa delgada de tejido fibroso en la superficie del material y con el tiempo el implante se encapsula totalmente (Navarro et al. 2008). Este encapsulamiento del implante puede generar problemas como que la capsula se calcifique y endurezca; por ejemplo, en los implantes de mama de silicona, esta rigidez produce dolor y deterioro de los tejidos subyacentes debido a la disparidad de las propiedades mecánicas (Hench, 1980).

Es importante señalar, que los principios en que se basan los biomateriales de esta generación siguen siendo válidos hoy en día. De hecho, decenas de millones de personas han mejorado su calidad de vida entre 5 y 25 años mediante implantes hechos de biomateriales inertes (Hench y Polak, 2002; Hench y Thompson, 2010).

El Profesor Bonfield hacia 1980, empezó a investigar en el diseño de materiales *biocomposites* con el fin de que las propiedades mecánicas de éstos se pareciesen más a las del hueso receptor. Estos *biocomposites* incorporaban el concepto de bioactividad (biomateriales que provocan una acción y reacción controlada en el entorno fisiológico) (Hench y Polak, 2002); y de esta forma es como surge y se desarrolla la segunda generación de biomateriales entre 1980 y 2000, que se caracteriza por la capacidad de los materiales bioactivos para interactuar con el entorno biológico con el objetivo de mejorar la respuesta biológica y la unión del tejido a la superficie del biomaterial; es decir el

desarrollo de interfases bioactivas que provocasen una respuesta biológica específica y evitasen la formación de la capa fibrosa mencionada anteriormente (Navarro et al. 2008). Un ejemplo típico de este tipo de biomaterial es la hidroxiapatita sintética que se utilizó como *scaffolds* porosos, polvos y recubrimientos en prótesis metálicas para proporcionar una fijación bioactiva. Hacia mitad de los años 80, los biomateriales bioactivos se utilizaron clínicamente en aplicaciones ortopédicas y dentales, incluyendo composiciones de vidrios bioactivos, cerámicas, cerámica-vidrio y *composites* (Hench y Thompson, 2010).

La segunda generación de biomateriales también incluye el desarrollo de biomateriales reabsorbibles. La reabsorción de biomateriales parece ser una solución al problema de la interfase tejido/biomaterial ya que el material es sustituido por la regeneración del tejido e idealmente, al final no hay diferencia entre el sitio del implante y el tejido del huésped (Hench, 1980; Hench y Thompson, 2010). Un ejemplo, son las suturas biodegradables compuestas de copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico que se degradan hidrolíticamente en ácido láctico y glicólico que con el tiempo se procesan a través de las vías metabólicas normales (ciclo de Krebs) y se eliminan del cuerpo como CO₂ y H₂O (Pamula et al. 2001). También se utilizan este tipo de materiales en aplicaciones ortopédicas en forma de varillas, tornillos, placas y clavos, y en sistemas de liberación controlada de fármacos (Hench y Polak, 2002; Narayan, 2010).

El éxito de los biomateriales de la primera y segunda generación ha sido vital para solucionar las necesidades médicas de la población. Sin embargo, entre un tercio y la mitad de las prótesis óseas y de las válvulas cardíacas artificiales fallan en 10-25 años según Hench y Thompson (2010). Es dentro de este contexto en el que surge la tercera generación de biomateriales aproximadamente en el año 2000 (Schoen, 2004). Los biomateriales de esta generación están diseñados para estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular (Hench y Polak, 2002; Navarro et al. 2008). Estos biomateriales combinan los conceptos de bioactividad y reabsorbibilidad. Actualmente, se están realizando modificaciones moleculares en sistemas poliméricos reabsorbibles con el fin de provocar interacciones específicas con las integrinas y de ese modo dirigir la proliferación y diferenciación celular así como la producción y organización de la ECM. También, se están diseñando vidrios bioactivos y *scaffolds* porosos con estructuras jerárquicas para activar los genes que estimulan la regeneración de tejidos (Hench y Thompson, 2010). Hoy en día, se dispone de dos rutas alternativas para la "reparación" de los tejidos utilizando biomateriales de la tercera generación: la ingeniería de tejidos y la regeneración *in situ* (Hench y Polak, 2002).

En resumen, la primera generación se caracteriza por los materiales bioinertes, la segunda generación por los materiales bioactivos y reabsorbibles y la tercera generación por los materiales diseñados para estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular.

1.1.2.3 Clases de materiales

La experiencia clínica indica que no todos los materiales disponibles son adecuados para las aplicaciones biomédicas. Los materiales que se pueden utilizar en aplicaciones biomédicas se clasifican atendiendo a su naturaleza química en: metales, cerámicas, polímeros y materiales compuestos a partir de los anteriores (Ramakrisna et al. 2001; Binyamin, 2006; Jandt, 2007; Peña y Alvarado, 2010). Sin embargo, los investigadores también clasifican los materiales dependiendo de si éstos son bioinertes o bioactivos, bioestables o biodegradables (Ramakrisna et al. 2001), sólidos o hidrogeles (si el contenido en agua es superior al 30%) (Peña y Alvarado, 2010), etc. En la **tabla 1.1**, se muestran algunos ejemplos de materiales según la primera clasificación así como algunas de sus aplicaciones.

Clasificación	Biomaterial	Ejemplos de aplicaciones
Metal	Acero inoxidable 316L	Instrumentos quirúrgicos, dispositivos de fijación ortopédicos, stents
Metal	Titanio y aleaciones que contienen titanio	Fijación de fracturas, encapsulación de marcapasos, sustitución de la articulación
Metal (aleaciones con memoria de forma)	Aleación Níquel-Titanio (Nitinol)	Stents, alambres de ortodoncia.
Metal	Platino y aleaciones que contienen platino	Electrodos
Metal	Plata	Material antibacteriano
Polímero	Politetrafluoroetileno (PTFE, Teflón®, Goro-tex®)*	Injertos vasculares, catéteres, introductores

Polímero	Politereftalato de etileno (Ethibond, Dracon®)	Injertos vasculares, liberación de fármacos, suturas no biodegradables
Polímero	Polimetilmetacrilato (PMMA)	Cemento óseo, lentes intraoculares
Polímero	Poliuretano	Catéteres, tubos, vendaje para heridas, válvulas cardiacas, corazones artificiales
Polímero	Goma de silicona (polidimetilsiloxano PDMS)	Catéteres, tubos de alimentación, tubos de drenaje, puntas de introductores, vainas flexibles, membranas de intercambio de gases
Polímero	Policarbonato	Principal componente de los cartuchos de hemodiálisis, máquina corazón-pulmón, trócares, tubos de interconexión
Polímero	Hidrogeles (óxido de polietileno, polietilenglicol, alcohol de polivinilo, etc)	Liberación de fármacos, vendaje para heridas, hemostasia, prevención de la adhesión, lentes de contacto, ECMs, reconstrucción
Polímero	Poliamidas (nylon)	Suturas no biodegradables
Polímero	Polipropileno (prolene)	Suturas no biodegradables, mallas para hernias
Cerámica	Alúmina	Sustitución de la articulación, implantes dentales, prótesis ortopédicas
Cerámica	Carbón	Válvulas de corazón, recubrimientos biocompatibles, electrodos

Cerámica	Hidroxiapatita	Recubrimiento de implantes, relleno óseo
Cerámica	Bioglass	Recubrimiento de prótesis metálicas, <i>composites</i> para dientes, rellenos de cemento óseo.

*Teflón y Dracón son marcas de E. I. DuPont de Nemours & Co, y Gore-Tex es una marca de W. L. Gore & Associates, Inc.

Tabla 1.1: Selección de biomateriales clasificados según su naturaleza con ejemplos de sus aplicaciones en dispositivos médicos (Binyamin, 2006).

Hay que tener en cuenta que la función de estos materiales se rige por la interacción entre el material y el cuerpo (Park, 2000). Así, se ha observado que cada tipo de material tiene sus propios aspectos positivos que son especialmente adecuados para una aplicación específica así como inconvenientes que limitan su aplicabilidad en otros casos (Ramakrisna et al. 2001).

De este modo, los polímeros, tienen la ventaja de que se encuentran disponibles en una amplia variedad de composiciones, propiedades y formas (sólidos, fibras, telas, films y geles) y se pueden procesar fácilmente en formas y estructuras complejas. Además, a diferencia de los metales y las cerámicas, se pueden deformar en mayor medida antes de que fallen. Sin embargo, tienen tendencia a ser demasiado flexibles y demasiado débiles para cumplir con las exigencias mecánicas de determinadas aplicaciones, por ejemplo como implantes en la cirugía ortopédica; es decir, tienen resistencias mecánicas y módulos de Young bajos si se compara con los metales o las cerámicas y es por eso por lo que no se utilizan generalmente para soportar cargas (Dee et al. 2002). Además, pueden absorber líquidos e hincharse, lixiviar productos no deseados (por ejemplo, monómeros, rellenos, plastificantes, antioxidantes), dependiendo de la aplicación y del uso. Por otro lado, el proceso de esterilización (autoclave, óxido de etileno, e irradiación con ^{60}Co) puede afectar a las propiedades del polímero (Ramakrisna et al. 2001).

Los metales, son conocidos por su alta resistencia mecánica, ductilidad y resistencia a la fatiga. Sin embargo, los inconvenientes de muchos metales son: baja biocompatibilidad, corrosión, rigidez demasiado elevada comparada con los tejidos, alta densidad y liberación de iones metálicos que pueden provocar reacciones alérgicas (Ramakrisna et al. 2001).

Las cerámicas tienen la ventaja de mostrar una buena biocompatibilidad, buena resistencia a la corrosión y alta resistencia a la compresión. Sin embargo, sus inconvenientes incluye: fragilidad, baja resistencia a la fractura, dificultad

para fabricarlas, baja fiabilidad mecánica, falta de resiliencia y alta densidad (Ramakrisna et al. 2001).

Los materiales compuestos, también denominados *composites*, están constituidos por dos o más componentes químicamente distintos, en una escala mayor que la atómica, presentando una interfase que los separa de forma clara. Los *composites* están formados por una o más fases discontinuas (dispersas) que se denominan refuerzo, dentro de una fase continua que se llama matriz (Migliaresi y Alexander, 2004). La ventaja que ofrecen los materiales compuestos en comparación con los homogéneos es un aumento de propiedades mecánicas, como son la rigidez y la resistencia (Lakes, 2000; Mano et al. 2004). Sin embargo, el *composite* puede fallar debido al envejecimiento hidrotérmico o a tensiones superiores a la resistencia de la interfase. Además, si el *composite* falla, el material de refuerzo (por ejemplo, fibras o partículas) puede quedar expuesto al entorno biológico; y ya que éstos por lo general tienen dimensiones en la escala celular, siempre existe la posibilidad de la ingestión de restos de partículas que pueden dar lugar a la producción de enzimas que destruyen el tejido o al transporte de éstos al sistema linfático. Por otro lado, los métodos o condiciones de esterilización pueden provocar fallos en el *composite* (Migliaresi y Alexander, 2004).

En la **tabla 1.2**, se resumen las ventajas y desventajas de cada uno de los materiales según la primera clasificación.

Por tanto, a la hora de elegir un material para una aplicación biomédica hay que tener en cuenta varios factores, como las propiedades físico-químicas, la durabilidad del material, la función que se desea que desempeñe, el entorno fisiológico, los efectos adversos en caso de fracaso así como costes y fabricación; además de ser biocompatible. Por otro lado, las características mecánicas también deben tenerse en cuenta cuando se eligen materiales para aplicaciones biomédicas. Así, la resistencia del material (tracción, compresión), rigidez, resistencia a la fatiga, resistencia al desgaste y estabilidad dimensional deben tenerse en cuenta en relación con el uso final para asegurar su éxito. Por ejemplo, un material rígido sería más adecuado para un implante de cadera mientras que un material flexible lo sería para un injerto vascular. Otras propiedades físicas como la conductividad eléctrica y térmica, transmisión de la luz y radioopacidad son importantes para aplicaciones específicas tales como en los electrodos de los marcapasos, lentes intraoculares y odontología restauradora respectivamente (Dee et al. 2002).

Además, ya que en medicina se requieren productos estériles, a la hora de elegir el biomaterial para una determinada aplicación, también se debe tener en cuenta la esterilización del producto final (Dee et al. 2002) como se comentará en el apartado diseño de los *scaffolds*.

Materiales	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Polímeros (nylon, goma de silicona, poliéster, politetrafluoroetileno, etc)	Elásticos, fáciles de fabricar	No resistentes, se deforman con el tiempo, pueden degradarse	Suturas, vasos sanguíneos, zócalo de la cadera, oreja, nariz, otros tejidos blandos,
Metales (Ti y sus aleaciones, aleaciones de Co-Cr, aceros inoxidables, Au, Ag, Pt, etc)	Resistentes, duros, maleables	Pueden corroerse, densos	Sustitución de la articulación, placas de hueso y tornillos, raíces dentales
Cerámicas (óxido de aluminio, fosfatos cálcicos incluyendo la hidroxiapatita, carbón)	Muy biocompatibles, inertes, resistentes en compresión	Quebradizos, no elásticos, difíciles de fabricar	Sustitución de la cabeza del fémur de la cadera, recubrimiento de implantes dentales y ortopédicos
<i>Composites</i> (carbón-carbón, cemento óseo reforzado de fibra o alambre)	Resistentes, se pueden producir a medida	Difíciles de fabricar	Implantes de articulaciones, válvulas cardíacas

Tabla 1.2: Ventajas y desventajas de materiales que se utilizan en el cuerpo humano (Park, 2000).

Por otra parte, el éxito de un biomaterial en el organismo depende de otros factores como la técnica quirúrgica (grado de trauma que se genera durante la implantación, métodos de esterilización, etc) (Park, 2000; Ramakrishna et al. 2001; Narayan, 2010), la condición de salud y actividades del paciente (Park y Lakes, 2007).

1.1.2.3.1 Polímeros

Debido a que los polímeros van a ser objeto de los estudios realizados en este trabajo, se va a describir brevemente las distintas formas de clasificarlos así como las ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de polímeros.

En general, los polímeros para aplicaciones biomédicas suelen clasificarse atendiendo a su origen en dos categorías, naturales y sintéticos; mientras que desde un punto de vista de la durabilidad, los polímeros los clasificamos en: bioestables y biodegradables.

Los polímeros naturales o biopolímeros se forman en la naturaleza durante los ciclos de crecimiento de todos los organismos (Chandra y Rustgi, 1998) y pueden ser de origen animal, y a su vez, atendiendo a su estructura química pueden ser proteínas como el colágeno, gelatina, fibroína de la seda, elastina... o polisacáridos como el ácido hialurónico, quitina, quitosano....; de origen vegetal y al igual que los de origen animal pueden ser proteínas como la soja o polisacáridos como el almidón, celulosa, agarosa, alginato... y de origen microbiano, que incluye a polisacáridos como el dextrano, ácido hialurónico, quitina, quitosano, alginato... y a poliésteres como los polihidroxialcanoatos (PHAs), concretamente el polihidroxibutirato (PHB) y el copolímero polihidroxibutiratovalerato (PHBV) (Malafaya et al. 2007; Mano et al. 2007). Algunas aplicaciones de biopolímeros incluyen *scaffolds* para piel (Huang y Fu, 2010), hueso (Malafaya et al. 2007), excipientes en comprimidos, oftalmología, ortopedia (Coviello et al. 2007), adhesivos biológicos (Malafaya et al. 2007), sistemas de liberación de fármacos (Ko et al. 2010; Coviello et al. 2007), terapias génicas (Dang y Leong, 2006) y agentes hemostáticos (Nair y Laurencin, 2007).

Los polímeros sintéticos son los fabricados por el ser humano (Cheung et al. 2007; Lee y Park, 2008) y pueden ser biodegradables o bioestables. Los materiales bioestables, se utilizan en suturas, implantes ortopédicos, dispositivos de fijación de fracturas, tubos para diálisis y catéteres, odontología, lentes de contacto (Hacker y Mikos, 2008), lentes intraoculares (Lloyd et al. 2001) y tratar hernias abdominales (Acevedo, 2008) entre otras aplicaciones. Algunos ejemplos de polímeros bioestables son PHEMA, PMMA, PEG, PTFE, PE, PS, PET y siliconas. Por otro lado, los materiales biodegradables sintéticos se utilizan en sistemas de liberación de fármacos, suturas y tornillos de fijación de huesos (Lee y Park, 2008) e incluyen poliésteres como los poli(-hidroxi ácidos) (PLA, PLG y sus copolímeros), polilactonas (PCL), poliortoésteres, poliuretanos y polianhídridos entre otros (Pachence et al. 2007).

Los polímeros naturales tienen la ventaja de ser similares a las macromoléculas biológicas (Mano et al. 2007), es decir, imitan la estructura y composición de la ECM nativa (Ng et al. 2004; Malafaya et al. 2007; Huang y Fu, 2010) al que el entorno biológico reconoce y hace frente metabólicamente (Mano et al. 2007). Además, son muy versátiles ya que proporcionan distintas funciones biológicas (Chung y Park, 2007; Gomes et al. 2008) e imitan las características de la ECM, típicamente: buenas propiedades biológicas e interacciones celulares intrínsecas y por tanto pueden dirigir la migración,

crecimiento y la organización de las células durante la regeneración del tejido (Ng et al. 2004; Malafaya et al. 2007; Huang y Fu, 2010). Por otra parte, debido también a su similitud con la ECM nativa, los polímeros naturales evitan la estimulación de reacciones inmunológicas, inflamación crónica y toxicidad que a menudo se detecta con los polímeros sintéticos debido a la falta de reconocimiento de las señales celulares (Mano et al. 2007). Otra ventaja es que son biocompatibles (Malafaya et al. 2007; Cheung et al. 2007; Gomes et al. 2008). Además, tienen la ventaja de permitir la incorporación de factores de crecimiento (Huang y Fu, 2010) y/o proteínas para mejorar aún más las funciones celulares (Ng et al. 2004). Sin embargo, un aspecto importante a considerar cuando se utilizan polímeros naturales es la posibilidad de inducir una respuesta inmune no deseada debido a la presencia de impurezas (Gomes et al. 2008) y endotoxinas (en función de la fuente utilizada) (Ng et al. 2004). Además, presentan el inconveniente de que sus propiedades pueden variar de lote a lote en los procesos de extracción a gran escala (Ko et al. 2010) y en muchos casos presentar un rango estrecho y limitado de propiedades mecánicas (Huang y Fu, 2010). Otra desventaja es que en muchos casos son difíciles de procesar por los métodos convencionales (Cheung et al. 2007; Gomes et al. 2008), tal como se describirá en la sección métodos de fabricación de *scaffolds* poliméricos. Además es difícil controlar la velocidad de degradación (Huang y Fu, 2010). Sin embargo, una estrategia interesante para superar estos problemas son las tecnologías de la proteína recombinante en la que la monodispersidad y las propiedades de los polímeros definidas con precisión, así como la colocación predecible de los grupos de reticulación y la programación de las velocidades de degradación hace a los polímeros naturales muy atractivos y útiles para su utilización en ingeniería de tejidos y sistemas de liberación de fármacos (Malafaya et al. 2007).

Los polímeros sintéticos, comparados con los polímeros naturales tienen la ventaja de poder procesarse más fácilmente en distintas formas y tamaños por diversos métodos incluyendo los convencionales (Chung y Park, 2007). Además, se pueden sintetizar con calidades y purezas reproducibles (Hacker y Mikos, 2008) así como con estructuras y funciones controladas con precisión (Gomes et al. 2008). Por otro lado, tanto las propiedades físicas como químicas se pueden modificar fácilmente (Vial y Andreopoulos, 2009) y las características mecánicas y de degradación (en el caso de que sea biodegradable) se pueden variar con la composición química de las macromoléculas (Cheung et al. 2007) y así adecuarlos a las distintas aplicaciones (Karageorgiou y Kaplan, 2005). Además, permiten la liberación controlada de factores de crecimiento (Ng et al. 2004). Sin embargo, no poseen las capacidades bio-inductivas naturales y con frecuencia muestran una biocompatibilidad baja (Lee y Park, 2008); pero se pueden modificar superficialmente para mejorar las interacciones entre las células y el material. En el caso de los polímeros sintéticos bioestables tienen la

ventaja de su estabilidad a largo plazo, además de presentar una respuesta tóxica a cuerpo extraño mínima ya que son bioinertes. Sin embargo, presentan la desventaja de que crezca después de la implantación una capa delgada de tejido fibroso en la superficie del material y con el tiempo el implante se encapsule totalmente como se ha comentado anteriormente, además de necesitar una segunda cirugía en el caso de que se requiera su eliminación (Straley et al. 2010). En cambio, los polímeros sintéticos biodegradables tienen la ventaja sobre los bioestables de no necesitar una segunda cirugía para eliminarlos. Sin embargo, tienen la desventaja de que sus productos de degradación puedan dar lugar a entornos locales no deseados, incluyendo un pH bajo (Ng et al. 2004) que puede provocar efectos negativos en el crecimiento y la adhesión celular (Chung y Park, 2010).

La elección del polímero depende de su aplicación final; por tanto, hay que tener en cuenta tanto las propiedades físicas como químicas, como se ha mencionado anteriormente. De esta forma, elegiremos un polímero bioestable en lugar de un polímero biodegradable si se desea la estabilidad del polímero a largo plazo (Pachence et al. 2007). Por otro lado, la elección de un polímero natural en lugar de uno sintético dependerá de las interacciones celulares deseadas. Hay que tener en cuenta que si bien la composición base del polímero influye en la respuesta celular, el polímero se puede modificar con proteínas y/o péptidos específicos para promover las interacciones celulares deseadas (Schoichet, 2010).

Por otro lado, como se ha indicado en el apartado 1.1.2.3, los biomateriales también los podemos clasificar en sólidos o hidrogeles.

Los hidrogeles, son redes poliméricas hidrofílicas tridimensionales, que son capaces de embeber grandes cantidades de agua o de fluidos biológicos (Coviello et al. 2007; Peppas et al. 2000) y retenerlos; concretamente, desde el 10-20% (Singh et al. 2006) o más del 20% (Gupta et al. 2002) hasta miles de veces su peso seco (Shu et al. 2004), manteniendo definida una estructura tridimensional (Gupta et al. 2002). Estas redes, dependiendo del tipo de entrecruzador entre las macromoléculas, pueden clasificarse en físicas o químicas, si bien los dos tipos pueden coexistir en el mismo hidrogel (Drury y Mooney, 2003; Coviello et al. 2007). Por tanto, los hidrogeles pueden absorber grandes cantidades de agua, debido a su hidrofiliidad, sin disolución del polímero ya que presentan una estructura entrecruzada (reticulada) (Gupta et al. 2002).

En el sentido estricto, y atendiendo a la clasificación en sólidos e hidrogeles, podemos decir que un hidrogel está compuesto de agua y polímero para crear un sólido blando y elástico con algunas propiedades parecidas a las del agua (Gupta et al. 2002).

Los hidrogeles, pueden ser naturales como la agarosa... (Lévesque et al. 2005; Guiseppi-Elie, 2010) o sintéticos como el PHEMA, PEG, PEO... (Peppas et al. 2000b) y podemos encontrar en la bibliografía diversas aplicaciones como por ejemplo, en agricultura (Rojas de Gascue et al. 2006), artículos de higiene como pañales... (Engelhardt et al. 1993), embalaje de alimentos (Swanson y Rimmer, 2008), sensores (Swanson y Rimmer, 2006; Ahmad et al. 2009) y en particular representan una clase importante de biomateriales en aplicaciones médicas, como lentes de contacto, membranas para biosensores, dispositivos para la liberación controlada de medicamentos (Satarkar y Hilt, 2008; Guiseppi-Elie, 2010), *scaffolds* para la regeneración de piel (Shu et al. 2004), etc, debido a que se parecen mucho más a los tejidos naturales que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos (Peppas et al. 2000; Gupta et al. 2002).

Los hidrogeles tienen la ventaja de poder absorber grandes cantidades de agua además de ser tan flexibles como el tejido blando lo que minimiza la posible irritación mecánica del tejido circundante (Kubínová et al. 2009). Además, son altamente permeables y por tanto facilitan el intercambio de oxígeno, nutrientes y otros metabolitos solubles en agua (Shu et al. 2004). Por otro lado, normalmente son biocompatibles (Peppas et al. 2006; Satarkar y Hilt, 2008). Además, su baja tensión interfacial contribuye a una reducción de la adsorción de proteínas y por tanto al bioensuciamiento y la adhesión celular (Gupta et al. 2002; Guiseppi-Elie, 2010). También es posible modificar la superficie del hidrogel para obtener una adecuada adhesión celular mediante la optimización de la relación hidrófilo e hidrófobo (Kubíroná et al. 2009). Sin embargo, su principal desventaja es su baja resistencia mecánica, lo que se puede superar ya sea por entrecruzamiento, formación de redes de interpenetración (IPN) o por cristalización y de este modo reforzar su estructura (Lee et al. 1999).

En resumen, un biomaterial es una sustancia que se ha diseñado para adoptar una forma que, ya bien sea sola o formando parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, por medio del control de interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico en la medicina humana o veterinaria (Williams, 2009).

Los biomateriales, han progresado desde pruebas de materiales no desarrollados originalmente para fines biomédicos, hasta un campo de investigación sinérgico que comprende ingenieros, científicos y médicos con el objeto de adaptar las propiedades del material para aplicaciones específicas. La mayoría de las tendencias recientes cambian su enfoque hacia la biología para entender primero y luego simular las interacciones y señales fisiológicas (Hacker y Mikos, 2008).

Ningún material por si solo satisface todos los parámetros de diseño en todas las aplicaciones dentro del campo de la ingeniería de tejidos, pero se pueden diseñar a medida una amplia gama de materiales para aplicaciones concretas (Gomes et al. 2008).

Por otra parte, los hidrogeles están experimentando una creciente atención debido a su similitud estructural con la ECM nativa y su buena compatibilidad para dirigir la encapsulación celular debido a su alto contenido en agua (Hacker y Mikos, 2008).

1.1.3 Diseño de los scaffolds

Se sabe que la estructura del tejido y su función están altamente interrelacionadas (Liu et al. 2007), por tanto a la hora de diseñar *scaffolds* para la ingeniería de tejidos es importante entender las correlaciones entre las propiedades del *scaffold*, su estructura y la funciones biológicas. Desde un punto de vista ingenieril, es deseable que las propiedades del *scaffold* y sus funciones estén integradas de una forma reproducible en el diseño del *scaffold* de forma que la formación de tejido se pueda inducir y controlar de manera gradual *in vitro* y/o en el sitio de implantación *in vivo*. Por un lado, el diseño de *scaffolds* es un proceso deductivo que implica la propuesta y ensayo de las propiedades de los *scaffolds* "candidatos" y la elucidación de sus reacciones con las células y tejidos. Por otro lado, el diseño de *scaffolds* es un proceso inductivo, un ejercicio de recapitulación de las funciones de los tejidos y de los mecanismos celulares observados en todo el cuerpo (**Figura 1.8**) (Luo et al. 2007).

Debido a la complejidad innata de los sistemas biológicos, reproducir los procesos naturales y fabricar tejidos mediante la ingeniería de tejidos con *scaffolds* depara una tarea tremenda. Las complicaciones surgen en muchos frentes, como: nuestra comprensión incompleta de las interacciones de la célula con la ECM nativa, hasta que grado de complejidad se deben diseñar los *scaffolds*, etc (Luo et al. 2007).

Es dentro de este contexto, en el que no podemos encontrar en la bibliografía de una forma clara lo que define a un diseño de *scaffold* ideal de por si (Hutmacher et al. 2004; Hutmacher et al. 2007), sino que deben tenerse en cuenta muchos principios ingenieriles y biológicos cuando se diseñan *scaffolds* para la ingeniería de tejidos; algunos son peculiares para la aplicación específica, mientras que otros son requerimientos esenciales que deben ser observados para todos los órganos (Thomson et al. 1995; Leong et al. 2003). De esta forma, surgen muchos criterios para definir los requisitos que debe tener un *scaffold* ideal para la ingeniería de tejidos, los cuales varían ligeramente entre los tipos de tejidos. Por ejemplo, para muchos tejidos (ej. hueso) uno de los criterios más importantes es que el *scaffold* consista en una

red de poros altamente interconectados con tamaños de poro lo suficientemente grandes para permitir la migración celular, el intercambio de fluidos, el crecimiento de tejido y la vascularización (formación de vasos sanguíneos nuevos (Rivron et al. 2008)). En cambio, para tejidos blandos, la porosidad del *scaffold* es menos importante ya que se pueden utilizar geles que pueden difundir los nutrientes a las células imitando a la ECM (Jones et al. 2006).

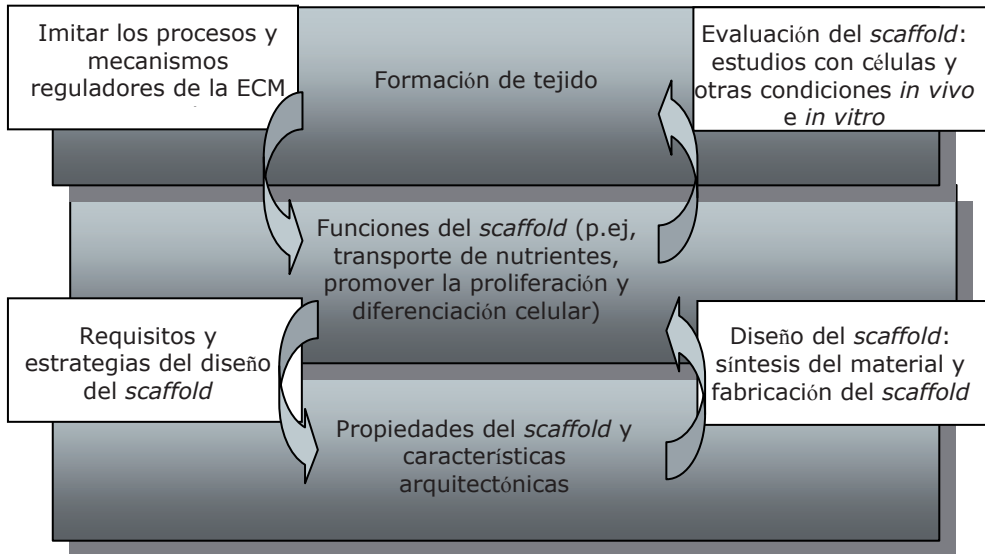


Figura 1.8: Interacción entre las etapas del diseño de los *scaffolds* (Luo et al. 2007).

La estructura del *scaffold*, idealmente debería imitar a la del tejido que se desea regenerar como se ha dicho anteriormente. Por tanto, para producir un *scaffold* óptimo, es vital determinar que diseño induce la mejor respuesta celular para una aplicación determinada.

Muchos tejidos tienen estructuras jerárquicas que varían en escalas de longitud de 0.1 a 1 mm y requieren la regeneración en formas macroscópicas concretas (Griffith, 2002). Las estructuras subcelulares (1-10 μm) para controlar el entorno celular, las estructuras de la escala de células (10-100 μm) para controlar las interrelaciones célula-célula y las estructuras supracelulares (100-1000 μm) para construir las unidades funcionales esenciales del tejido. Con el fin de mantener la función de las células, regular el comportamiento celular, y reconstruir las masas multicelulares en tres dimensiones, el *scaffold* debe estar diseñado para satisfacer varios requisitos, entre otros la presencia de redes capilares que puedan proporcionar un medio de cultivo a todas las células y eliminar sus metabolitos y mantener las arquitecturas jerárquicas celulares para imitar las propiedades de los sistemas vivos (Liu et al. 2007). En general, se

puede decir que el desarrollo del tejido se controla en tres escalas (niveles) de longitud del *scaffold* (Griffith, 2002; Cai y Cheng, 2003; Peña y Alvarado, 2010). En el primer nivel, la forma macroscópica del *scaffold* según el sitio donde será colocado, las propiedades mecánicas, la densidad y la porosidad, son importantes en una escala de milímetros a centímetros (Griffith, 2002; Cai y Cheng 2003). En el nivel intermedio, el tamaño, la estructura y la interconexión de los poros son cruciales para la invasión celular y para el crecimiento de tejido, en una escala de micras. Por último, la adhesión y al expresión genética de las células se ajustan por la superficie química del *scaffold*, es decir factores como la topología de la superficie de los poros y la fisicoquímica superficial en una escala nanométrica (Cai y Cheng 2003; Peña y Alvarado, 2010). Sin embargo, según Griffith (2002), en este último nivel, la textura superficial local y porosidad son importantes en la escala de las decenas de micras.

Claramente, el hueso (**Figura 1.10**), y los dientes (**Figura 1.9**), son estructuras jerárquicas en las que las propiedades del material cambian con los cambios de escala. Los dos tejidos se organizan como compuestos jerárquicos. Por lo tanto, deben ser estudiados en cada nivel (escala), con el fin de entender su comportamiento intrínseco, así como para determinar los factores de diseño adecuados para utilizarlos en la ingeniería de tejidos (Katz et al. 2007).

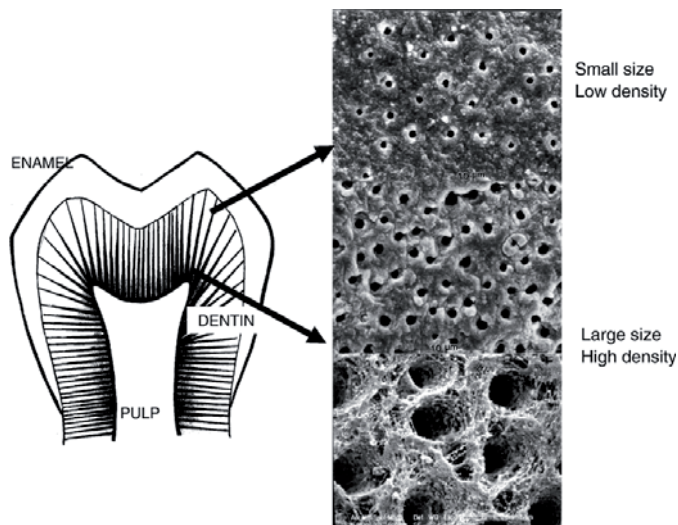


Figura 1.9: Estructura jerárquica de los dientes humanos, donde se representan las características tubulares en función de la posición en referencia a la unión dentina-esmalte (UDE). En las proximidades de la UDE, distribución de baja densidad de los túbulos y pequeño tamaño. Túbulos de gran tamaño y alta densidad se observan en las proximidades de la pulpa (Katz et al. 2007).

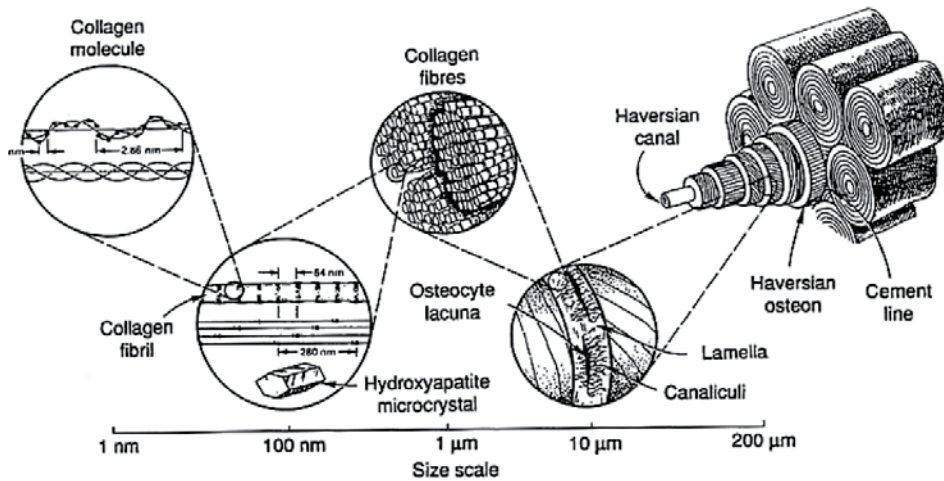


Figura 1.10: Estructura jerárquica del hueso humano (Katz et al. 2007).

El diseño del *scaffold* debería empezar con al menos un mínimo de requisitos bioquímicos y físicos (Hutmacher et al. 2004) para cumplir las funciones que se han mencionado en el apartado 1.1.1.2.2, debido a que los sistemas biológicos son complejos y por tanto difíciles de reproducir artificialmente, además de que el diseño de los *scaffolds* para la ingeniería de tejidos es específico del tejido de interés (Thomson et al. 2000).

La regeneración o restitución de la función de un órgano requiere muchas células, por tanto es deseable que se utilicen *scaffolds* con porosidades altas ya que proporcionan un volumen vacío de gran tamaño en el que las células transplantadas se puedan sembrar (Thomson et al. 1995) o migrar (Thomson et al. 2000), crecer (Yeong et al. 2004) y producir ECM (Schugens et al. 1996). Además, ya que muchos tipos de células son dependientes del anclaje, también es importante proporcionar un área superficial suficiente para el anclaje (Mikos y Temenoff, 2000), migración (Salvay y Shea, 2006) y crecimiento celular (Yang et al. 2001). Mientras que a menudo se requiere una porosidad alta, ésta es inversamente proporcional a la superficie disponible para el anclaje de las células en los *scaffolds* tridimensionales. Por tanto, conseguir una densidad óptima de células en los *scaffolds*, requiere una relación alta de área superficial frente al volumen (Luo et al. 2007). Esta relación, depende de la densidad y el tamaño de los poros (Yang et al. 2001). Una relación alta área superficial/volumen, se favorece utilizando diámetros de poro pequeños (Thomson et al. 1995). Sin embargo, el diámetro de las células en suspensión (alrededor de 10 μm) dicta el tamaño mínimo de los poros (Thomson et al. 1995), que varía de un tipo de célula a otro (Yang et al. 2001). Dependiendo de las aplicaciones previstas, el tamaño de poro debe ser cuidadosamente

controlado; así el tamaño de poro óptimo para la neovascularización es de 5 μm , para el crecimiento de fibroblastos entre 5-15 μm ; para el crecimiento de hepatocitos aproximadamente 20 μm , para la regeneración de la piel en mamíferos adultos entre 20-125 μm ; para el crecimiento de osteoides entre 40-100 μm , para la regeneración de hueso entre 100-350 μm (Yang et al. 2001) y para la regeneración de nervio periférico entre 5-10 μm según Liu et al. (2007) y entre 10-100 μm según Schugens et al (1996a).

Además, para que un *scaffold* tenga éxito en la ingeniería de tejidos, es esencial que pueda suministrar una cantidad suficiente de nutrientes (Karp et al. 2003; Ikada, 2006) y gases (oxígeno) (Mikos et al. 1996) a todas las células del *scaffold* (Buckley y O'Kelly, 2004) así como un transporte de los productos metabólicos de desecho (Mikos y Temenoff, 2000; Jardini et al. 2010) con el fin de minimizar la necrosis celular (Sun et al. 2007) y para facilitar la organización de las células en el tejido deseado (Kaully et al.2010). Es decir, el diseño del *scaffold* debe facilitar un transporte de masa, ya sean células, fluidos o solutos desde y hacia el *scaffold* (Luo et al. 2007), ya sea en tejidos u órganos avasculares como la piel y el cartílago o en tejidos u órganos más complejos como corazón, riñón... (Moon y West, 2008; Liu, 2010) hasta que la estructura *scaffold*-célula esté vascularizada (Mikos et al. 1996). Este transporte de masa en los *scaffolds* está correlacionado con la composición química del *scaffold* y los parámetros estructurales de sus poros (Luo et al. 2007), caracterizados principalmente por el tamaño de poro, porosidad (Rezwan et al. 2006), interconexión de los poros (Yang et al. 2001; Karp et al. 2003; Buckley y O'Kelly, 2004; Ikada 2006) y el área superficial (Luo et al. 2007).

La vascularización (formación de vasos sanguíneos nuevos) (Rivron et al. 2008) es esencial en órganos complejos o altamente metabólicos como por ejemplo, el hígado (Thomson et al. 1995) o páncreas (Yang et al. 2001), ya que las células que están a distancias mayores de 0.2-0.5 mm de un vaso sanguíneo padecen de hipoxia (falta de suministro de oxígeno) y de la limitación de otros nutrientes (Perets et al. 2003; Moon y West, 2008). En la **figura 1.11** se muestra un diagrama esquemático de las limitaciones de difusión en los *scaffolds* para la ingeniería de tejidos con estructuras esponjosas, donde las distintas etapas representan: a) un *scaffold* para la ingeniería de tejido, que es una estructura esponjosa abierta. El oxígeno y los nutrientes se suministran desde el medio de cultivo celular; b) siembra de células en el *scaffold*; c) las células empiezan a proliferar y migrar en los poros del *scaffold*; d) las células colonizan completamente los poros y empiezan a establecer su propia ECM; y e) la capa superior de células consume la mayor parte del oxígeno y nutrientes además de limitar la difusión de estos componentes, y por tanto, la cantidad disponible para las primeras células que migran hacia el interior del *scaffold* se ve reducida. Finalmente, la migración celular se detiene debido a la falta de suministro de oxígeno y nutrientes. La amplitud de la capa de células que puede

alimentarse de la difusión de oxígeno y nutrientes se denomina profundidad de penetración (D_p).

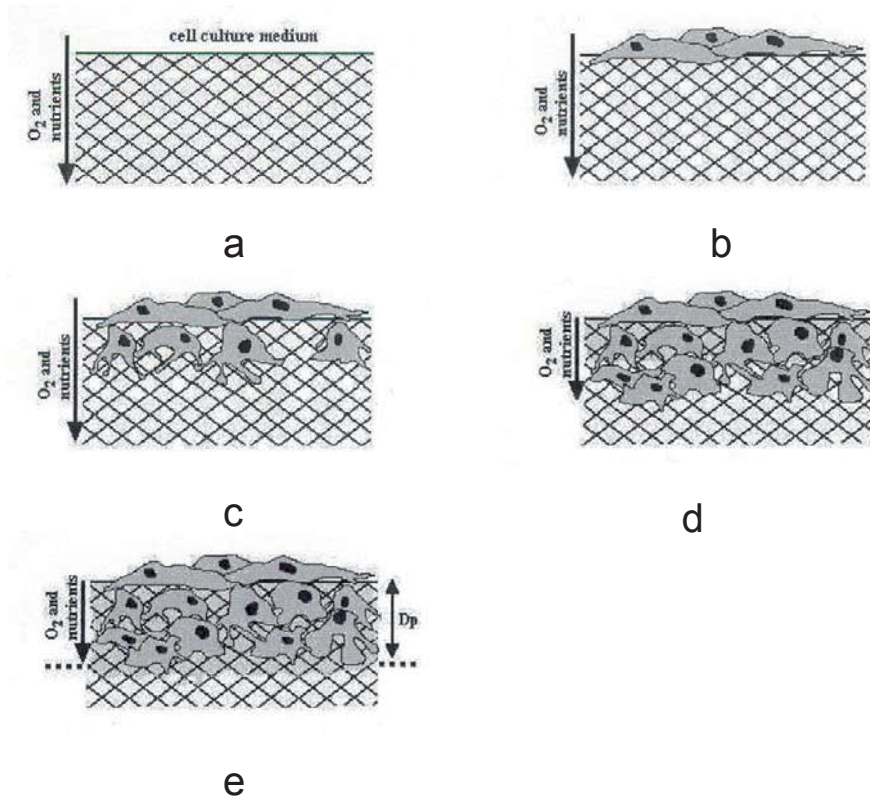


Figura 1.11: Diagrama esquemático que muestra las limitaciones de difusión en *scaffolds* para la ingeniería de tejidos con estructuras esponjosas (Sachlos y Czermuszka, 2003).

Por tanto, la estimulación del crecimiento interno de vasos sanguíneos en el implante aseguraría la supervivencia (Druecke et al. 2004; Rivron et al. 2008) y la función del tejido (Perets et al. 2003), además de favorecer la organización de las células en el tejido deseado (Kaully et al. 2010) ya que se establecería el suministro de nutrientes (Luo et al. 2007) y oxígeno y la eliminación de los productos de desecho (Kaully et al. 2010).

Se han utilizado muchos planteamientos distintos para vascularizar (Hodges y Atala, 2008) el cultivo de tejidos tridimensionales, pero se pueden clasificar en tres enfoques principales: 1) utilizar factores de crecimiento que están embebidos en el *scaffold*, 2) cocultivo de células endoteliales, fibroblastos y células madre o células diferenciadas que sean de nuestro interés, 3) utilizar

matrices de órganos a las que se le han eliminado todas las células o fabricar un sistema vascular mediante técnicas de microfabricación (Kaully et al. 2010). En la **figura 1.12**, se pueden observar los distintos enfoques mencionados. Las características que son aconsejables que posea un *scaffold* para promover la vascularización de los tejidos incluye la interconexión de los poros (Sachlos y

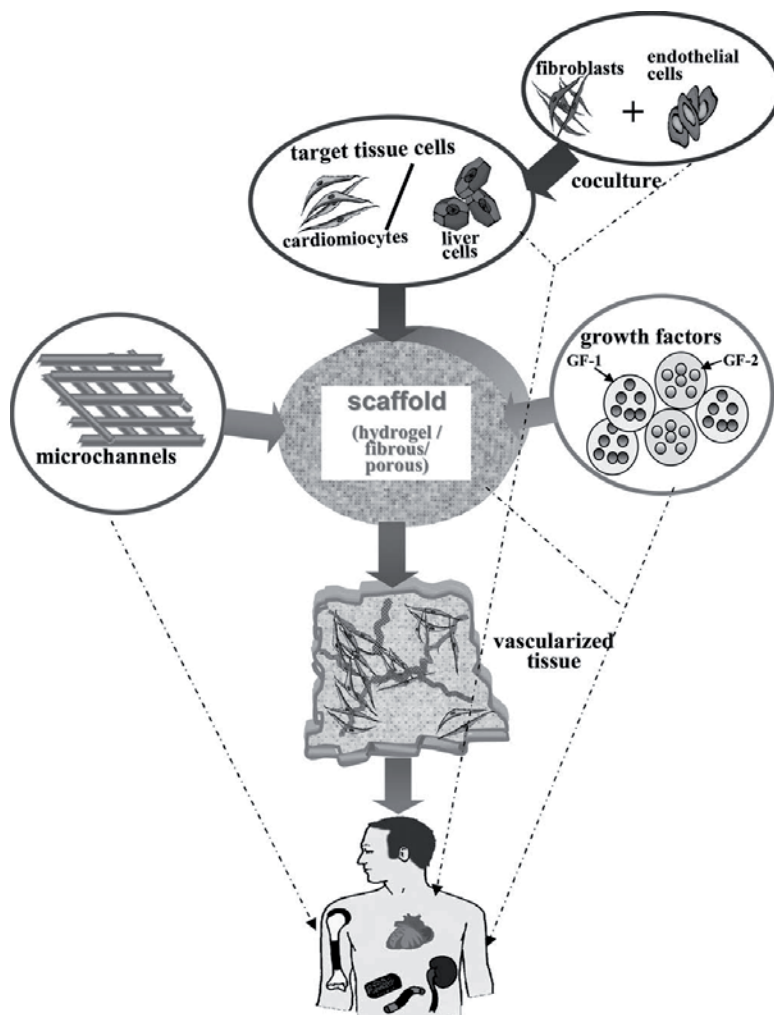


Figura 1.12: Distintos enfoques para vascularizar tejidos. Independientemente, cada método se puede aplicar directamente *in vivo* para facilitar la angiogénesis. Las flechas más grandes indican la integración de los métodos *in vitro* e implantación del tejido junto con el *scaffold* vascularizado. Las líneas punteadas indican la aplicación directa *in vivo* de uno o varios métodos (Kaully et al. 2010).

Czermuszka, 2003), la porosidad y el tamaño de poro (Yang et al. 2001). Alternativamente, se pueden fabricar canales, como se muestra en la **figura 1.12**, imitando las redes de vasos sanguíneos nativos (Rose et al. 2004; Kaully et al. 2010; Liu, 2010; Muller et al. 2010).

Además, el *scaffold* debe tener propiedades mecánicas que coincidan con las de los tejidos en el sitio de implantación (Hutmacher et al. 2001; Sachlos y Czermuszka, 2003; Buckley y O'Kelly, 2004; Nori et al. 2008), es decir, propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y el porcentaje de elongación, entre otros, deben ser lo más cercanos posibles a los del tejido que se reemplaza (compatibilidad mecánica) (Peña y Alvarado, 2010). Por ejemplo, tejidos duros, como el hueso, necesitan *scaffolds* poliméricos rígidos, mientras que un tejido blando, como el nervio, requiere *scaffolds* poliméricos maleables y un tejido elastomérico como la piel (o los vasos sanguíneos) requiere *scaffolds* poliméricos flexibles (Shoichet, 2010).

Además, el *scaffold* debe proporcionar un entorno micromecánico adecuado para promover la síntesis y organización de la ECM ya que las propiedades mecánicas de la ECM natural son muy importantes para establecer las funciones del tejido y para regular el comportamiento celular vía señales de mecanotransducción (Luo et al. 2007) tal y como se comentó en el apartado 1.1.1.2.3. Por tanto, el *scaffold* debe poseer propiedades mecánicas similares a las de las estructuras nativas (Smith et al. 2007).

Por otro lado, las propiedades mecánicas del *scaffold* no sólo deben ser suficientes para que no colapse durante las actividades normales del paciente (Mikos y Temenoff, 2000) sino que tampoco debe hacerlo durante su manejo (Rezwan et al. 2006).

Las propiedades mecánicas del *scaffold* están determinadas por las propiedades de los materiales que los constituyen (Thomson et al. 2000; Liu et al. 2007), la disposición estructural de éstos (tamaño de poro, orientación, etc) (Liu et al. 2007) y la porosidad (Thomson et al. 2000); si bien hay que tener en cuenta que la porosidad y las propiedades mecánicas están interrelacionadas, es decir, mientras que altas porosidades pueden dar lugar a un incremento beneficioso del transporte de masa, puede también comprometer la resistencia mecánica del *scaffold*. Por lo tanto, parece que la porosidad el *scaffold* debe estar dentro de un rango crítico, lo suficientemente pequeño como para mantener la integridad mecánica del *scaffold* y lo suficientemente grande como para proporcionar una actividad biológica óptima (Byrne et al. 2007).

Además, el procesado del polímero también puede afectar a las propiedades mecánicas. La resistencia a la tracción puede, por ejemplo, ser mayor debido a la cristalización de las cadenas de polímero. Alternativamente, el proceso de

fabricación puede causar una reducción en el peso molecular del polímero, dando lugar a un efecto perjudicial sobre las propiedades mecánicas (Thomson et al. 2000).

Por otra parte, el *scaffold* debe ser biocompatible (Gomes et al. 2001; Tan et al. 2003; Shieh y Vacanti, 2005). Esto significa que el material debe integrarse al organismo huésped sin que hayan: 1) efectos tóxicos (citotóxicos (Mikos y Tenemoff, 2000; Rezwani et al. 2006) y/o genotóxicos (Peña y Alvarado, 2010)) (Jones et al. 2006; Schugens et al. 1996a), 2) reacciones inmunológicas, respuesta inmunológica o de cuerpo extraño (Schugens et al. 1996a; Mikos y Tenemoff, 2000; Rezwani et al. 2006; Smith et al. 2007; Peña y Alvarado, 2010) 3) inflamación (Schugens et al. 1996a; Smith et al. 2007); o que estos factores sean mínimos (Freed, 2007), para evitar el rechazo (Schugens et al. 1996a). Con este fin, es necesario que el *scaffold* se pueda esterilizar fácilmente (Thomson et al. 1995; Mikos y Tenemoff, 2000) y adecuadamente (Ng et al. 2009), según las normas internacionales requeridas para su uso clínico (Jones et al. 2006), al igual que todos los implantes médicos después de su fabricación y antes de la colocación quirúrgica (Athanasίου et al. 1996); para asegurar la higiene del *scaffold* (Ng et al. 2009). Fallos en la eliminación de todos los microorganismos contaminantes pueden impedir la función de las células sembradas y dar lugar a infecciones (Mikos y Tenemoff, 2000; Ng et al. 2009) y complicaciones asociadas (Athanasίου et al. 1996).

En este sentido, David Williams ha propuesto: "La biocompatibilidad de un *scaffold* o matriz para un producto de ingeniería de tejidos se refiere a la capacidad para actuar como un sustrato que apoyará la actividad celular apropiada, incluyendo la facilitación de sistemas de señalización molecular y mecánicos, con el fin de optimizar la regeneración de tejidos, sin provocar respuestas indeseables locales o sistémicas en el huésped final" (Shoichet, 2010).

Las técnicas de esterilización más comunes utilizan calor seco, vapor, radiación (p.ej, radiación γ) y productos químicos ya sean gases (p.ej, óxido de etileno) (Athanasίου et al. 1996; Pliikk et al. 2006) o líquidos (p.ej, etanol, formaldehído, hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno) (Ng et al. 2009). En la **tabla 1.3**, se muestra un resumen de las técnicas de esterilización utilizadas para el PLA-PGA indicando sus ventajas e inconvenientes (Athanasίου et al. 1996).

Las técnicas de esterilización, como se desprende de la **tabla 1.3**, pueden afectar significativamente a las propiedades mecánicas, físicas, químicas e incluso la biocompatibilidad. Por tanto, la biocompatibilidad no es solo una cuestión de esterilización sino que la forma física del material, estructura y composición química son factores importantes que determinan su biocompatibilidad (Thomson et al. 1995).

Técnica de esterilización	Ventajas	Desventajas
Esterilización con vapor (presión de vapor alta, 120-135°C)	No residuos tóxicos	Deformación/degradación por ataque del agua, uso limitado para PLA-PGA
Esterilización con calor seco (160-190°C)	No residuos tóxicos	Fusión y reblandecimiento del polímero, no utilizable para PLA-PGA
Radiación (ionizante o γ)	Alta penetración, baja reactividad química, efecto rápido	Inestabilidad y deterioro, entrecruzamiento/rotura de las cadenas del polímero
Esterilización con gas (óxido de etileno)	Rango de temperatura bajo	Proceso largo debido a la desgasificación, los residuos son tóxicos

Tabla 1.3: Técnicas estándar de esterilización y su aplicación para el PLA-PGA (Athanasίου et al. 1996).

Las técnicas de esterilización, como se desprende de la **tabla 1.3**, pueden afectar significativamente a las propiedades mecánicas, físicas, químicas e incluso la biocompatibilidad. Por tanto, la biocompatibilidad no es solo una cuestión de esterilización sino que la forma física del material, estructura y composición química son factores importantes que determinan su biocompatibilidad (Thomson et al. 1995).

Además, las propiedades químicas del polímero juegan un papel importante en la funcionalidad de su superficie y, en consecuencia, en el comportamiento celular. Cuando las células se exponen a superficies poliméricas, una capa de proteínas se adsorbe en la superficie. Por tanto, las células “ven” la capa de proteínas adsorbida en lugar de la superficie polimérica real.

La superficie química de un polímero puede ser ajustada para controlar la adsorción de proteínas, que a su vez controla la adhesión celular. Dependiendo del resultado deseado, la superficie química de un polímero se puede modificar para modular las interacciones de las células adherentes, tales como la morfología, la migración, diferenciación, proliferación y apoptosis. En el contexto de las biointeracciones, propiedades químicas importantes de una superficie polimérica son la mojabilidad (balance hidrófilo/hidrófobo) y la carga (Nori et al. 2008). Muchos trabajos han demostrado que las células prefieren unirse a

superficies hidrofílicas en lugar de hidrofóbicas y en otros estudios, se observó que las células se adhieren, migran y crecen más fácilmente en sustratos con moderada hidrofiliidad que en sustratos hidrofóbicos o muy hidrofílicos (Ma et al. 2003).

Además, las propiedades superficiales no solo son importantes en el comportamiento celular y las funciones del *scaffold*, sino en las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Por tanto, controlar las propiedades superficiales puede ser útil para aminorar las reacciones de cuerpo extraño en la interfase del *scaffold*-huésped *in vivo* (Luo et al. 2007).

Por tanto, el *scaffold* debe poseer una superficie química adecuada para promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Hutmacher et al. 2001; Liu et al. 2007).

Además, cuando la estabilidad de los materiales no es necesaria a largo plazo, se pueden utilizar materiales biodegradables (Pachence et al. 2007). El material debe ser diseñado con una velocidad de degradación (Shieh y Vacanti, 2005) y reabsorción (Buckley y O'Kelly, 2004) controlable para que coincida con el crecimiento del tejido (Luo et al. 2007). Además, el material biodegradable debe poseer propiedades mecánicas apropiadas para la aplicación indicada y la variación de estas propiedades con la degradación debe ser compatible con el proceso de regeneración (Nair y Laurencin, 2007). Por otro lado, los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben poder metabolizarse y eliminarse fácilmente por el cuerpo (Jones et al. 2006; Jardini et al. 2010).

Además, el tamaño y la forma del *scaffold* deben ser adecuados al sitio donde será colocado (Jardini et al. 2010), especialmente si se personaliza para cada paciente (Hutmacher et al. 2004). En general, el *scaffold* debe ser tridimensional (Thomson et al. 1995; Yang et al. 2001; Gomes et al. 2001; Cortesini, 2005; Eisenbarth, 2007).

Por otro lado, el *scaffold* debe ser fácilmente procesado en distintas formas y tamaños (Yang et al. 2001; Sachlos y Czermuszka, 2003). Además, se deben utilizar técnicas de procesamiento que permitan obtener *scaffolds* de una forma reproducible (Gomes et al. 2001; Jardini et al. 2010), económica y en gran escala (Rezwan et al. 2006; Jones et al. 2006; Jardini et al. 2010), con flexibilidad para adaptarse a la presencia de componentes biológicos como las células y factores de crecimiento, en ciertas aplicaciones (Hutmacher et al. 2004). Por otra parte, la técnica de procesamiento no debe afectar la biocompatibilidad del *scaffold* (Thomson et al. 2000; Leong et al. 2003).

En resumen, es de vital importancia que el *scaffold* imite la estructura y

propiedades de los tejidos humanos para dirigir el proceso macroscópico de la formación de tejidos (Jardini et al. 2010).

Los aspectos físicos del diseño del *scaffold*, así como la elección del polímero, dependerán en gran medida de la aplicación final. El *scaffold* tiene por objeto proporcionar las propiedades químicas, físicas y mecánicas necesarias para la supervivencia celular y la formación del tejido. Esencialmente el *scaffold* tiene por objeto definir el microambiente celular (nicho de células) necesario para una función óptima (Shoichet, 2010).

Factores que intervienen en el comportamiento celular a nivel macroscópico, microscópico, y nanométrico incluyen propiedades mecánicas, superficie química, propiedades de transporte de masa (Luo et al. 2007), arquitectura de la matriz, porosidad (Hutmacher et al 2004), etc. Estas propiedades a menudo están relacionadas entre si. Es dentro de este contexto en el que se puede decir que los factores que controlan el diseño de los *scaffolds* son complejos y aún no se entienden completamente (Yang et al. 2001). Además, hay que añadir otras variables que intervienen en el proceso de regeneración de tejidos, como la composición de los componentes biológicos y la variación de éstos con el tiempo (Hutmacher et al. 2004).

La base para diseñar *scaffolds* debe ser un entendimiento de las propiedades del *scaffold* y sus funciones con controles de tiempo y espacio para poder proporcionar las señales necesarias en el momento y lugar adecuados para promover la formación/regeneración del tejido (Liu et al. 2007).

Normalmente, el *scaffold* es una celda abierta tridimensional con una estructura porosa interconectada que permite una comunicación más fácil entre las células dispersas en el *scaffold*. Dependiendo del uso previsto, estas estructuras también son adecuadas para la proliferación, migración y/o diferenciación celular (Shoichet, 2010).

1.1.4 Métodos de fabricación de scaffolds poliméricos

El diseño de los *scaffolds* poliméricos depende de las aplicaciones consideradas, pero en cualquier caso deben conseguirse estructuras con las características mencionadas anteriormente, las cuales son necesarias para su correcta función. El conseguirlo con éxito está condicionado fundamentalmente por dos factores: los materiales empleados y, por la arquitectura estructural, tanto externa como interna, representada básicamente por su porosidad, alta relación superficie/volumen, geometría, tamaño de poro y teniendo en cuenta que las estructuras deben ser procesables fácilmente en estructuras tridimensionales.

En general, el desarrollo de los tejidos se controla en tres escalas de tamaño, tal y como se ha comentado en el apartado diseño de los *scaffolds* (1.1.3). En resumen, el primer nivel, la forma macroscópica, las propiedades mecánicas, la densidad y la porosidad son importantes en la escala de milímetros a centímetros. A nivel intermedio, el tamaño, la estructura y la interconexión de los poros para el crecimiento de tejido son cruciales, en la escala de cientos de micras. Finalmente, la topología de la superficie de los poros y la fisicoquímica superficial son importantes en la escala nanométrica (Peña y Alvarado, 2010).

Idealmente, el *scaffold* debería ofrecer estos tres niveles de control tanto para su composición como para su estructura.

En base a una amplia gama de materiales poliméricos, tal y como se ha descrito en el apartado 1.1.2.3.1, se han desarrollado diversas técnicas de procesado para diseñar y fabricar *scaffolds* 3D para la ingeniería de tejidos (Thomson et al. 1995; Hutmacher, 2000; Hutmacher et al. 2001; Chen et al. 2001b; Cai et al. 2002; Zein et al. 2002; Cai y Cheng, 2003; Leong et al. 2003; Lin et al. 2003; Liu et al. 2007), con el fin de lograr determinadas propiedades a diferentes escalas. Estos métodos se clasifican en convencionales y de prototipado rápido (Peña y Alvarado, 2010).

Sin embargo, ninguna de estas técnicas ha logrado conseguir un modelo de arquitectura tridimensional idónea para que los *scaffold* puedan cumplir con su fin de la forma deseada, incluso utilizando equipos de alto coste, por las razones que a continuación se comentan.

1.1.4.1 Métodos convencionales de fabricación de scaffolds

1.1.4.1.1 Unión de fibras

Scaffolds basados en fibras de PGA (Mikos y Temenoff, 2000) en forma de borlas o fieltro fueron los primeros en utilizarse para la ingeniería de tejidos (Thomson et al. 1995). Sin embargo, a estos *scaffolds* les faltaba la estabilidad estructural necesaria para su uso *in vivo* (Murphy y Mikos, 2007). Para solucionar este problema, se desarrollaron dos métodos de pegado de fibras (*fiber-bonding*). Brevemente, en el primero, las mallas no tejidas (filamentos dispuestos sin ningún orden, es decir sin trama ni urdimbre) de PGA se someten a temperaturas por encima de su punto de fusión, de esta forma las fibras se unen por sus puntos de contacto. Para prevenir el colapso del polímero fundido, es necesario encapsular previamente las fibras de PGA. Para ello, se disuelve PLLA con cloruro de metileno (no disuelve al PGA) y la solución resultante se vierte sobre las mallas no tejidas de PGA y se deja secar, obteniendo una matriz *composite* de PGA-PLLA. Después del tratamiento de calor y pegado de las

fibras, el PLLA se disuelve con cloruro de metileno y el disolvente se elimina a vacío (Thomson et al. 1995; Mikos y Temenoff, 2000; Murphy y Mikos, 2007). Con este método se obtienen porosidades y relaciones área/volumen altas y se han podido cultivar hepatocitos (Mikos y Temenoff, 2000). Sin embargo el método no se presta a un fácil e independiente control de la porosidad y tamaño de poro (Thomson et al. 1995). En la **figura 1.13**, se muestra la morfología de un *scaffold* obtenido mediante esta técnica.

En el segundo método, la malla de PGA se hace girar mientras se rocía con soluciones atomizadas de PLLA o PLGA. La solución polimérica se deposita sobre las fibras de la malla de PGA y las une en los puntos de contacto (Mikos y Temenoff, 2000). Este método proporciona las propiedades mecánicas del PGA y las propiedades de superficie del PLLA o PLGA para las células. Este método es excelente para producir estructuras tubulares que pueden encontrar su aplicación en la regeneración de intestino (Thomson et al. 1995). Sin embargo, no es posible crear estructuras tridimensionales complejas (Murphy y Mikos, 2007).

La fabricación de *scaffolds* mediante la técnica de *fiber-bonding* tiene la ventaja de proporcionar, por un lado, una gran superficie para la adhesión de células así como una rápida difusión de nutrientes, que favorece el crecimiento y supervivencia celular, y por otro lado, estructuras altamente porosas, además de ser un método sencillo. Sin embargo, a estos *scaffolds* les falta la estabilidad estructural necesaria. Además la técnica no se presta a un fácil e independiente control de la porosidad y tamaño de poro (Thomson et al. 1995; Hutmacher, 2000; Chen et al. 2001a; Chen et al. 2001b; Murphy y Mikos, 2007).

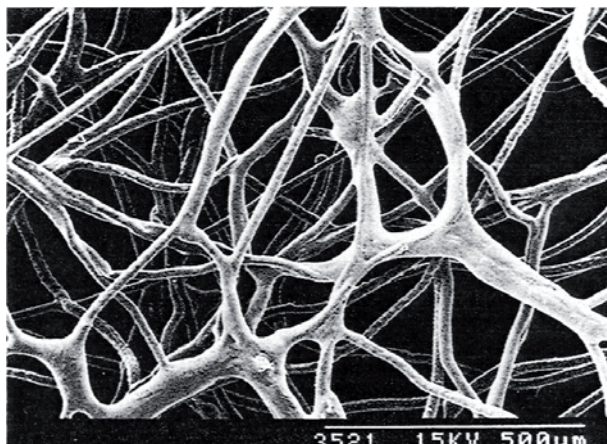


Figura 1.13: Micrografía SEM de un *scaffold* de PGA (Thomson et al. 2000).

1.1.4.1.2 Colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas

Para solventar alguno de los problemas asociados con la técnica de *fiber-bonding* se desarrolló la técnica del colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas (*solvent casting in combination with particle leaching*). Esta técnica consiste en utilizar un porógeno que es soluble en agua, principalmente partículas de sal (cloruro sódico). El primer paso, es disolver el polímero biocompatible con el disolvente adecuado y posteriormente la disolución se vierte sobre el porógeno. Tras la evaporación del disolvente el polímero solidifica. Finalmente, el *composite* polímero-sal, se lixivia con agua para eliminar el porógeno, obteniendo una membrana porosa de polímero (Thomson et al. 1995; Mikos et al. 1996; Cai y Cheng, 2003; Murphy y Mikos, 2007). Esta técnica se ha utilizado para el cultivo de condrocitos (Mikos y Temenoff, 2000; Wang et al. 2006), así como para la regeneración de hueso (Lee et al. 2006).

Mediante esta técnica se han obtenido *scaffolds* de PLA, PLGA y colágeno (Liu et al. 2007). En la **figura 1.14**, se muestra la morfología de un *scaffold* obtenido mediante esta técnica.

En algunas ocasiones, se han utilizado otras partículas como porógeno tales como, azúcar (Cai et al. 2002; Rezwan et al. 2006) y gelatina (Zhou et al. 2005).

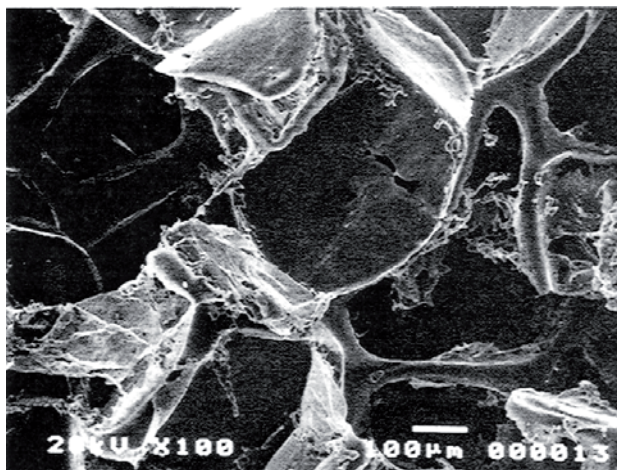


Figura 1.14: Micrografía SEM de un *scaffold* de PLGA utilizando partículas de cloruro sódico como porógeno (Thomson et al. 2000).

Esta técnica, tiene la ventaja de que es sencilla y además la porosidad de los *scaffolds* se puede controlar variando la cantidad de porógeno utilizado. El

tamaño de poro también se puede controlar independientemente de la porosidad al modificar el tamaño del porógeno. Asimismo, se obtienen *scaffolds* con una relación área/volumen elevada. También es posible variar la cristalinidad del polímero si el polímero se calienta por encima de su punto de fusión y se temple a la velocidad apropiada antes de eliminar el porógeno (Thomson et al. 1995; Murphy y Mikos, 2007). Sin embargo, esta técnica aún tiene que superar algunas desventajas para encontrar aplicaciones en ingeniería, principalmente el problema de restos de porógeno, formas de poro irregulares, una insuficiente interconectividad y la limitación a estructuras delgadas (Hutmacher, 2000; Mikos y Temenoff, 2000; Lin et al. 2003; Leong et al. 2003). Además, el uso extensivo de disolventes (algunos de los cuales son tóxicos) en esta técnica presenta una dificultad, ya que cualquier residuo del disolvente podría dificultar la adhesión celular así como la proliferación en el *scaffold* (Thomson et al. 2000; Leong et al. 2003; Rezwan et al. 2006).

Sin embargo, una reciente publicación ha mostrado que disolventes con baja toxicidad se pueden utilizar en esta técnica y los residuos disminuirlos a niveles aceptables para las aplicaciones (Liu et al. 2007).

1.1.4.1.3 Laminación de membranas

Mediante la técnica de laminación de membranas, se puede superar el problema de la limitación a estructuras delgadas que supone el utilizar la técnica anterior (Thomson et al. 2000). Además, permite fabricar formas anatómicas tridimensionales como puede verse en la **figura 1.15**. Esta técnica consiste en la construcción de contornos de la forma deseada. La forma de los contornos se

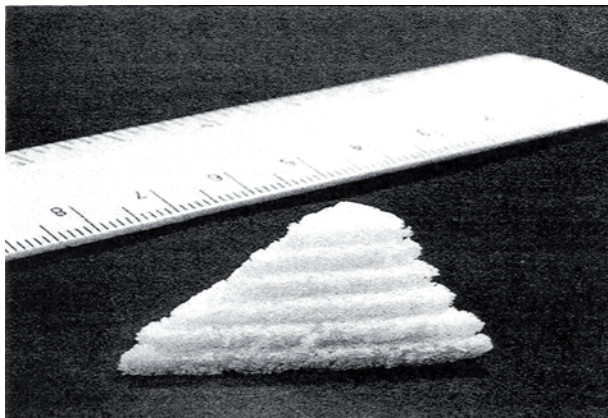


Figura 1.15: Ejemplo de un *scaffold* de PLLA con forma de nariz (Thomson et al. 2000).

obtiene cortando las delgadas membranas que se obtienen por medio de la técnica anterior. Una pequeña cantidad de disolvente (cloroformo) se deposita en las superficies de contacto adyacentes y se forma la unión entre las membranas. Este proceso se repite para las subsiguientes capas hasta que se obtiene la estructura tridimensional deseada (Mikos et al. 1996; Murphy y Mikos, 2007).

Esta técnica además permite obtener estructuras altamente porosas (Thomson et al. 2000). Sin embargo, las estructuras obtenidas presentan una pobre interconectividad. Además les falta estabilidad estructural (Leong et al. 2003; Buckley y O'Kelly, 2004). Por otra parte, los residuos de disolventes orgánicos en el *scaffold* puede tener efectos tóxicos (Thomson et al. 2000; Mikos y Temenoff, 2000).

1.1.4.1.4 Espumado gaseoso

Un método que evita la utilización de disolventes orgánicos es el conocido como espumado gaseoso (*gas foaming*). Este método utiliza la nucleación y crecimiento de las burbujas de gas dispersas en un polímero para generar una estructura porosa. Las burbujas de gas se pueden formar por un agente espumante a través de una reacción química como por ejemplo el bicarbonato sódico que en medio ácido genera dióxido de carbono (Annabi et al 2010). Alternativamente, el agente espumante puede ser liberado de una mezcla gas-polímero presaturada. Un fluido supercrítico, es decir un fluido por encima de su punto crítico, puede ser eficaz en saturar un polímero con gas variando la presión y temperatura. El dióxido de carbono se utiliza habitualmente como fluido supercrítico debido a que es no inflamable ni tóxico y su punto crítico es moderado (31.1 °C y 73.8 bar) (Ji et al. 2012).

La formación de estructuras porosas 3D mediante dióxido de carbono supercrítico consiste en exponer el polímero a altas presiones de dióxido de carbono con el fin de saturarlo (la etapa de presurización). La subsiguiente reducción de presión provoca la nucleación y la formación de poros en el polímero (etapa de despresurización). La formación de poros está basada en la cantidad y la velocidad de reducción de la presión (Thomson et al. 2000; Mikos y Temenoff, 2000; Murphy y Mikos, 2007).

Mediante esta técnica se han obtenido *scaffolds* de PEMA/THFMA para el cultivo de condrocitos (Barry et al. 2004).

El espumado gaseoso tiene la ventaja del procesado a temperatura ambiente además de no utilizar disolventes orgánicos, pero produce una capa externa no porosa y una mezcla de poros abiertos y cerrados en el centro del *scaffold* dejando incompleta la interconectividad como se aprecia en la **figura**

1.16 (Chen et al. 2001a; Chen et al. 2001b; Lin et al. 2003; Buckley y O’kelly, 2004).

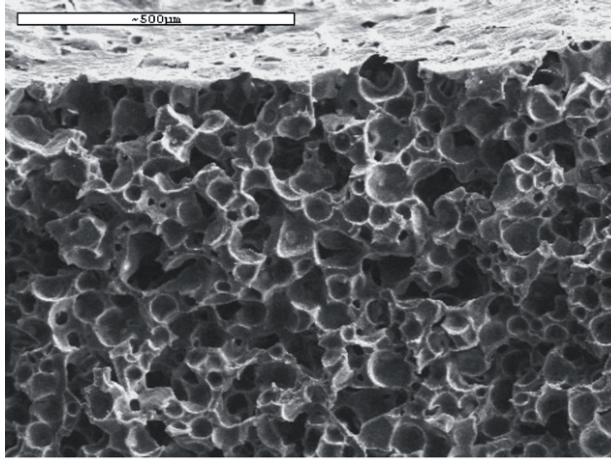


Figura 1.16: Micrografía SEM de un *scaffold* de PLLA obtenido mediante la técnica de *gas foaming* (Tsvintzelis et al. 2007).

1.1.4.1.5 Separación de fases

Otras técnicas propuestas para la fabricación de *scaffolds* están basadas en los conceptos de separación de fases (Schugens et al. 1996a). En esta técnica, una solución homogénea (polímero-disolvente), se vuelve termodinámicamente inestable, ya sea por la exposición de la solución a un no-solvente, químicamente o térmicamente y tiende a separarse en dos fases, una rica y otra pobre en polímero, para reducir la energía libre del sistema (Nam y Park, 1999; Elbert, 2011). Después de eliminar el disolvente por sublimación (Murphy y Mikos, 2007) o extracción (Liu et al. 2007), el espacio ocupado por éste se convierte en los poros, obteniendo el *scaffold* (Liu et al. 2007). Por tanto, hay dos etapas distintas en el proceso de separación de fases: la primera que es la separación de fases propiamente dicha y la segunda que consiste en la eliminación del disolvente, la liofilización si el disolvente se elimina por sublimación.

En las separaciones de fase inducidas térmicamente (TIPS), dependiendo del mecanismo que rige la separación de fases, podemos distinguir entre la separación de fases sólido-líquido y líquido-líquido (Schugens et al. 1996a). En el primero, el mecanismo de la separación de fases está inducido por la cristalización. Cuando la temperatura de cristalización (*freezing point*) del disolvente es mayor que la de separación de fases líquido-líquido, al disminuir la

temperatura de la solución, el disolvente cristaliza y el polímero es expulsado del frente de cristalización (Wei y Ma, 2004). En la **figura 1.17a** se puede observar la morfología de un *scaffold* obtenido mediante este mecanismo. En cambio, en las separaciones de fase líquido-líquido se pueden producir dos mecanismos al enfriar la solución. Entre las curvas binodal y espinodal del diagrama de fases, la separación de fases líquido-líquido tiene lugar a través de un mecanismo de nucleación y crecimiento dando lugar generalmente a una estructura dispersa. Al contrario, debajo de la curva espinodal, la solución experimenta una separación de fases líquido-líquido espontánea (descomposición espinodal) con la formación de una red interconectada de dos fases (Schugens et al. 1996a; Nam y Park, 1999). En la **figura 1.17b** se puede observar la morfología de un *scaffold* obtenido mediante este mecanismo.

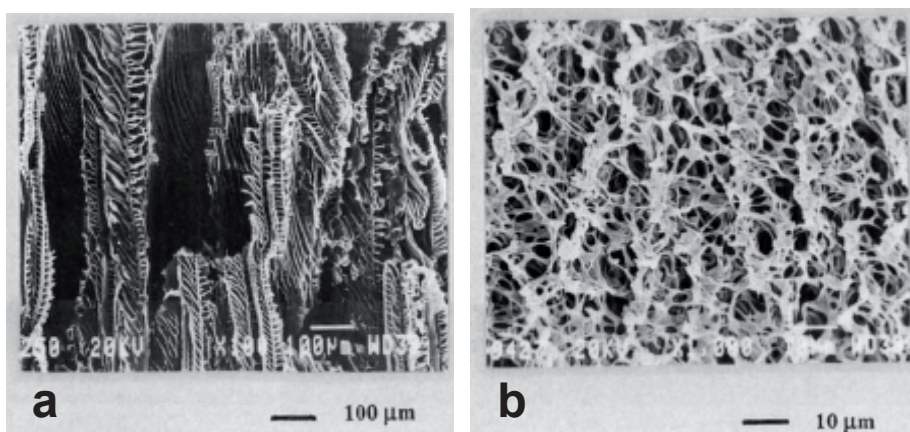


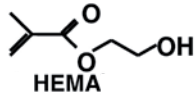
Figura 1.17: Micrografías SEM de *scaffolds* de L-PLA preparados a partir de una disolución al 5% en peso. a) dioxano puro (separación de fases sólido-líquido), b) mezcla dioxano agua (separación de fases líquido-líquido) (Schugens et al. 1996b).

Las técnicas de separación de fases se han utilizado para la fabricación de membranas para aplicaciones no médicas (Hutmacher, 2000) así como para fabricar microesferas para la liberación controlada de fármacos (Thomson et al. 2000).

Así, mediante esta técnica de separación de fases se pueden obtener estructuras porosas fácilmente ajustando parámetros cinéticos y termodinámicos como la temperatura, concentración de polímero, (Jiankang et al. 2007), velocidad de enfriamiento, configuración de la cadena polimérica (Schugens et al. 1996a), concentración de entrecruzador, naturaleza y concentración de los disolventes y naturaleza de los monómeros (Švec y Fréchet, 2003). Además, permite la incorporación de agentes bioactivos. Sin embargo, debido a la complejidad de las variables implicadas en el proceso en esta técnica, la

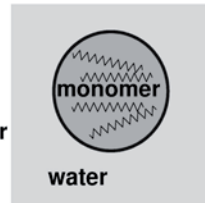
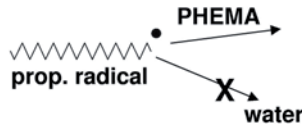
estructura porosa no se controla fácilmente. Además es difícil obtener grandes poros y pueden exhibir falta de interconexión (Hutmacher, 2000; Chen et al. 2001a y b; Lin et al. 2003; Buckley y O'Kelly, 2004; Murphy y Mikos, 2007).

Homogeneous solution



+ excess water

+ initiator



Cell-invasive scaffold

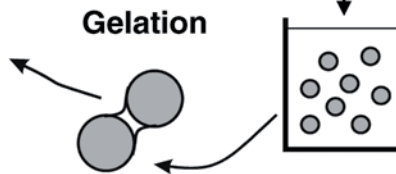
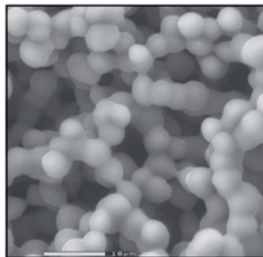


Figura 1.18: Síntesis de un *scaffold* de PHEMA mediante la técnica de separación de fases durante la polimerización (Karp et al. 2003).

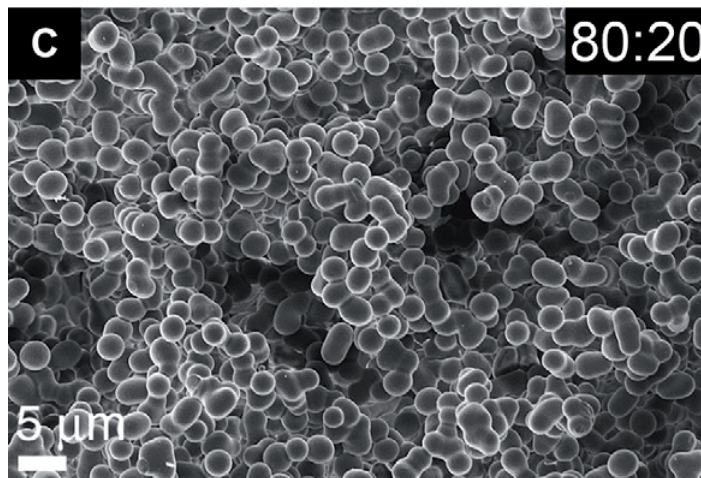


Figura 1.19: Micrografía SEM de un *scaffold* de PHEMA producido a partir de una mezcla de agua:HEMA (80:20), EGDMA (1% mol relativo a HEMA) y DPAP (0.1% relativo al HEMA) (Baker et al. 2009).

Alternativamente, también es posible inducir la separación de fases químicamente. En la **figura 1.18**, se muestra la síntesis de un *scaffold* de PHEMA formado por separación de fases durante la polimerización. Según Elbert (2011), la morfología del *scaffold* (**Figuras 1.18** y **1.19**) se debe a la coalescencia (fusión de dos gotas que entran en contacto debido a la difusión o convección) de las micropartículas formadas por la polimerización por precipitación.

1.1.4.1.6 Liofilización

Cuando la disolución polimérica se ha separado en dos fases, una rica y otra pobre en polímero, es necesario eliminar el disolvente para obtener una estructura porosa. Una técnica utilizada es la liofilización (*freeze-drying*) que consiste en congelar un material y posteriormente sublimar el disolvente congelado.

Esta técnica se ha utilizado con muchos polímeros biocompatibles como el PGA, PLLA, PLGA, agarosa, quitosano y quitosano-gelatina (Madihally y Matthew, 1999; Mao et al. 2003) para la fabricación de guías para nervios (Patist et al. 2004; Stokols y Tuszynski, 2004), cultivo de condrocitos (Chang et al. 2006) y hepatocitos (Seo et al. 2006).

Mediante esta técnica, es posible obtener *scaffolds* porosos (Hutmacher, 2000; Buckley y O'Kelly, 2004). Sin embargo, el tamaño de los poros que se puede obtener es limitado (Murphy y Mikos, 2007) y además no se puede controlar con precisión el tamaño de poro así como su distribución (Jian kang et al. 2007) como se puede ver en las **figuras 1.20** y **1.21**.

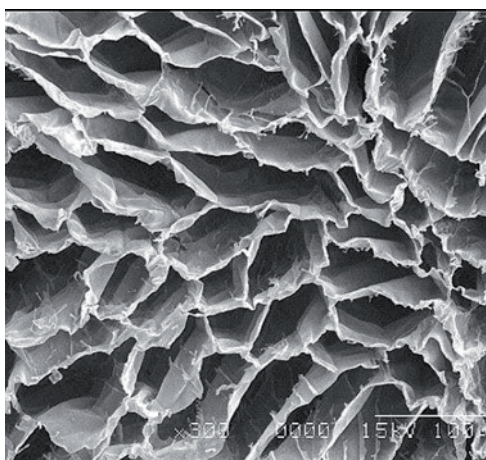


Figura 1.20: Micrografía SEM de un *scaffold* de quitosano obtenido por la técnica de *freeze-drying* (Madihally y Matthew, 1999).

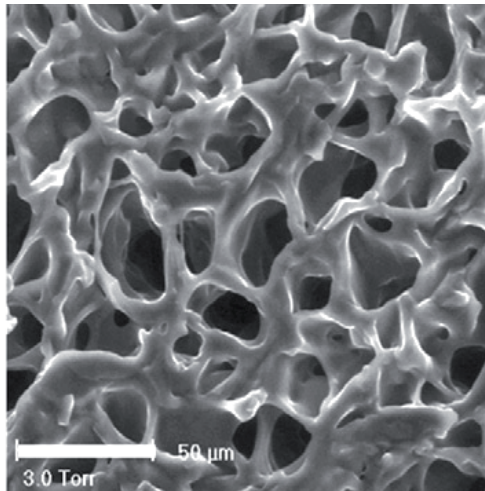


Figura 1.21: Micrografía ESEM de un *scaffold* hidratado de pululano/dextrano (75/25) (Autissier et al. 2010).

También se han descrito combinaciones de estas técnicas convencionales (Kim et al. 2006; Lim et al. 2008).

Los *scaffolds* producidos mediante las técnicas convencionales son muy prometedores y han sido aplicados a una variedad de tejidos con un éxito variable (Leong et al. 2003). Sin embargo, los métodos anteriores, ofrecen poca capacidad para controlar el tamaño, geometría, interconectividad y distribución espacial de los poros (Sachlos y Czermuszka, 2003). Además, ninguna de las técnicas anteriores ha permitido construir *scaffolds* con una morfología altamente regular (Zein et al. 2002), así como la dificultad para alinear poros en formas predeterminadas (Ge et al. 2008). Consecuentemente, la técnica del prototipado rápido (RP) se ha visto como una alternativa viable para lograr el control sobre la arquitectura del *scaffold* (Yeong et al. 2004).

1.1.4.2 Métodos de prototipado rápido de fabricación de scaffolds

El prototipado rápido (RP) también conocido como *solid free form* (SFF) es un conjunto de técnicas de fabricación computerizada que pueden producir objetos físicos tridimensionales altamente complejos utilizando datos generados por sistemas CAD, por tomografía computerizada (CT) o por imagen por resonancia magnética (MRI). Las técnicas de SFF utilizan el concepto de fabricación a capas según el cual se fabrican objetos tridimensionales capa a capa mediante el procesamiento de láminas sólidas o de materiales en forma líquida

o en polvo (Hutmacher, 2000; Griffith, 2002; Taboas et al. 2003; Buckey y O'Kelly, 2004; Murphy y Mikos, 2007; Liu et al. 2007).

Las técnicas de prototipado rápido incluyen impresión tridimensional (3D-P), modelado por deposición en fundido (FDM) y sinterización láser selectiva (SLS) (Leong et al. 2003).

1.1.4.2.1 Impresión tridimensional (3D-P)

La técnica 3D-P utiliza un sistema de impresión convencional (control del eje x e y), similar al funcionamiento de las impresoras de tinta, dirigido por un programa CAD. Una capa de polímero en polvo, como puede ser el PLGA, se extiende sobre la superficie de un pistón. Desde el cabezal de la "impresora" se deposita un líquido aglutinante que disuelve y une las partículas de polvo adyacentes, según el diseño deseado de la capa del *scaffold*. Después de un breve tiempo, el pistón se baja (control del eje z) y se rellena con otra capa de polvo y el proceso se repite. Finalmente, el polvo que no se ha unido por el aglutinante se elimina obteniendo el *scaffold* (Wu et al. 1996; Sachlos y Czermuszka, 2003; Leong et al. 2003; Murphy y Mikos, 2007; Ge et al. 2008). La **figura 1.22**, muestra este sistema y la **figura 1.23**, muestra un *scaffold* obtenido mediante esta técnica.

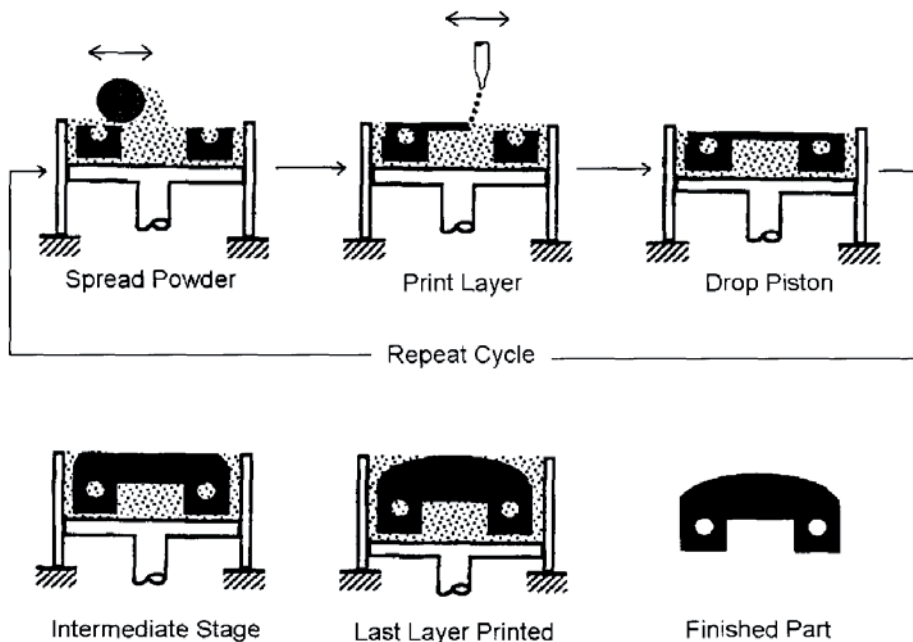


Figura 1.22: Secuencia de operación de la técnica de impresión tridimensional (Wu et al. 1996).

3D-P permite la fabricación de *scaffolds* con estructuras internas complicadas así como formas macroscópicas tridimensionales simultáneamente (Leong et al. 2003; Ge et al. 2008), además de que los polvos no procesados proveen el soporte necesario. También, la simplicidad y versatilidad de 3D-P permite el procesamiento de un amplio rango de biomateriales que incluye polímeros, cerámicas y metales (Leong et al. 2003). Otra ventaja de la técnica 3D-P es que se trabaja a temperatura ambiente y por tanto se puede llevar a cabo el procesamiento de materiales sensibles a la temperatura (Leong et al. 2003; Hutmacher et al. 2004). Sin embargo, la limitada resolución (Ge et al. 2008) debido tanto al tamaño de la boquilla como al grado de control permitido para posicionar al controlador que define el movimiento del cabezal de impresión (Hutchacher et al. 2004), la dificultad para eliminar los polvos que no se han unido dentro de la estructura porosa y el uso de disolventes orgánicos para aglutinar son las principales desventajas (Sachlos y Czermuszka, 2003; Hutmacher et al. 2004; Ge et al. 2008). Además, como se puede ver en la **figura 1.23 (B)**, la superficie rugosa que se obtiene afecta a la eficacia para eliminar materiales atrapados (Hutmacher et al. 2004).

Con esta técnica se han fabricado dispositivos para la liberación controlada, así como para la ingeniería de tejidos de PCL, PLGA y PEO (Bettinger et al. 2007), y de hidroxiapatita para regeneración de hueso (Seitz et al. 2005; Leukers et al. 2005). También se ha realizado cultivos *in vitro* de hepatocitos en *scaffolds* producidos mediante esta técnica, mostrando el crecimiento de estas células en los poros del *scaffold* (Yeong et al. 2004).

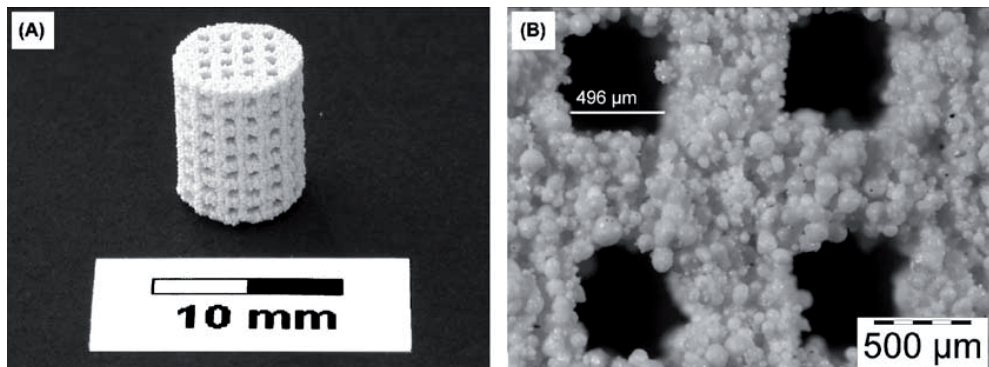


Figura 1.23: *Scaffold* producido mediante impresión tridimensional con canales interconectados. (A) Estructura completa. (B) Vista en detalle de la estructura de canales interconectados con un diámetro de aproximadamente 500 μm (Leukers et al. 2005).

1.1.4.2.2 Modelado por deposición en fundido (FDM)

FDM utiliza una técnica de deposición capa a capa, en la que el cabezal de extrusión FDM funciona en el eje x e y, mientras que una plataforma baja en el eje z para cada capa nueva que se forma. En FDM, un material polimérico termoplástico en forma de filamento, se introduce en el cabezal de extrusión FDM móvil donde se calienta hasta un estado semilíquido. A través de la boquilla del cabezal, se extrusiona y deposita el material sobre la plataforma. Con cada capa depositada y enfriada, la boquilla cambia la dirección de deposición para dar lugar al *scaffold*; uniéndose las capas al solidificar (Hutmacher, 2000). La **figura 1.24**, ilustra el proceso de FDM y la **figura 1.25**, muestra un *scaffold* obtenido mediante la técnica de FDM.

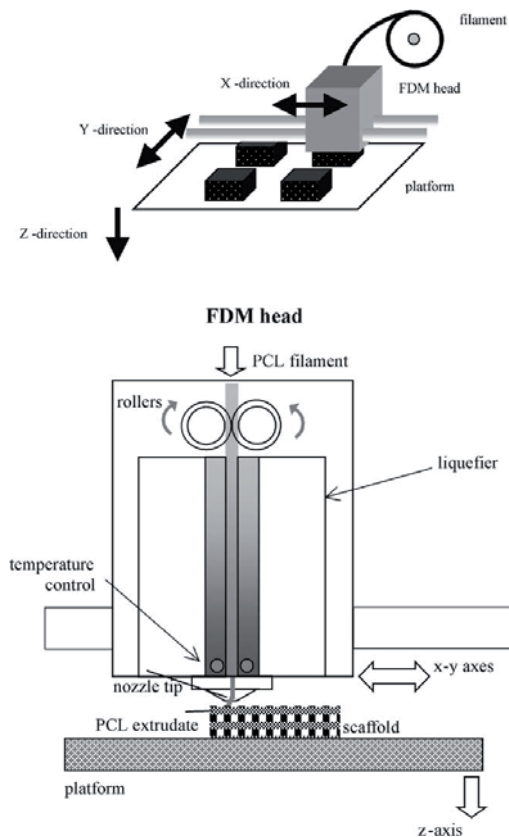


Figura 1.24: Diagrama esquemático del proceso de extrusión y fusión mediante FDM. (Zein et al. 2002).

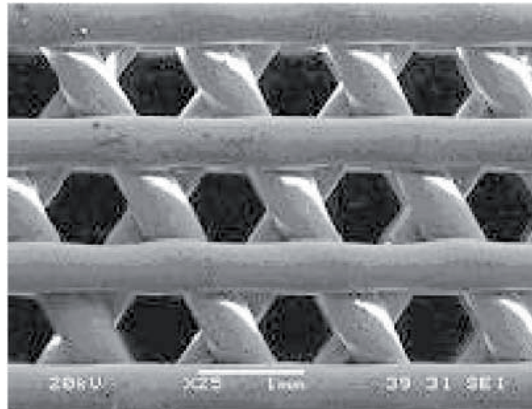


Figura 1.25: Micrografía SEM de un *scaffold* de polietileno de alta densidad obtenido mediante FDM (Leong et al. 2003).

Esta técnica se ha utilizado con diversos materiales como PCL, PLGA y HDPE (Murphy y Mikos, 2007). Cultivos celulares de *scaffolds* de PLC producidos mediante esta técnica, han demostrado la proliferación y la producción de ECM de fibroblastos (Sachlos y Czermuszka, 2003; Tsang y Bhatia, 2004). También se han utilizado mucho para la investigación en ingeniería tisular del hueso (Ge et al. 2008).

Los *scaffolds* fabricados mediante FDM tienen la ventaja de tener buenas, tanto la integridad estructural como las propiedades mecánicas debido a una adecuada fusión entre el material de las capas individuales y al uso de diseños estables mecánicamente (Leong et al. 2003). Además, es posible obtener *scaffolds* con diferentes diseños y por tanto con distinta morfología de poro así como variar la morfología del poro en el mismo *scaffold* al cambiar el diseño de las capas; esto se consigue al variar el ángulo de deposición o la distancia entre los elementos de material polimérico (Ge et al. 2008). Por otra parte, FDM tiene la ventaja de no utilizar disolventes orgánicos tóxicos (Sachlos y Czermuszka, 2003; Liu et al. 2007). Además, una de las principales ventajas de FDM es el control excepcional en el plano xy, sin embargo está limitado en el eje z en el que la altura de los poros está predeterminada por el tamaño del filamento extruido por la boquilla (Tsang y Bhatia, 2004). Otras limitaciones incluyen, la anisotropía entre la dirección xy e z (Buckley y O'Kelly, 2004; Bettinger et al. 2007) debido a que en esta técnica el material fundido se deposita de forma continua para formar cada capa como se puede ver en la **figura 1.26a**, con lo que las aberturas de los poros en la dirección x e y están parcialmente ocluidas por el material depositado que sirve de puente de las trayectorias consecutivas como se puede ver en la **figura 1.26b** (Leong et al. 2003); uso de polímeros sintéticos termoplásticos (Hutmacher et al. 2004; Liu et al. 2007) así como la

necesidad de soportes para diseños complejos que pueden contaminar al *scaffold* (Buckley y O'Kelly, 2004).

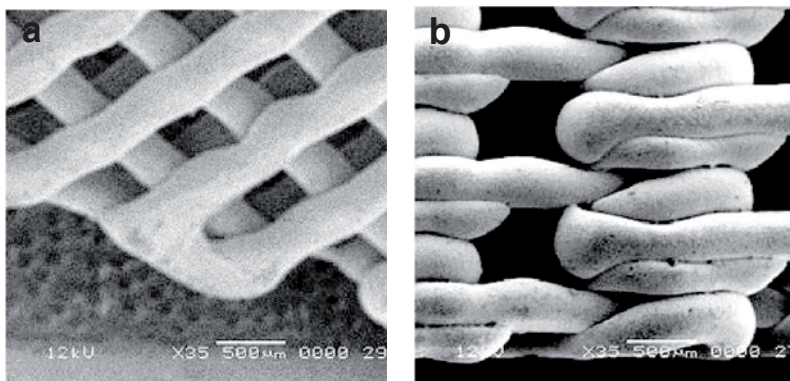


Figura 1.26: Micrografías SEM, donde se muestra la deposición continua del material (a) y la oclusión del poro en los bordes del *scaffold* en las direcciones x e y (b) (Leong et al. 2003).

1.1.4.2.3 Sinterización láser selectiva (SLS)

SLS es similar a 3D-P, pero utiliza un láser de alta potencia (CO_2) para sinterizar el polímero en lugar de dispensar un líquido aglutinante. El láser, dirigido por un programa computerizado, escanea selectivamente la superficie polimérica en forma de polvo. La interacción del rayo láser con los polvos, aumenta la temperatura de éstos por encima de su temperatura de fusión provocando la fusión de las partículas en una estructura sólida. Las capas subsiguientes se construyen encima de las capas sinterizadas previamente mediante nuevas capas de polvo que se depositan con un rodillo encima de la capa sinterizada previamente (Tan et al. 2003; Murphy y Mikos, 2007). Finalmente, el *scaffold* se extrae de los polvos que no se han procesado (Leong et al. 2003; Yeong et al. 2004). La **figura 1.27**, muestra un ejemplo representativo de este proceso (Smith et al. 2007).

Esta técnica se ha utilizado con materiales biocompatibles tales como PLLA, PVA, hidroxiapatita (Murphy y Mikos, 2007) y PCL (Bettinger et al, 2007).

Scaffolds producidos mediante esta técnica se han aplicado en ingeniería tisular del hueso (Tsang y Bathia, 2004; Smith et al. 2007).

La SLS permite la construcción de *scaffolds* con geometrías complejas tanto internas como externas (Williams et al. 2005), con altas porosidades y completa interconectividad (Leong et al. 2003) como se puede ver en la **figura 1.28**.

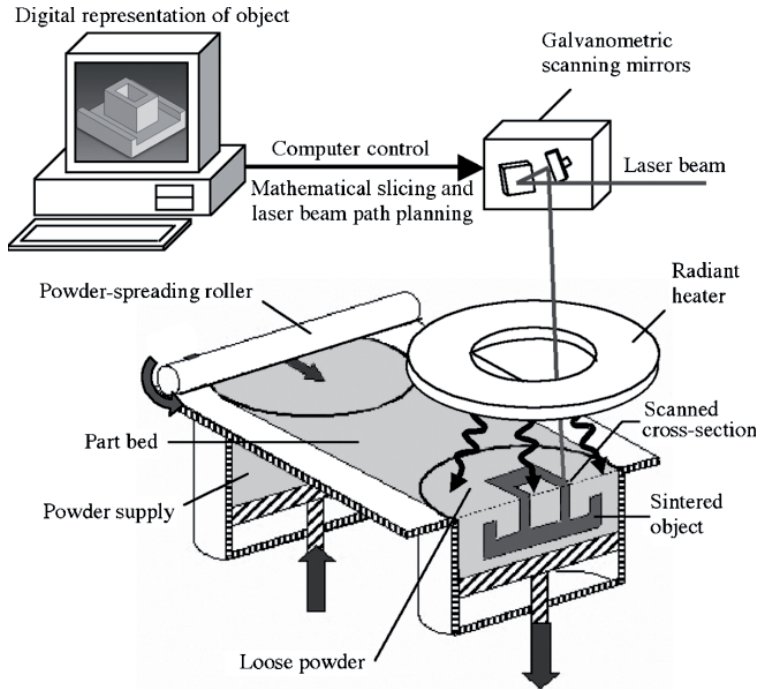


Figura 1.27: Proceso esquemático de fabricación de la técnica SLS (Smith et al. 2007).

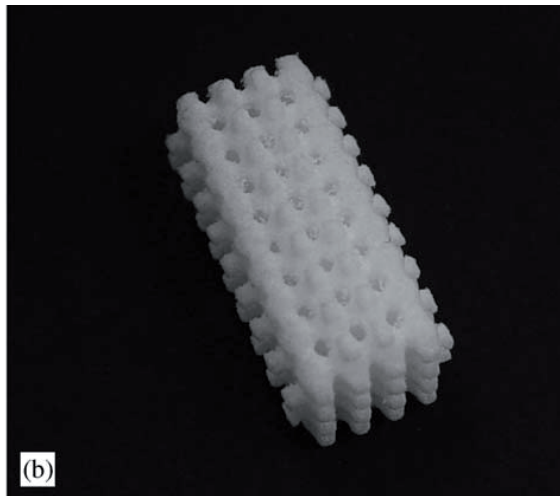


Figura 1.28: Scaffold de PLC producido mediante la técnica SLS. Tamaño de poro 1.75 mm $x=y=z$ (Williams et al. 2005).

Además, tiene la ventaja de no utilizar disolventes orgánicos (Ge et al. 2008; Lohfeld et al. 2010). Sin embargo, el tamaño de poro está limitado por el tamaño de partícula del polvo (Yeong et al. 2004) así como por la presión ejercida al compactar los polvos (Leong et al. 2003) o al sinterizarlos (Ge et al. 2008). Además, la resolución de SLS está limitada por el diámetro del láser, aproximadamente 400 μm (Tsang y Bathia, 2004). Por otro lado, igual que en 3D-P, la distribución del tamaño de poros es muy amplia (Leong et al. 2003). Además, ya que la SLS implica la utilización de altas temperaturas, la técnica está limitada a polímeros estables térmicamente (Leong et al. 2003) para evitar su oxidación, degradación (en términos de la escisión de la cadena) y entrecruzamiento (Hutmacher et al. 2004). Otra desventaja es la contracción del material (Ge et al. 2008).

Estos métodos de fabricación de *scaffolds*, por la técnica SFF (*Solid Free Form*), proporcionan un excelente control sobre la forma externa, geometría e interconectividad interna de los poros, pero ofrece una resolución limitada a escala micrométrica (Taboas et al. 2003). Además el tamaño mínimo de los poros globales es de 100 μm (Liu et al. 2007). Asimismo, requiere una complicada corrección del diseño del *scaffold* debido a la contracción anisótropa durante la fabricación, así como equipamientos algo costosos (Taboas et al. 2003).

En resumen, para cualquier aplicación en la ingeniería de tejidos un *scaffold* debe tener una superficie química apropiada que facilite la adhesión, proliferación y diferenciación celular, ser biocompatible, ser altamente poroso con una relación área/volumen alta, tener resistencia mecánica adecuada y tener adecuado tamaño de poro (Whang et al. 1995; Thomson et al. 1995; Gomes et al. 2001; Hutmacher et al. 2001). La técnica de procesamiento elegida puede tener un gran efecto en las propiedades finales y geometría del *scaffold*. Los distintos métodos mostrados ofrecen una práctica y prometedora solución para fabricar *scaffolds* para reparar y regenerar diferentes tejidos. Cada técnica de procesamiento para fabricar *scaffolds* para la ingeniería de tejidos, como se ha visto, tiene sus ventajas y limitaciones. Por lo tanto, no hay una técnica universal de fabricación de *scaffolds* para todas las aplicaciones en ingeniería tisular (Murphy y Mikos, 2007). El desarrollo, fabricación y evaluación de nuevos biomateriales y *scaffolds* todavía constituyen un área clave de investigación en el campo de la ingeniería de tejidos (Liu et al. 2007).

1.1.5 Bibliografía

Acevedo, A. (2008). Mallas sintéticas irreabsorbibles: Su desarrollo en la cirugía de las Hernias abdominales* Not absorbable synthetic mesh for the repair of groin hernia. *Rev. Chilena de Cirugía* **60**, 457-468.

Ahmad, M. R., Rahman, A. A. A., Rashid, N. A., Saman, R. M., Zaini, K. m. M., Aziz, A. S. A. (2009). Soil sensor. Número de publicación internacional WO2009/157755A2.

Ahsan, T., Doyle, A. M., Nerem, R. M. (2008). Stem cell research. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 28-47. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Athanasidou, K. A., Niederauer, G. G., Agrawal, M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* **17**, 93-102.

Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khandemhosseini, A., Deghani, F. (2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng. Part B* **16**, 371-383.

Autissier, A., Le Visage, C., Pouzet, C., Chaubet, F., Letourneur, D. (2010). Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta. Biomater.* **6**, 3640-3648.

Baker, M. V., Brown, D. H., Casadio, Y. S., Chirila, T. V. (2009). The preparation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly{(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-[poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]} by photoinitiated polymerisation-induced phase separation in water. *Polymer* **50**, 5918-5927.

Barry, J. J. A., Gidda, H. S., Scotchford, C. A., Howdle, S. M. (2004). Porous methacrylate scaffolds: supercritical fluid fabrication and in vitro chondrocyte response. *Biomaterials* **25**, 3559-3568.

Bettinger, C. J., Boresteins, J. T., Langer, R. (2007). Micro- and Nanofabricated Scaffolds. En "Principles of Tissue Engineering". 3ª ed. (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp.341-358. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Binyamin, G., Shafi, B. M., Mery, C. M. (2006). Biomaterials: A primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery* **15**, 276-283.

Buckley, C. T., O'Kelly, K. U. (2004). Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering. En "Topics in Bio-Mechanical Engineering". (Prendergast, P. T., McHugh, P. E. eds), pp 147-166. TBCB & NCBES.

Byrne, D. P., Lacroix, D., Planell, J. A., Kelly, D. J., Prendergast, P. J. (2007). Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: Application of mechanobiological models in tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 5544-5554.

Cai, Q., Yang, J., Bei, J., Wang, S. (2002). A novel porous cells scaffold made of polylactic-dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques. *Biomaterials* **23**, 4483-4492.

Cai, Z., Cheng, G. (2003). Novel method to produce poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds with controlled multi-pore size. *J. Mater. Sci. Lett.* **22**, 153-155.

Chandra, R., Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* **23**, 1273-1335.

Chang, C-H., Kuo, T-F., Lin, C-C., Chou, C-H. (2006). Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials* **27**, 1876-1888.

Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. (2001)a. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C.* **17**, 63-69.

Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. (2001)b. Preparation of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticules. *Biomaterials* **22**, 2563-2567.

Cheung, H-Y., Lau, K-T., Lu, T-P., Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites: Part B* **38**, 291-300.

Chirila, T. V. (2001). An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials* **22**, 3311-3317.

Chung, H. J., Park, T. G. (2007). Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **59**, 249-262.

Cortesini, R. (2005). Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transplant Immunology* **15**, 81-89.

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified formulations. *J. Controlled Release* **119**, 5-24.

Dang, J. M., Leong, K. W. (2006). Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **58**, 487-499.

Dee, K. C., Puleo, D. A., Bizios, R. (2002). Biomaterials. En "An introduction to Tissue-Biomaterial Interactions", pp. 1-13. A John Willey & Sons, Inc., Publications, New Jersey, USA.

Department of Health and Human Services. Stem Cells: *Scientific Progress and Future Research Directions*. June 2001. <info/2001report/2001report>.

Druecke, D., Langer, S., Lamme, E., Pieper, J., Ugarkovic, M., Steinau, H. U., Homann, H. H. (2004). Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 10-18.

Drury, J. L., Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337-4351.

Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 13-32.

Eisenbarth, E. (2007). Biomaterials for tissue engineering. *Adv. Eng. Mater.* **9**, 1051-1060.

Elbert, D. L. (2011). Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogels microspheres for biomedical applications: A tutorial review. *Acta Biomater.* **7**, 31-56.

Engelhardt, F., Funk, R., Riegel, U., Ebert, G., Kleiner, H-J. (1993). Hydrophilic, highly swellable hydrogels. Número de publicación CA2083417(A1).

Eurotransplant International Foundation. (2010). www.eurotransplant.nl

Evans, N. D., Gentleman, E., Polak, J. M. (2006). Scaffolds for stem cells. *Mater. Today.* **9**, 26-33.

Falke, G. F., Atala, A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch. Argent. Pediatr.* **98**, 103-115.

Freed, L. E., Guilak, F. Engineering functional tissues. (2007). En "Principles of Tissue Engineering". 3ª ed. (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp.137-153. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Freshney, R. I., Obradovic, B., Grayson, W., Cannizzaro, C., Vunjak- Novakovic, G. (2007). Principles of tissue culture and bioreactor design. En "Principles of Tissue Engineering". 3ª ed. (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp.155-183. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Furth, M. E., Atala, A. (2008). Current and future perspectives of regenerative medicine. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 2-15. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Ge, Z., Jin, Z., Cao, T. (2008). Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. *Biomed. Mater* **3**, 022001 (11pp) doi:10.1088/1748-6041/3/2/022001.

Gerlach, J. C., Wolf, S. E., Johnen, C., Hartmann, B. (2008). Innovative regenerative medicine approaches to skin cell-based therapy for patients with burn injuries. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 1298-1321. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Gomes, M., Azevedo, H., Malafaya, P., Silva, S., Oliveira, J., Silva, G., Sousa, R., Mano, J., Reis, R. (2008). Chapter 6. Natural polymers in tissue engineering. En "Tissue Engineering". (Van Blitterswijk, C., Tomsen, P., Lindahl, A., Hubbell, J., Williams, D., Cancedda, R., Bruijn, J., Sohier, J. eds), pp 145-192. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Gomes, M. E., Ribeiro, A. S., Malafaya, P. B., Reis, R. L., Cunha, A. M. (2001). A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: morphology, mechanical and degradation behaviour. *Biomaterials* **22**, 883-889.

Guisseppi-Elie, A. (2010). Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials* **31**, 2701-2716.

Gupta, P., Kavita, V., Garg, S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive delivery. *DDT* **7**, 569-579.

Griffith, L. G. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta. Mater.* **48**, 263-277.

Griffith, L. G. (2002). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **961**, 83-95.

Hacker, M. C., Mikos, A. G. (2008). Synthetic polymers. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 604-635. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Hench, L. L. (1980). Biomaterials. *Science* **208**, 826-831.

Hench, L. L., Polak, J. M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science* **295**, 1014-1017.

Hench, L. L., Thompson, I. (2010). Twenty-first century challenges for biomaterials. *J. R. Soc. Interface* **7**, S379-S391.

Hodges, S. J., Atala, A. (2008). La medicina regenerativa y la vejiga neurógena. *Current Urology Reports; Edición en Español* **7**, 43-50.

Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H., Tabata, Y. (2006). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **27**, 4079-4086.

- Huang, S., Fu, X. (2010). Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J. Controlled Release*. **142**, 149-159.
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529-2543.
- Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X. F., Tan, K. C., Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* **1**, 245-260.
- Hutmacher, D. W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K. W., Teoh, S. H., Tan, K. C. (2001). Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.* **5**, 203-216.
- Hutmacher, D. W., Sittinger, M., Risbud, M. V. (2004). Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol.* **22**, 354-362.
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface.* **22**, 489-601.
- Isenberg, B. C., Wong, J. Y. (2006). Building structure into engineered tissues. *Mater. Today* **9**, 54-60.
- Jagur-Grodzinski, J. (2006). Polymers for tissue engineering, medical devices and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polym. Adv. Technol.* **17**, 395-418.
- Jandt, K. D. (2007). Evolutions, revolutions and trends in biomaterials science-a perspective**. *Adv. Eng. Mater.* **9**, 1035-1050.
- Jardini, A. L., Lunelli, B. H., Martínez, G. A. R., Lasprilla, A. J. R., Passos, M. F., Maciel, A. A. W., Silva, J. V., Filho, R. M. (2010). Computer-aid tools for modeling and simulation in the biomaterials production. *Colaob, The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials.*
- Ji, C., Annabi, N., Hosseinkhani, M., Sivaloganathan, S., Dehghani, F. (2012). Fabrication of poly-DL-lactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas foaming technique. *Acta Biomater.* **8**, 570-578.
- Jiankang, H., Dichen, L., Yaxiong, L., Bo, Y., Bingheng, L., Qin, L. (2007). Fabrication and characterization of chitosan/gelatine porous scaffolds with predefined internal microstructures. *Polymer* **48**, 4578-4588.
- Jones, J. R., Lee, P. D., Hench, L. L. (2006). Hierarchical porous materials for tissue engineering. *Phil. Trans. R. Soc. A.* **364**, 263-281.
- Karageorgiou, V., Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterials scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474-5491.

Karp, J. M., Dalton, P. D., Shoichet, M. S. (2003). Scaffolds for tissue engineering. www.mrs.org/publications/bulletin , MRS Bulletin April, 301-306.

Katz, J. L., Misra, A., Spencer, P., Wang, Y., Bumrerraj, S., Nomura, T., Eppell, S. J., Tabit-Azar, M. (2007). Multiscale mechanics of hierarchical structure/property relationships in calcified tissues and tissue/material interfaces. *Mater. Sci. Eng. C.* **27**, 450-468.

Katti, K. S. (2004). Biomaterials in total joint replacement. *Colloids Surf., B* **39**, 133-142.

Kaully, T., Kaufman-Francis, K., Lesman, A., Levenberg, S. (2010). Vascularization: The conduit to viable engineered tissues. En "Advances in tissue engineering: angiogenesis" (Johnson, P. C., Mikos, A. G. eds), pp. 17-27. Mary Ann Liebert, Inc. Publishers, New York, USA.

Khamdemhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., Vacanti, J. P. (2005). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PANS* **103**, 2480-2487.

Kim, S-S., Ahn, K-M., Park, M. S., Lee, J-H., Choi, C. Y., Kim, B-S. (2006). A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* **80**, 206-215.

Ko, H-F., Sfeir, C., Kumta, P. N. (2010). Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Phil. Trans. R. Soc. A* **368**, 1981-1997.

Kubinová, S., Horák, D., Syková, E. (2009). Cholesterol-modified superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 4601-4609.

Kuling, K. M., Vacanti, J. P. (2004). Hepatic tissue engineering. *Transplant Immunology* **12**, 303-310.

Lakes, R. (2000). Composite Biomaterials. En "The Biomedical Engineering Handbook". 2ª ed. 2 Volume Set. (Bronzino, J. D. ed), pp. 40-1—40-13. CRC Press, Boca Raton FL, USA.

Langer, R., Tirrell, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, **428**, 487-492.

Langer R, Vacanti JP. (1993). Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926.

Lee, J. W., Kim, S. Y., Kim, S. S., Lee, Y. M., Lee, K. H., Kim, S. J. (1999). Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 113-120.

- Lee, S. J., Lim, G. J., Lee, J.-W., Atala, A., Yoo, J. J. (2006). In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* **27**, 3466-3472.
- Lee, H., Park, T. G. (2008). Design principles in biomaterials and scaffolds. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 580-593. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.
- Leeuwenburgh, S. C. G., Jansen, J. A., Malda, J., Dhert, W. A., Rouwkema, J., Van Blitterswijk, C. A., Kirkpatrick, C. J., Williams, D. F. (2008). Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the world biomaterials congress 2008. *Biomaterials* **29**, 3047-3052.
- Leong, K. F., Cheah, C. M., Chua, C. K. (2003). Solid Free Form fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* **24**, 2363-2378.
- Leukers, B., Gulkan, H., Irsen, S. H., Milz, S., Tille, C., Schieker, M., Seitz, H. (2005). Hidroxiapatita scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J. Mater. Sci.- Mater. Med.* **16**, 1121-1124.
- Levenberg, S., Khademhosseini, A., Langer, R. (2004). Embryonic Stem Cells in Tissue Engineering. En "Handbook of Stem Cells. Embryonic Stem Cell". (Melton, D., Thomson, J., Gearhart, J., Hogan, B., Pedersen, R., West, M., Lanza, R. eds.) pp. 737-746. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Lévesque, S. G., Lim, R. L., Shoichet, M. S. (2005). Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity. *Biomaterials* **26**, 7436-7446.
- Lim, Y.-M., Gwon, H.-J., Shin, J., Jeun, J. P., Nho, Y. C. Preparation of porous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by gas foaming process and in vitro/in vivo degradation behavior using γ -ray irradiation. (2008). *J. Ind. Eng. Chem.* **14**, 436-441.
- Lin, A. S. P., Borrows, T. H., Cartmell, S. H., Guldborg, R. E. (2003). Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials* **24**, 481-489.
- Liu, C., Xia, Z., Czemuska, J. T. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **85 (A7)**, 1051-1064.
- Liu, J.-C. (2010). A novel strategy for engineering vascularised grafts in vitro. *World. J. Stem. Cells.* **26**, 93-96.
- Liu, W. F., Hui, E. E., Bhatia, S. N., Chen, C. S. (2008). Engineering Cellular microenvironments. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 536-553. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Lloyd, A. W., Faragher, R. G. A., Denyer, S. P. (2001). Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* **22**, 769-785.

Lohfeld, S., Tyndyk, M. A., Cahill, S., Flaherty, N., Barron, V., McHugh, P. E. (2010). A method to fabricate small features on scaffolds for tissue engineering via selective laser sintering. *J. Biomed. Sci. Eng.* **3**, 138-147.

Luo, Y., Engelmayr, G., Auguste, D. T., Ferreira, Lino da Silva., Karp, J. M., Saigal, R., Langer, R. (2007). Three-Dimensional Scaffolds. En "Principles of Tissue Engineering". 3ª ed. (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp. 359-373. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Lv, Qiang., Feng, Q., Hu, K., Cui, F. (2005). Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture. *Polymer* **46**, 12662-12669.

Ma, Z., Gao, C., Gong, Y., Shen, J. (2003). Chondrocyte behaviors on poly-l-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. *Biomaterials* **24**, 3725-3730.

Madhally, S. V., Matthew, H. W. T. (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **20**, 1133-1142.

Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **59**, 207-233.

Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S., Boesel, L. F., Oliveira, J. M., Santos, T. C., Marques, A. P., Neves, N. M., Reis, R. L. (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J. R. Soc. Interface* **4**, 999-1030.

Mano, J. F., Sousa, R. A., Boesel, L. F., Neves, N. M., Reis, R. L. (2004). Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Comp. Sci. Technol.* **64**, 789-817.

Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., Yao, K. D. (2003). Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials* **24**, 1067-1074.

Migliaresi, C., Alexander, H. (2004). Composites. Introduction. En "Biomaterials science: an introduction to materials in medicine". 2ª ed. (Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E eds.), pp. 181-196. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Mikos, A.G. (2003). "NWO | Huygens Lecture 2003: [Tissue Engineering](#)," Netherlands Organization for Scientific Research, The Hague.

- Mikos, A. G., Sakarinos, G., Vacanti, J. P., Langer, R. S., Cima, L. G. (1996). Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures. U.S. Patent number 5514378A.
- Mikos, A. G., Temenoff, J. S. (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* **3**, 114-119.
- Moon, J. J., West, J. L. (2008). Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 300-310.
- Muller, D., Chim, H., Bader, A., Whiteman, M., Schantz, J-T. (2010). Vascular guidance: microstructural scaffold patterning for inductive neovascularisation. *Stem Cells Int.* **2011**, 547247.
- Murali, M., Yeo, S. H. (2004). Rapid biocompatible micro device fabrication by micro electro-discharge machining. *Biomed. Microdevices* **6**, 41-45.
- Murphy, M. B., Mikos, A. G. (2007). Polymer Scaffold Fabrication. En "Principles of Tissue Engineering". 3ªed. (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp. 309-339. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Nair, L. S., Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Poly. Sci.* **32**, 762-798.
- Nam, Y. S., Park, T. G. (1999). Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *J. Biomed. Mater. Res.* **47**, 8-17.
- Narayan, R. J. (2010). The next generation of biomaterial development. *Phil. Trans. R. Soc. A* **368**, 1831-1837.
- National Institute of Health (NIH). (2008). "NIH Definition of Tissue Engineering/Regenerative Medicine." <http://www.tissue-engineering.net/index.php?seite=whatiste>.
- Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O., Planell, J. A. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **5**, 1137-1158.
- Nerem, R. M. (2007). The challenge of imitating nature. En "Principles of Tissue Engineering". (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp.7-14. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.
- Ng, R., Gurm, J. S., Yang, S-T. (2009). Benzalkonium chloride sterilization of nonwoven fibrous scaffolds for astrocyte culture. *The Open Biotechnology Journal* **3**, 73-78.

Ng, K. W., Khor, H. L., Hutmacher, D. W. (2004). In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* **25**, 2807-2818.

Nori, A., Yim, E. K. F., Chen, S., Leong, K. W. (2008). Cell-substrate interactions. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 666-684. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Owen, S. C., Shoichet, M. S. (2010). Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **94**, 1321-1331.

Pachence, J. M., Bohrer, M. P., Khon, J. Biodegradable polymers. (2007). En "Principles of Tissue Engineering". (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp.323-340. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Pamula, E., Blazewicz, M., Paluszkiwicz, C., Dobrzyński, P. (2001). FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibres composites. *J. Molec. Struct.* **596**, 69-75.

Park, J. B. (2000). Biomaterials. Introduction. En "The Biomedical Engineering Handbook". 2ª ed. (Bronzino, J. D. Ed), pp. IV-1—IV-8. CRC Press, Boca Raton FL, USA.

Park, J. B., Lakes, R. S. (2007). Introduction. Definition of Biomaterials. En "Biomaterials: An Introduction". 3ª ed., pp. 1-16. Springer, New York, USA.

Patist, C. M., Mulder, M. B., Gautier, S. E., Maquet, V., Jérôme, R., Oudega, M. (2004). Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* **25**, 1569-1582.

Peña, M. A. V., Alvarado, D. A. G. (2010). Scaffolds implants for bone regeneration. Materials, techniques and modeling by means of reaction-diffusion systems. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* **29**, 140-154.

Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27-46.

Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345-1360.

Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H., Zhang, J. (2000)b. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 9-29.

Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., Cohen, S. (2003). Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate

scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J. Biomed. Mater. Res.* **65A**, 489–497.

Pliik, P., Odelius, K., Hakkarainen, M., Albertsson, A. C. (2006). Finalizing the properties of porous scaffolds of aliphatic polyesters through radiation sterilization. *Biomaterials* **27**, 5335-5347.

Polak, D. J. (2010). Regenerative medicine. Opportunities and challenges: a brief overview. *J. R. Soc. Interface* **7**, S777-S781.

Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K. W. (2001). Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composite Science and Technology* **61**, 1189-1224.

Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413-3431.

Rivron, N. C., Liu, J., Rouwkema, J., De Boer, J., Van Blitterswijk, C. A. (2008). Engineering vascularised tissues in vitro. *European Cells and Materials* **15**, 27-40.

Rojas de Gascue, B., Ramírez, M., Aguilera, R., Prin, J. L., Torres, C. (2006). Los hidrogeles poliméricos como potenciales reservorios de agua y su aplicación en la germinación de semillas de tomate en diferentes tipos de suelos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **7**, 199-210.

Rose, F. R., Cyster, L. A., Grant, D. M., Scotchford, C. A., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M. (2004). In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials* **25**, 5507-5514.

Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., Barbarisi, A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cell. Physiol.* **199**, 174-180.

Sachlos, E., Czermuszka, J. T. (2003). Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cells. Mater.* **5**, 29-40.

Salvay, D. M., Shea, L. D. (2006). Inductive engineering with protein and DNA-releasing scaffolds. *Mol. BioSyst.* **2**, 36-48.

Samadikuchaksaraei, A. (2007). Scientific and industrial status of tissue engineering. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 2897-2909.

Satarkar, N. S., Hilt, J. Z. (2008). Hydrogel nanocomposites as remote-controlled biomaterials. *Acta Biomater.* **4**, 11-16.

Schoen, F. J. (2004). Tissue engineering. Introduction. En "Biomaterials science: an introduction to materials in medicine". 2ª ed. (Ratner, B. D., Hoffman, A. S.,

Schoen, F. J., Lemons, J. E eds.), pp. 709-712. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Schugens, Ch., Maquet, V., Grandfils, C., Jerome, R., Teyssie, Ph. (1996)a. Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: 1. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation. *Polymer* **37**, 1027-1038.

Schugens, Ch., Maquet, V., Grandfils, C., Jerome, R., Teyssie, Ph. (1996)b. Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation. *J. Biomed. Mat. Res.* **30**, 449-461.

Seitz, H., Rieder, W., Irsen, S., Leukers, B., Tille, C. (2005). Three-Dimensional Printing of Porous Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **74B**, 782-788.

Seo, S-J., Kim, I-Y., Choi, Y-J., Akaike, T., Cho, C-S. (2006). Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials* **27**, 1487-1495.

Shah, P., Hillel, A., Silverman, R., Elisseeff, J. (2008). Cartilage tissue engineering. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 1176-1197. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Shanmugasundaram, N., Ravichandran, P., Reddy, P. N., Ramamurty, N., Pal, S., Rao, K. P. (2001). Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials* **22**, 1943-1951.

Shieh, S-J., Vacanti, J. P. (2005). State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building. *Surgery* **137**, 1-7.

Shoichet, M. S. (2010). Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules* **43**, 581-591.

Shu, X. Z., Liu, Y., Palumbo, F. S., Luo, Y., Prestwich, G. D. (2004). In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 1339-1348.

Singh, A., Narvi, S. S., Dutta, P. K., Pandey, N. D. (2006). External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* **29**, 233-238.

Smith, M. H., Flanagan, C. L., Kemppainen, J. M., Sack, J. A., Chung, H., Das, S., Hollister, S. J., Feinberg, S. E. (2007). Computed tomography-based tissue-engineered scaffolds in craniomaxillofacial surgery. *Int J Med Robotics Comput Assist Surg.* **3**, 207-216.

- Stocum, D. L. (2008). Developmental mechanisms of regeneration. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 100-125. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.
- Stokols, S., Tuszynski, M. H. (2004). The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* **25**, 5839-5846.
- Straley, K. S., Foo, C. W. P., Heilhorn, S. C. (2010). Biomaterials design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *Journal of Neurotrauma* **27**, 1-19.
- Sun, H., Qu, Z., Guo, Y., Zang, G., Yang, B. (2007). In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomedical Engineering Online* **6**:41.
- Švec, F., Fréchet, J. M. J. (2003). Chapter 2. Rigid macroporous organic polymer monoliths prepared by free radical polymerization. *Journal of Chromatography Library* **67**, 19-50.
- Swanson, L., Rimmer, S. (2008). Sensor devices. Número de publicación internacional WO2008/059274A1.
- Taboas, J. M., Maddox, R. D., Krebsbach, P. H., Hollister, S. J. (2003). Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials* **24**, 181-194.
- Tan, K. H., Chua, C. K., Leong, K. F., Cheah, C. M., Cheang, P., Abu Bakar, M. S., Cha, S. W. (2003). Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials* **24**, 3115-3123.
- Thomson, R. C., Shung, A. K., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. (2000). Polymer scaffold processing. En "Principles of Tissue Engineering". (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp. 251-262. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.
- Thomson, R. C., Wake, M. C., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. (1995). Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv. In Polym. Sci. (Biopolymers II)* **122**, 245-273.
- Tsang, V. L., Bhatia, S. N. (2004). Three-dimensional tissue fabrication. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1635-1647.
- Tsvintzelis, I., Pavlidou, E., Panayiotou, C. (2007). Porous scaffolds prepared by phase inversion using supercritical CO₂ as antisolvent I. Poly(l-lactic acid). *J. Supercrit. Fluids.* **40**, 317-322.

Tube, R. (2008). Fundamentals of cell-based therapies. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 16-26. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

United Network for Organ Sharing (UNOS). (2010). http://www.unos.org/docs/About_UNOS.ppt.

Vacanti, J., Vacanti, C. A. (2007). The History and Scope of Tissue Engineering. En "Principles of Tissue Engineering". (Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. eds.), pp.3-6. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., Gough, J. E. (2003). Scaffolds and biomaterials for tissue engineering. *Clin. Otolaryngol.* **28**, 165-172.

Vial, X., Andreopoulos, F. M. (2009). Novel biomaterials for cartilage tissue engineering. *Current Rheumatology Reviews* **5**, 51-57.

Wang, Y., Blasioli, D., Dim, H-J. (2006). Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* **27**, 4434-4442.

Wei, G., Ma, P.X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxiapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 4749-4757.

Whang, K., Thomas, C. H., Healy, K. E., Nuber, G. (1995). A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer* **36**, 837-842.

Williams, D. A. (1991). Metabolismo de los fármacos. En "Principios de química farmacéutica" 2ª ed. (Foye, W. O. ed), pp. 94-133. Editotial Reverté, S. A. Barcelona.

Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897-5909.

Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., Krebsbach, P.H., Feinber, S. E., Hollister, S. J., Das, Suman. (2005). Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* **26**, 4817-4827.

Wintermantel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K-L., Lüscher, P., Mathey, M. (1996). Tissue engineering scaffolds using superstructures. *Biomaterials* **17**, 83-91.

Wu, B. M., Borland, S. W., Giordano, R. A., Cima, L. G., Sach, E. M., Cima, M. J. (1996). Solid free-form fabrication of drug delivery devices. *J. Controlled Release.* **40**, 77-87.

Yang, S., Leong, K-F., M. S. E., M. S. M. E., Du, Z., Chua, C-K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Eng.* **7**, 679-689.

- Yang, S., Leong, K-F., M. S. E., M. S. M. E., Du, Z., Chua, C-K. (2002). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques. *Tissue Eng.* **8**, 1-11.
- Yarlagadda, P. KDV., Chandrasekharan, M., Ming, J. Y. (2005). Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Bio-Med. Mater. Eng.* **15**, 159-177.
- Yeong, W-Y., Chua, C-K., Leong, K-F., Chandrasekaran, M. (2004). Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* **22**, 643-652.
- Yuksel, E., Choo, J., Wettergreen, M., Liebschner, M. (2005). Challenges in Soft Tissue Engineering. *Sem. Plast. Surg.* **19**, 261-270.
- Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 1169-1185.
- Zhang, N., Yan, H., Wen, X. (2005). Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain. Res. Rev.* **49**, 48-64.
- Zhou, Q., Gong, Y., Gao, C. (2005). Microstructure and mechanical properties of Poly(L-lactide) scaffolds fabricated by gelatine particle leaching method. *J. Appl. Polym. Sci.* **98**, 1373-1379.
- Zimmermann, W-H., Didié, M., Döker, S., Melnychenko, I., Naito, H., Rogge, C., Tiburcy, M., Eschenhagen, T. (2006). Heart muscle engineering : An update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc. Res.* **71**, 419-429.

1.2 Objetivos

El propósito de este trabajo es ayudar a resolver las limitaciones de los tratamientos actuales asociadas a la sustitución de tejidos (escasez de donantes de tejidos y órganos, rechazos, etc) cuando se han producido pérdidas irreparables de éste, ya sea por lesiones traumáticas o enfermedades. La ingeniería de tejidos combina células, *scaffolds* y factores microambientales con el fin de crear sustitutos biológicos que eviten las limitaciones anteriormente mencionadas. Los *scaffolds* son estructuras porosas de materiales bioestables o biodegradables que serán colonizados por células. El diseño de los *scaffolds* es uno de los principales retos para la ingeniería de tejidos.

El objetivo de esta investigación es sintetizar arquitecturas porosas para utilizarlas en aplicaciones de la ingeniería de tejidos ya sea en el cultivo de tejidos o como una herramienta para estudios básicos de las interacciones entre las células o tejidos y el *scaffold* con el fin de desarrollar *scaffolds* óptimos para la ingeniería de tejidos. El principal objetivo de este trabajo es por tanto desarrollar métodos de síntesis de *scaffolds* 3D porosos para la ingeniería de tejidos que permitan obtener nuevas arquitecturas. Con este fin, se plantean los distintos objetivos por capítulos en función de los distintos métodos de síntesis que se utilizarán para obtener distintos diseños de *scaffolds*.

Capítulo 2

Los objetivos de la investigación expuesta en este capítulo son:

Desarrollar un método de síntesis de *scaffolds* 3D que permita obtener estructuras con una morfología altamente regular sin la utilización ni de equipamientos costosos ni de los conceptos de la técnica de prototipado rápido. Concretamente, el trabajo se centrará en sintetizar una nueva arquitectura que consistirá en canales cilíndricos ortogonales alineados paralelamente con una conectividad controlada. Además, este método debe permitir obtener esta estructura con distintos biomateriales y con distintas estructuras macromoleculares, es decir, redes e IPN's (con el objeto de poder reforzar la estructura). Se sintetizarán hidrogeles y no hidrogeles bioestables. Concretamente se sintetizará esta estructura con PMMA, PEA y copolímeros con distintas composiciones de PEA-co-PHEMA pues son materiales biocompatibles que se utilizan en diversas aplicaciones médicas como en lentes intraoculares, cementación ósea, etc. (Hacker y Mikos, 2008) y además se trata de polímeros con características distintas.

Asimismo se evaluará la influencia de la presión ejercida en el proceso de síntesis de los *scaffolds* en el grosor del *scaffold*, la morfología de los poros y la porosidad.

Los distintos *scaffolds* obtenidos se caracterizarán por microscopia electrónica de barrido y por medidas de porosidad. En el caso del *scaffold* de PMMA con una estructura macromolecular de red, también se caracterizará mecánicamente y se relacionará su respuesta mecánica con la de la muestra no porosa con el fin de evaluar qué características influyen en la respuesta mecánica del *scaffold*.

Capítulo 3

Los objetivos de la investigación expuesta en este capítulo son:

Desarrollar técnicas que permitan producir *scaffolds* 3D con una morfología de poro en forma de canales tubulares paralelos abiertos con arquitecturas laminares y cilíndricas mediante un procedimiento que no suponga el uso de equipos costosos. Este método, al igual que en el Capítulo 2, debe permitir obtener estas estructuras con diferentes materiales biocompatibles, así como poder modificar el tamaño de poro y su porosidad.

Se sinterizaran hidrogeles y no hidrogeles bioestables con diferentes estructuras macromoleculares (redes e IPN's). Al igual que en el Capítulo 2, se sintetizará esta estructura con PMMA, PEA y copolímeros con distintas relaciones hidrófilo/hidrófobo (PEA-co-PHEMA). También se estudiará como el proceso de obtención de IPN's afecta a la porosidad y al tamaño de poro del *scaffold*.

Asimismo los métodos de síntesis de *scaffolds* 3D se modificarán para permitir obtener estructuras laminares con poros en forma de canales tubulares interconectados mediante la sinterización en atmósfera de disolvente para aquellos materiales en los que no se pueda aplicar la sinterización mediante temperatura.

Otro objetivo de este trabajo será obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales tubulares con superficies internas de canal rugosas ya que el comportamiento celular está fuertemente influenciado por la microestructura (tamaño de poro, forma...) así como las propiedades de la superficie, incluyendo la mojabilidad y la rugosidad (Chang y Wang, 2011).

Los distintos *scaffolds* obtenidos también se caracterizarán por microscopia electrónica de barrido, medidas de porosidad y de hinchamiento (*swelling*)

Capítulo 4

Los objetivos de la investigación expuesta en este capítulo son:

Modificar el método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas para producir una nueva estructura porosa interconectada en la que se puedan obtener *microscaffolds* dentro de los macroporos del *macroscaffold*. La creación de *microscaffolds* dentro de los macroporos permitirá aumentar el área superficial para el anclaje y señalización celular (Oh et al. 2007). El trabajo se centrará en desarrollar una estructura porosa 3D con una morfología de poro esférica y con materiales biocompatibles. Se trabajará con polímeros biodegradables, concretamente quitosano en diferentes concentraciones, gelatina y agarosa pues son biomateriales que o bien están aprobados por la FDA (quitosano y gelatina) y están disponibles comercialmente (Dash et al. 2011; Shi et al. 2011) o se utilizan en la industria de la alimentación (agarosa) (Marinho-Soriano y Bourret, 2003) y se trata de biomateriales con distintas propiedades, además de comprobar que el procedimiento utilizado es versátil.

En el procedimiento desarrollado se evitará la utilización de disolventes tóxicos que pudiesen ser perjudiciales para las células si no se eliminan adecuadamente (Vaquette et al. 2008).

Entre las características buscadas de los *scaffolds* está conseguir un gradiente de porosidad y que estos *scaffolds* posean poros esféricos de distintos tamaños con el fin de imitar a los tejidos nativos que poseen gradientes a través de su volumen espacial como sucede en el hueso, la piel o el cartílago (Leong et al. 2008); ya que según Karageorgiou y Kaplan (2005), los gradientes de porosidad y de tamaño de poro influyen en el crecimiento celular y la migración, y en la regeneración y el crecimiento interno de tejido.

Los distintos *scaffolds* obtenidos se caracterizarán por microscopía electrónica de barrido y por medidas de porosidad.

NOTA

En los capítulos 2 y 3 se incluye parte del trabajo de investigación previo que se realizó en la UPV y con el que se obtuvo el Diploma de Estudios Avanzados. Ese trabajo se presenta en el apéndice 6.4 con el fin de poder entender mejor los posteriores trabajos de investigación que han sido realizados.

2 NUEVA ARQUITECTURA FABRICADA CON POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES

2.1 Introducción

En EE.UU solamente, cada año más de 10.000 personas se suman al total de más de 250.000 que están confinadas en sus sillas de ruedas (Patist et al. 2004). Una limitación importante en el tratamiento de lesiones nerviosas, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), es el fracaso de las terapias actuales para inducir la regeneración del nervio. Desafortunadamente, para la lesión del SNC y en particular para la lesión de médula espinal en la actualidad no hay ningún tratamiento disponible para restablecer la función nerviosa (Schmidt y Leach, 2003). Una vía posible para poner remedio a esta situación es la ingeniería de tejidos.

Los *scaffolds* capaces de regenerar o restaurar órganos y/o tejidos han comenzado a revolucionar la medicina y la ciencia biomédica. Se han utilizado para sustentar y promover la regeneración de tejidos. Como se explicó en el Capítulo 1, se han desarrollado diferentes técnicas de procesado para diseñar y fabricar *scaffolds* tridimensionales (3D) para la ingeniería de tejidos. Concretamente, la fabricación de estructuras altamente regulares se realiza mediante los métodos de prototipado rápido o *solid free form*. Los métodos de fabricación de *scaffolds* por la técnica SFF (*Solid Free Form*) proporcionan un excelente control sobre la forma externa, geometría e interconectividad interna de los poros, pero ofrece una resolución limitada a escala micrométrica (Taboas et al. 2003). Además el tamaño mínimo de los poros globales es de 100 μm (Taboas et al. 2003; Liu et al. 2007). Asimismo, requiere una complicada corrección del diseño del *scaffold* debido a la contracción anisótropa durante la fabricación, así como equipamientos costosos (Taboas et al. 2003). Por tanto, es necesario desarrollar rutas alternativas.

Por otro lado, tal y como se explicó en el Capítulo 1, la estructura del *scaffold*, idealmente debería imitar a la del tejido que se desea. Por tanto, para producir un *scaffold* óptimo, es vital determinar qué diseño induce la mejor respuesta celular para una aplicación determinada, además en muchas aplicaciones se deben obtener estructuras con las siguientes características: 1) tener propiedades superficiales adecuadas que promuevan la adhesión, proliferación y diferenciación celular, 2) ser biocompatibles, 3) ser altamente porosos, con una relación área superficial/volumen alta, con una red de poros interconectados para el crecimiento celular y el transporte de nutrientes y productos metabólicos de desecho, 4) tener propiedades mecánicas adecuadas para soportar cualquier tensión *in vivo* para su correcta función (Thomson et al. 1995; Whang et al. 1995; Hutmacher, 2000; Gomes et al. 2001; Chen et al. 2001b; Hutmacher et al. 2001; Taboas et al. 2003). Conseguirlo con éxito está condicionado a dos factores: 1) los materiales utilizados y 2) la arquitectura

estructural, tanto externa como interna, básicamente mostrada por su porosidad, relación área superficial/volumen alta, geometría, tamaño de poro y teniendo en cuenta que las estructuras deben ser fácilmente procesables en 3D.

Respecto a los materiales utilizados, existe una gran diversidad de biomateriales para aplicaciones en la ingeniería de tejidos como metales, cerámicas, polímeros y materiales compuestos (Ramakrisna et al. 2001; Binyamin et al. 2006; Jandt, 2007; Peña y Alvarado, 2010). Una aproximación es la utilización de polímeros. Los polímeros se han utilizado en la ingeniería de tejidos ya que se dispone de una gran variedad de composiciones, propiedades y formas, lo que los hace muy versátiles; además se pueden diseñar y sintetizar redes poliméricas con control a nivel molecular sobre la estructura (por ejemplo, densidad de entrecruzamiento) y con propiedades a medida, tales como la biodegradabilidad, resistencia mecánica y la respuesta química y biológica a los estímulos (Peppas et al. 2006). Por tanto, podemos ajustar con relativa facilidad las propiedades de los polímeros dependiendo de la aplicación particular. Hay que tener en cuenta que la funcionalidad, idoneidad y éxito de los *scaffolds* depende en gran medida de las propiedades del material (biocompatibilidad, composición química, mojabilidad, propiedades mecánicas, etc.). Por tanto, para fabricar *scaffolds* 3D funcionalizados es importante sintetizar arquitecturas que exhiban propiedades deseables que puedan ser adaptadas a las necesidades del huésped.

El interés en los hidrogeles, para aplicaciones en la ingeniería de tejidos, ha aumentado debido a que se pueden diseñar ajustando las propiedades mecánicas y el contenido en agua de los tejidos; además de todas las ventajas que se han descrito en detalle en el Capítulo 1. Sin embargo, su principal desventaja es su baja resistencia mecánica, aunque esto se puede superar ya sea por entrecruzamiento, formación de redes de interpenetración (IPN's) o por cristalización para de este modo reforzar su estructura (Lee et al. 1999). Por tanto, teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de los hidrogeles, se han sintetizado en este trabajo diferentes estructuras macromoleculares, redes y homo-IPN's, con el fin de mejorar sus características mecánicas.

Una red polimérica interpenetrada, IPN, es una combinación de dos o más polímeros en forma de red, en la que al menos una de ellas es sintetizada y entrecruzada en presencia de otra(s). (Bhattacharya y Ray, 2009). Las IPN's se pueden clasificar en secuenciales o simultaneas, según su método de síntesis. Una IPN secuencial se obtiene cuando las redes se sintetizan en pasos subsiguientes. La primera red se forma al polimerizar la primera mezcla de monómero, agente entrecruzador e iniciador o catalizador. Seguidamente, la primera red se hincha con la segunda combinación de monómero y agente entrecruzador y posteriormente se polimeriza en el interior de la primera red para formar la IPN (**Figura 2.1a**). Este, es el proceso que se utilizará en este

trabajo. En las IPN's simultaneas (SIN's), dos monómeros distintos y agentes de entrecruzamiento se polimerizan juntos en una etapa (**Figura 2.1a**). La clave para el éxito de este proceso es que los dos componentes deben polimerizar por reacciones que no interfirieran una con otra. Esto a menudo se logra mediante la polimerización de una red por una reacción de condensación, mientras que la otra red se forma por una reacción de radicales libres. Según su estructura, las IPN's se pueden clasificar en full-IPN's, homo-IPN's, semi-IPN's, latex IPN's, thermoplastic IPN's and gradient IPN's. Las full-IPN's constan de dos redes que están idealmente yuxtapuestas, lo que genera muchos enmarañamientos e interacciones entre las redes. Las homo-IPN's son un tipo especial de full-IPN's donde los dos polímeros utilizados en las redes son el mismo. En la **figura 2.1b** se han dibujado los esquemas de estos dos tipos de IPN's.

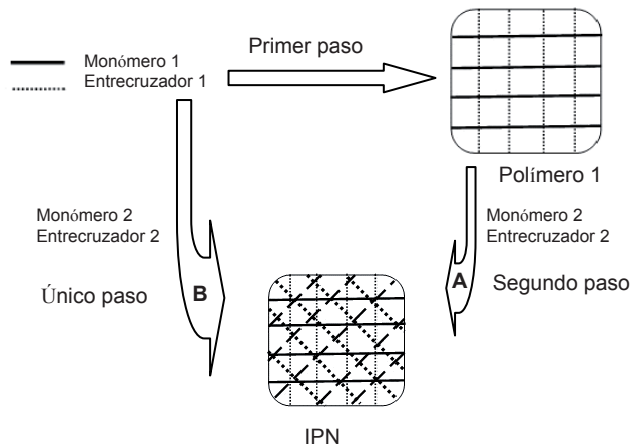


Figura 2.1a: Diagrama esquemático para la síntesis de: (A) IPN secuencial y (B) IPN simultánea (Suresh et al. 2011).

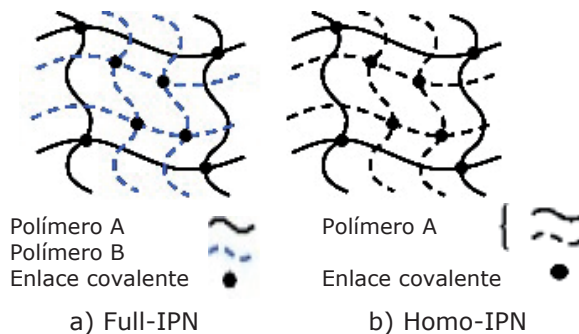


Figura 2.1b: Representación esquemática de: a) Full-IPN y b) Homo-IPN.

Muchos trabajos de investigación han demostrado que las IPN's mejoran significativamente las propiedades mecánicas. Lou et al. (1999), produjeron homo-IPN's secuenciales utilizando HEMA. Finalmente concluyen que la formación de IPN's es un buen método para mejorar la resistencia de esponjas de PHEMA. Por otro lado, las IPN's obtenidas, por Park et al. (2001), demostraron que las propiedades mecánicas eran dependientes de las concentraciones de los polímeros que las componen.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que las características físicas de los hidrogeles no son suficientes para desempeñar la función de sustentar y promover el crecimiento de tejido. Es por ello por lo que la arquitectura espacial también es importante. Para que un *scaffold* sea útil, la interconectividad, tamaño de poro, porosidad y propiedades mecánicas son importantes. Este último requisito es difícil de combinar con la elevada porosidad del material. Esta es la razón por la que es necesario utilizar matrices poliméricas reforzadas, especialmente si el polímero es un hidrogel como anteriormente se ha comentado.

Es comúnmente aceptado que la orientación física de los axones es un componente vital de la reparación del nervio (Schmidt y Leach, 2003). Se han utilizado muchos materiales en un intento de guiar físicamente la regeneración de nervios dañados (Prang et al. 2006). Kang et al. (1999), concluyen que la alineación preferencial de canales porosos puede proporcionar una ventaja única en ciertas aplicaciones médicas, tales como la regeneración de nervios. En otro trabajo, Blacher et al. (2003), fabricaron *scaffolds* altamente orientados de PLA para la regeneración de médula espinal y demostraron que macroporos altamente orientados son eficaces en la regeneración axonal tanto en el SNC como en SNP. Se observó migración celular, angiogénesis y la orientación esperada de crecimiento axonal. Los axones estaban perfectamente alineados a lo largo de la dirección del poro, lo que confirma el papel crucial de las estructuras poliméricas 3D. Por otra parte, en el trabajo desarrollado por Plant et al. (1995), se demostró que esponjas 3D PHEMA (hidrogel) con diámetros entre 10 y 30 μm son capaces de hospedar una población purificada de células gliales (células que ayudan a la función de las neuronas e incluyen las células de Schwann en el SNP y los astrocitos y oligodendrocitos en el SNC (Schmidt y Leach, 2003)) y proporcionan un soporte para el crecimiento regenerativo de axones en el tracto óptico lesionado en ratas. Además, demostraron que estas esponjas pueden actuar como puentes prostéticos en la reparación de lesiones del SNC. Sin embargo, deducen que se necesita más investigación para optimizar su procedimiento, como proporcionar una red trabecular (red de tejidos esponjosos situados alrededor de la base de la córnea) más orientada dentro del *scaffold* de hidrogel. Por otro lado, en la investigación llevada a cabo por Schugens et al. (1996), se produjeron esponjas macroporosas con diámetros de canal de aproximadamente 100 μm mediante la técnica de

separación de fase sólido-líquido para la regeneración de nervios. Concluyeron que la regeneración de nervios puede ocurrir sólo a través de una estructura de poros interconectados de diámetro comprendido entre 10 y 100 μm . En el estudio desarrollado por Maquet et al. (2001), se prepararon esponjas de poli(D,L-láctico) con macroporos organizados longitudinalmente, de 100 μm , mediante la técnica de liofilización para la regeneración de médula espinal. Mostraron que el ensamblaje en paralelo de tubos porosos (diámetro $\sim 100 \mu\text{m}$) que contienen un copolímero anfifílico es una estrategia prometedora para reparar la médula espinal de ratas adultas y también confirmaron una alta densidad de células en la superficie de las estructuras interconectadas. Sin embargo, según Prang et al. (2006), la mayoría de los sustratos utilizados no permiten la regeneración axonal orientada longitudinalmente, ya que se caracterizan por ser estructuras 3D más o menos amorfas.

El objetivo de este capítulo es desarrollar un nuevo método sencillo y económico para la fabricación de *scaffolds* con una nueva estructura altamente regular con polímeros biocompatibles. Además, teniendo en cuenta que las propiedades de los materiales son un factor importante para que los *scaffolds* tengan éxito en la ingeniería de tejidos, además de las distintas posibilidades de aplicación de la estructura desarrollada, en este estudio, se han sintetizado estructuras porosas con diferentes polímeros biocompatibles con distintas propiedades físicas y químicas como hidrogeles y no hidrogeles, redes y homo-IPN's, polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos, copolímeros con distintas relaciones hidrófilo/hidrofobo en un *scaffold* nuevo. Para el desarrollo de este proceso se ha estudiado el efecto de algunos de los parámetros (número de capas de tela, presión y tiempo de aplicación) sobre las características del *scaffold*. Aunque se ha hecho mucha investigación con redes e IPN's con PMMA, PEA y PHEMA, en este trabajo se han sintetizado estos polímeros con diferentes estructuras macromoleculares (redes e IPN's) y composiciones buscando además una nueva estructura.

La estructura buscada (*scaffold*) en este trabajo, podría encontrar aplicaciones como estructuras que faciliten la regeneración o la reparación de tejidos durante operaciones reconstructivas. La aplicación prevista de estas estructuras es la cirugía del nervio (Plant et al. 1995; Schugens et al. 1996; Kang et al. 1999; Maquet et al. 2001; Schmidt y Leach, 2003; Blacher et al. 2003;) o sistemas para favorecer la vascularización (Kaully et al. 2010). La nueva estructura también podría encontrar aplicaciones en otras áreas donde la morfología del poro pueda jugar un papel esencial, tales como membranas (Nikpour et al. 1999) y filtros (Cavallini et al. 2000).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Materiales

Los monómeros utilizados son de la familia de los acrilatos y metacrilatos ya que sus polímeros son materiales biocompatibles que se utilizan con éxito en aplicaciones biomédicas (Eschbach, 2000; Hacker y Mikos, 2008; Belmonte, 2008).

Para la síntesis de los polímeros y copolímeros se han utilizado los siguientes reactivos:

Monómeros: metacrilato de metilo (MMA, 99%, Aldrich), acrilato de etilo (EA, 99%, Aldrich), metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, 99%, Aldrich) y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA, 98%, Aldrich) como entrecruzador. Asimismo se ha utilizado 2,2'-Azobisisobutironitrilo (AIBN, pureza $\geq 98\%$, Fluka) como iniciador radicalario.

Para la obtención del *template*, se han utilizado telas de poliamida 6,6, PW43, en lo sucesivo nylon. En la **figura 2.2**, se muestra la tela de nylon tal y como la suministra el proveedor. Para eliminar el *template*, se ha utilizado ácido nítrico (60%, Scharlab).

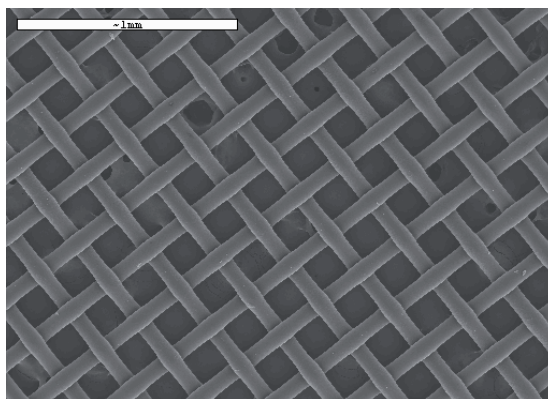


Figura 2.2: Micrografía SEM del tejido de poliamida 6,6 (nylon). Barra de escala 1 mm.

Para lavar las muestras se ha utilizado etanol absoluto (99.7%, Scharlab) y para realizar las medidas de porosidad se ha utilizado agua destilada y n-octano (99%, Aldrich) con una densidad de 0.7 g/cm^3 .

Todos los materiales se han utilizado tal y como los suministra el proveedor.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Fabricación del *template* porogénico 3D

Se han desarrollado dos procedimientos para la obtención del *template* porogénico 3D.

2.2.2.1.1 Primer procedimiento: obtención del *template* en un paso

Ocho piezas rectangulares de tela de nylon se apilaron, se coloraron entre dos placas de vidrio y se sellaron con pinzas. Seguidamente, el molde de vidrio junto con las telas de nylon apiladas se colocó en un horno tubular eléctrico para sinterizarlas mediante un proceso que consistió en una isoterma de 220°C durante 10 min, como se muestra en la **figura 2.3**. Se eligió esta temperatura tras estudiar diversos programas de temperatura con el objeto de que se sinterizaran las telas de nylon apiladas.

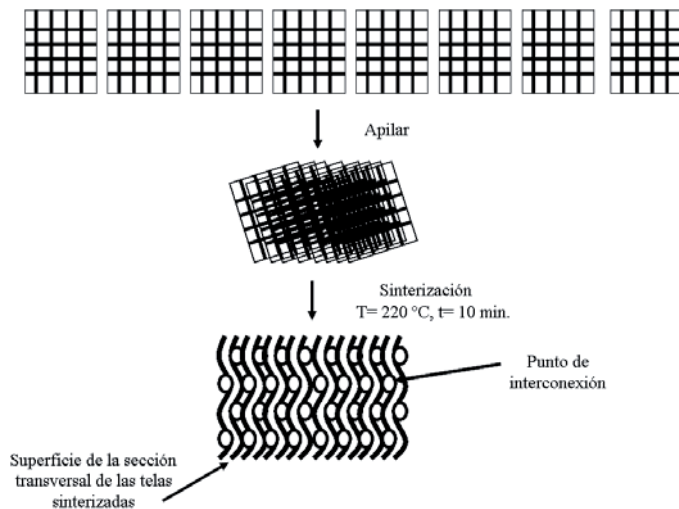


Figura 2.3: Descripción esquemática del proceso de obtención del *template* según el primer procedimiento.

2.2.2.1.2 Segundo procedimiento: obtención del *template* en dos pasos

Piezas rectangulares de tela de nylon se apilaron, se colocaron en un molde metálico y se comprimieron en una prensa de platos calientes a presión constante y a 180°C como se muestra en la **figura 2.4**. Posteriormente, las telas comprimidas se colocaron en un molde de vidrio y se pusieron en un horno

tubular eléctrico para sinterizarlas mediante un proceso que consistió en una isoterma de 220°C durante 10 min. Una vez definido el proceso de obtención del *template*, se decidió estudiar el efecto de las variables del proceso para analizar su efecto.

En la **tabla 2.1** se muestran las condiciones de tiempo, presión y número de piezas de nylon apiladas durante el proceso de compresión.

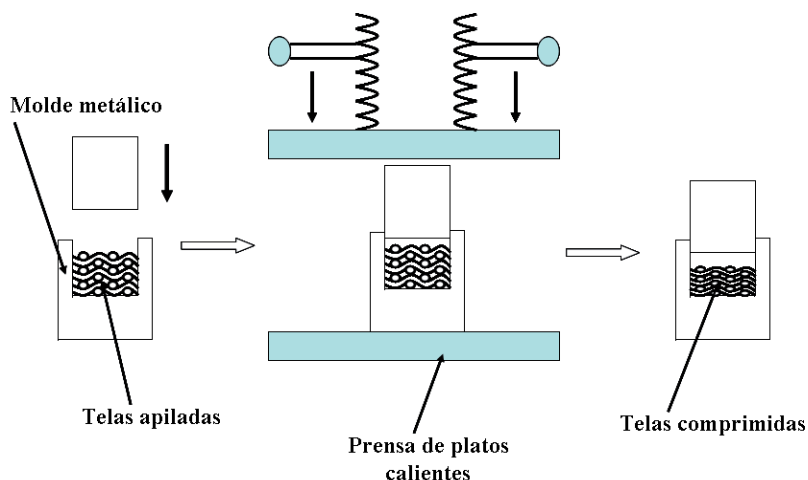


Figura 2.4: Diagrama esquemático que muestra la compresión de las telas para la obtención del *template* según el segundo procedimiento.

Presión (Pa)	Nº piezas	Tiempo (min)	Muestra
$(30.41 \pm 0.07) 10^6$	33	60	(-)
$(30.41 \pm 0.07) 10^6$	33	90	1
$(30.41 \pm 0.07) 10^6$	33	180	2
$(70 \pm 3) 10^6$	33	60	3
$(70 \pm 3) 10^6$	33	90	4
$(70 \pm 3) 10^6$	33	180	5
$(13.2 \pm 0.5) 10^7$	33	60	6
$(13.2 \pm 0.5) 10^7$	33	90	7
$(13.2 \pm 0.5) 10^7$	33	180	8
$(7.0 \pm 0.9) 10^6$	33	90	9
$(67 \pm 3) 10^6$	8	90	10
$(67 \pm 3) 10^6$	20	90	11
$(67 \pm 3) 10^6$	33	90	12

Tabla 2.1: Condiciones de presión, número piezas y tiempo utilizadas para la obtención del *template* porogénico 3D. Donde Nº representa número. La muestra (-) se estropeó.

2.2.2.2 Fabricación de los scaffolds

El proceso de fabricación de *scaffolds* se muestra en la **figura 2.5**.

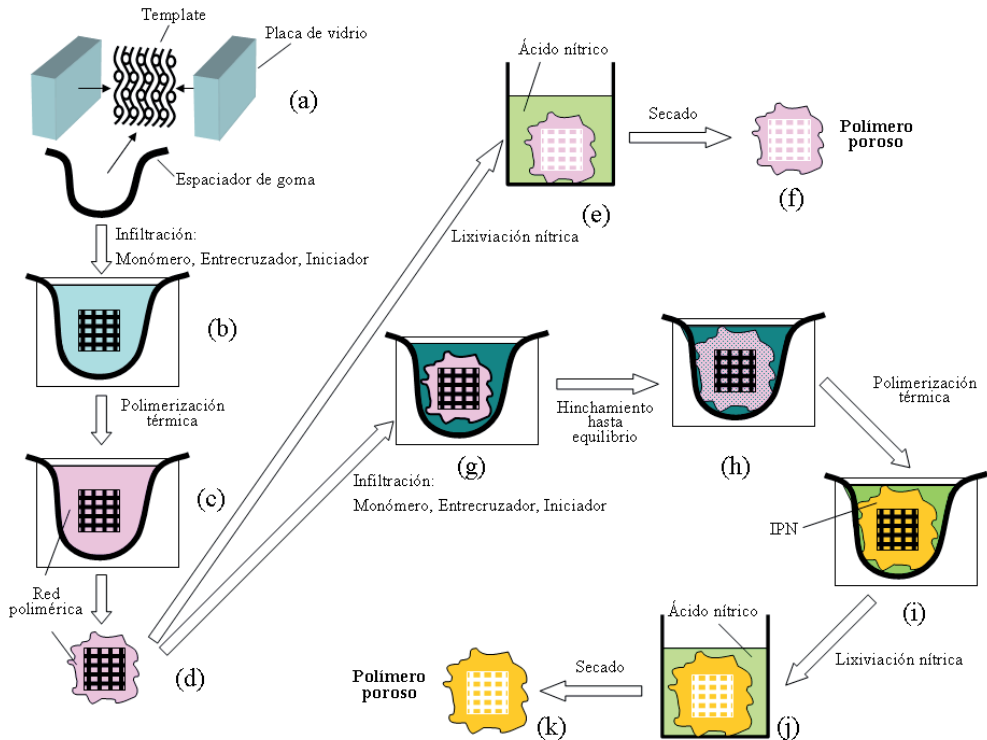


Figura 2.5: Diagrama esquemático del proceso de fabricación de *scaffolds* 3D con estructura macromolecular de red y de IPN.

El *template* 3D sinterizado se colocó entre dos placas de vidrio cubiertas con una película de celofán y se sellaron con espaciadores de goma (a). Cantidades apropiadas de los monómeros, agente entrecruzador (EGDMA, 1% en peso) e iniciador térmico (AIBN, 0.2% en peso) se colocaron en un vaso de precipitados. La mezcla homogénea líquida de monómero, agente entrecruzador e iniciador se vertió en el molde de cristal donde se encuentra el *template* (b). La polimerización se realizó a 65°C en un baño termostático durante 30 min en atmósfera de nitrógeno (Dziubla et al. 2001). Seguidamente, el molde se colocó en un horno a 65°C durante 4 h seguido de un aumento de la temperatura a 75°C durante 24 h (c).

Una vez concluido el proceso de polimerización, la muestra se extrajo del molde (d) y se trató en una máquina pulidora LaboPol-21 (Struers).

Para eliminar el porógeno, la muestra se sumergió a temperatura ambiente durante 5 días en ácido nítrico para disolver al porógeno (e), seguidamente el material se lavó en un extractor Soxhlet, utilizando etanol como solvente durante 48 h, para extraer las sustancias de bajo peso molecular y eliminar los restos de ácido nítrico. Posteriormente, la muestra se secó en condiciones ambientales durante 1 día, permitiendo que se encoja lentamente, intentando evitar que se enrolle o flexione al principio del secado, y finalmente se secó a vacío a 120°C durante 48 h (f). Los *scaffolds* se almacenaron en un desecador hasta su caracterización.

Mediante el proceso descrito anteriormente, la estructura macromolecular del polímero que constituye el *scaffold* es una red polimérica de PMMA.

Alternativamente, como se muestra en la **figura 2.5**, podemos obtener IPN's. Para ello, se procedió como se ha descrito anteriormente hasta la etapa (d); obteniéndose una muestra que comprende el *template* y la red polimérica. Seguidamente, cantidades apropiadas de los monómeros, agente entrecruzador (EGDMA, 1% en peso) e iniciador térmico (AIBN, 0.2% en peso) se colocaron en un vaso de precipitados. La mezcla homogénea líquida de monómero se vertió en el molde (g) donde se encuentra la muestra (d). Posteriormente, la muestra (d) con la mezcla homogénea líquida de monómero se dejó en reposo, hinchándose, hasta que se alcanzó el equilibrio (h). La polimerización se realizó a 65°C en un baño termostático durante 30 min en atmósfera de nitrógeno. Seguidamente, el molde se colocó en un horno a 65°C durante 4 h seguido de un aumento de la temperatura a 75°C durante 24 h (i).

Una vez concluido el proceso de polimerización, la muestra se extrajo del molde y se trató con una máquina pulidora LaboPol-21 (Struers).

Para la eliminación del porógeno (j) y posterior secado (k), se procedió de manera similar a la anteriormente descrita para la obtención de redes poliméricas.

Se sintetizaron IPN's con distinta composición química. Por un lado, los monómeros utilizados fueron EA (hidrófobo) y HEMA (hidrófilo), en una relación en peso de EA/HEMA de 100/0, 90/10, 70/30 y 50/50 (b), y tras la polimerización térmica se sintetizó la primera red polimérica de PEA y de los copolímeros PEA-*co*-PHEMA en las relaciones en peso apuntadas (d). Los mismos monómeros en los mismos porcentajes se utilizaron (g) para la obtención de la segunda red polimérica (i), sintetizando homo-IPN's de PEA-*i*-PEA y [PEA-*co*-PHEMA]-*i*-[PEA-*co*-PHEMA]. La temperatura de secado a vacío para estas estructuras macromoleculares (k) fue de 40°C para PEA-*i*-PEA, 30°C, 50°C y 60°C para [PEA-*co*-PHEMA]-*i*-[PEA-*co*-PHEMA] con una relación en peso de EA/HEMA de 90/10, 70/30 y 50/50 respectivamente. Por otro lado, también se utilizó MMA en la etapa (b) y (g) para sintetizar una homo-IPN de PMMA-*i*-

PMMA. La temperatura de secado a vacío para esta estructura macromolecular (k) fue de 120°C para PMMA-*i*-PMMA. En la **tabla 2.2** se muestran los sistemas preparados en este estudio.

Primera red	IPN	T (°C) secado IPN
PEA	PEA- <i>i</i> -PEA	40
PEA- <i>co</i> -PHEMA 90:10	Homo IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 90:10	30
PEA- <i>co</i> -PHEMA 70:30	Homo IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	50
PEA- <i>co</i> -PHEMA 50:50	Homo IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	60
PMMA	PMMA- <i>i</i> -PMMA	120

Tabla 2.2: Sistemas preparados en este estudio. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.

2.2.2.3 Porosidad

Se ha determinado la porosidad de la tela suministrada por el proveedor así como la porosidad de los *scaffolds* obtenidos.

2.2.2.3.1 Porosidad de los *scaffolds*

La porosidad de los *scaffolds* se ha caracterizado a dos niveles. Por un lado, se han determinado las dimensiones de los poros obtenidos y por otro lado, se ha determinado la porosidad total del *scaffold*.

Las dimensiones de los poros se han determinado mediante análisis de imagen a partir de las micrografías SEM de los *scaffolds* obtenidos. Para ello, las dimensiones de los poros del *scaffold* se midieron respecto a la barra de escala de cada micrografía SEM utilizando el programa Image Tools 2.0.

La porosidad total se ha determinado a partir de las medidas de densidad aparente del *scaffold* por dos métodos.

i) Infiltración de líquido en los *scaffolds*

Se ha utilizado agua destilada como relleno de la estructura porosa. La muestra seca se pesó, se colocó en un tubo de cristal conectado a una bomba de vacío, y se llenó de agua destilada antes de quitar el vacío. Seguidamente, el *scaffold* lleno con agua se pesó de nuevo y la porosidad se calculó como (Sartorius, 1999):

$$\Pi(\%) = \frac{V_p}{V_t} 100 = \frac{m_{lr} / \rho_{lr}}{\frac{m_{lr}}{\rho_{lr}} + \frac{m_s}{\rho_m}} 100 \quad (2.1)$$

donde Π es la porosidad, V_p y V_t son el volumen ocupado por los poros y el volumen total de la muestra respectivamente, ρ_{lr} es la densidad del líquido de relleno, ρ_m es la densidad del material en bloque, m_{lr} y m_s son la masa del líquido de relleno y la masa del *scaffold* seco respectivamente.

La densidad del material en bloque (no poroso) seco, se determinó pesando las muestras en el aire (m_a) y en n-octano (m_o), y se aplicó la siguiente expresión:

$$\rho_m = \rho_{n-octano} \frac{m_a}{m_a - m_o} \quad (2.2)$$

Para realizar las medidas, se utilizó una balanza Mettler Toledo AX205 con una sensibilidad de 0.00001 g y un kit de determinación de densidades para balanzas AT/AX.

ii) Inmersión de los *scaffolds*

La muestra seca (*scaffold*) se pesó. Posteriormente, la muestra se sumergió en agua destilada y se determinó la masa de la muestra sumergida en agua. La porosidad se calculó como (Zein et al. 2002):

$$\Pi(\%) = \frac{V_a - V_s}{V_a} 100 = \frac{\frac{m_s - m_s}{\rho_s} - \frac{m_s}{\rho_m}}{\frac{m_s}{\rho_s}} 100 \quad (2.3)$$

donde Π es la porosidad, V_a y V_s son el volumen aparente y real del *scaffold* respectivamente, ρ_m es la densidad del material en bloque, m_s es la masa seca del *scaffold* y ρ_s es la densidad aparente del *scaffold*.

La densidad del material en bloque, se determinó pesando las muestras en el aire (m_a) y en agua destilada (m_{al}), y se aplicó la siguiente expresión:

$$\rho_m = (\rho_l - \rho_{aire}) \frac{m_a}{m_a - m_{al}} + \rho_{aire} \quad (2.4)$$

La densidad aparente del *scaffold* se determinó teniendo en cuenta el empuje del aire mediante la siguiente expresión (Sartorius, 1999):

$$\rho_s = (\rho_l - \rho_{aire}) \frac{m_s}{m_s - m_l} + \rho_{aire} \quad (2.5)$$

donde ρ_l es la densidad del líquido (agua destilada), $\rho_{aire} = 0.0012 \text{ g/cm}^3$ (Sartorius, 1999), m_s y m_l son la masa del *scaffold* seco en el aire y en el agua destilada respectivamente.

Para realizar las medidas, se utilizó una balanza Mettler Toledo AG245 con una sensibilidad de 0.00001 g y un kit de determinación de densidades para balanzas AG.

2.2.2.3.2 Porosidad de la tela

La porosidad total de la tela de nylon suministrada por el proveedor se determinó a partir de las medidas de las dimensiones de la muestra mediante la siguiente expresión (Kothari y Das, 1991):

$$\Pi(\%) = \frac{V_T - V_F}{V_T} 100 = \frac{As - n\pi r^2 h}{As} 100 \quad (2.6)$$

donde Π es la porosidad, V_T es el volumen total de la tela, V_F es el volumen de los monofilamentos, A es el área, s es el espesor de una lámina, r y h son el radio y la longitud del monofilamento respectivamente y n el número de monofilamentos por área.

2.2.2.4 Propiedades mecánicas

Las muestras en bloque y los *scaffolds* se cortaron en forma de barras rectangulares y sus propiedades dinámico-mecánicas se midieron con un instrumento Seiko DM120; desde 30°C hasta 250°C, con una velocidad de calentamiento de 2°C/min a una frecuencia constante de 1 Hz.

2.2.2.5 Morfología

La morfología de las muestras se ha estudiado mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) con los equipos HITACHI S-4100 y JEOL JSM6300. Para ello, las muestras se cortaron transversalmente con un bisturí y se montaron sobre portamuestras. Posteriormente se procedió a la metalización de las superficies y secciones transversales de las muestras.

2.2.2.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizaron medidas de DSC en las muestras de porógeno con un instrumento Pyris 1 (Perkin Elmer). Se determinó la temperatura de fusión de las muestras comerciales de porógeno mediante barridos desde 25°C hasta 280°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Para determinar los

posibles cambios en el porógeno durante el proceso de fabricación del *template*, las muestras de tela se sometieron al siguiente tratamiento: se calentaron desde 25°C hasta 220°C, seguido por un paso isoterma de 220°C durante 10 min. El siguiente paso, fue el enfriamiento desde esa temperatura hasta 25°C a 10°C/min, seguido por otro paso isoterma a 25°C durante 1 min, y finalmente un calentamiento desde 25°C hasta 280°C a 10°C/min.

2.3 Resultados y discusión

Como se ha comentado anteriormente, el principal objetivo de este trabajo era desarrollar un nuevo método para fabricar *scaffolds* porosos 3D para la ingeniería de tejidos con diferentes materiales biocompatibles así como una nueva estructura altamente regular sin la utilización de las técnicas de prototipado rápido.

2.3.1 Desarrollo del método y su influencia sobre la morfología

Se ha sintetizado PMMA por su excelente hemo- y biocompatibilidad (Hacker y Mikos, 2008). De hecho se utiliza en implantes ortopédicos, cementación ósea, lentes intraoculares y de contacto y como material de relleno dental (Eschbach, 2000). El PHEMA, se ha sintetizado porque al igual que el PMMA su biocompatibilidad es excelente. Se utiliza en lentes de contacto e intraoculares (Belmonte, 2008). Por otro lado, tanto el EGDMA como el PEA se utilizan en lentes intraoculares (Hacker y Mikos, 2008).

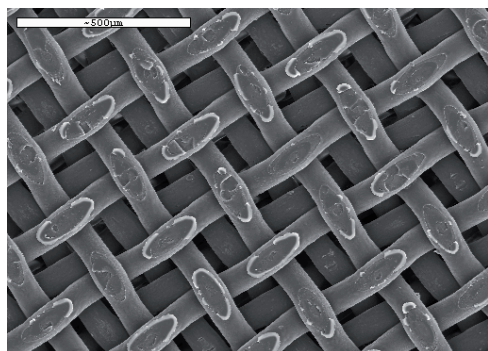


Figura 2.6: Micrografía SEM de la superficie exterior del *template* de 8 capas. Barra de escala 500 µm.

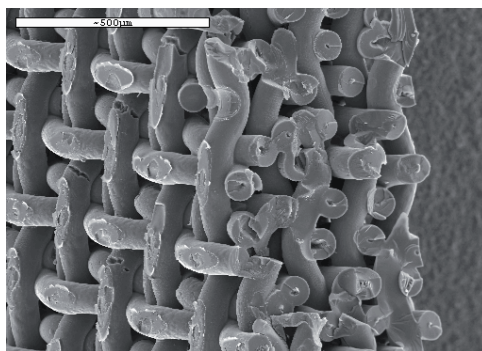


Figura 2.7: Micrografía SEM de la sección transversal del *template* de 8 capas. En la parte izquierda de la imagen se puede observar la superficie exterior del *template*. Barra de escala 500 µm.

Con el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.1.1 (obtención del *template* en un paso) se pueden obtener ensamblajes de telas de nylon que forman un *template* porogénico 3D, con el objeto de obtener *scaffolds* que sean la estructura inversa de estos *templates*. En las **figuras 2.6** y **2.7** se puede observar la superficie exterior y la sección transversal del *template* respectivamente.

Para sinterizar las telas de nylon y formar un *template* 3D se probaron distintos programas de temperatura. Por debajo de 200°C las muestras no se sinterizaron. En la **figura 2.8** se muestra la temperatura de fusión del nylon comercial obtenido en los barridos de DSC.

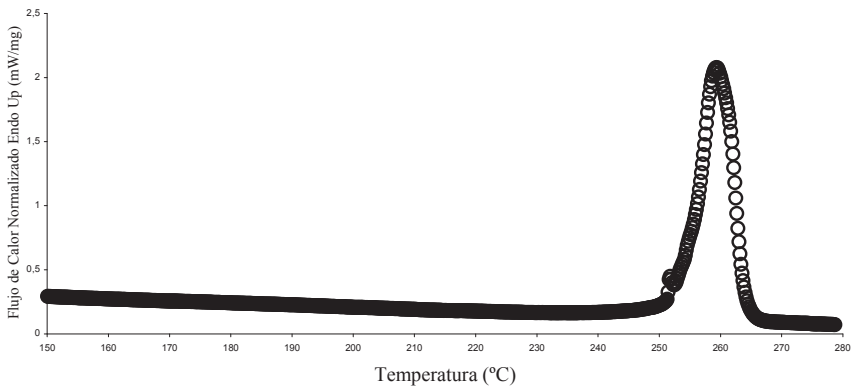


Figura 2.8: Termograma de DSC de la tela de nylon comercial.

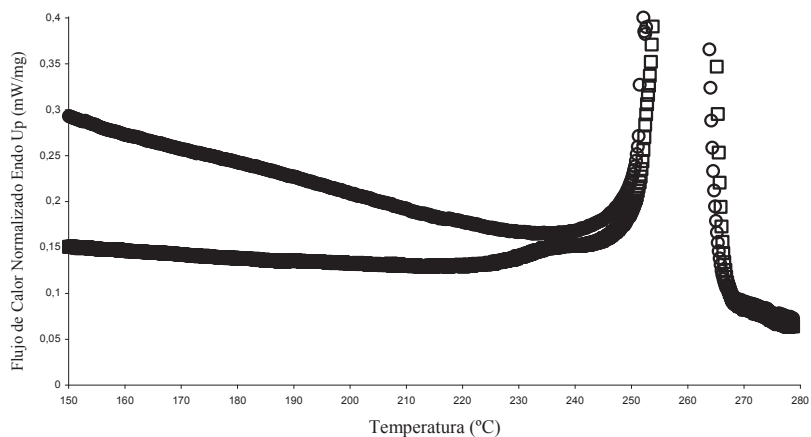


Figura 2.9: Termograma de DSC de la región de fusión de la tela de nylon comercial (O) y de la tela de nylon tratada (□).

El tratamiento de calor a 220°C del programa de sinterización previamente descrito (apartado 2.2.2.1.1) produjo una unión firme entre las láminas de tela apiladas, probablemente debido a un proceso que implica la fusión de pequeños cristales y la recristalización de fibras individuales en contacto unas con otras. Esto se sugiere por el termograma de DSC que se muestra en la **figura 2.9**, donde se aprecia un pequeño pico de fusión endotérmico entre 230 y 240°C, previo a la zona de fusión del material (máximo de la endoterma de fusión 260°C), que es característico de una fracción de pequeños cristales, creado probablemente en el paso isoterma del tratamiento ya que este pico endotérmico está ausente en el termograma de la tela de nylon comercial.

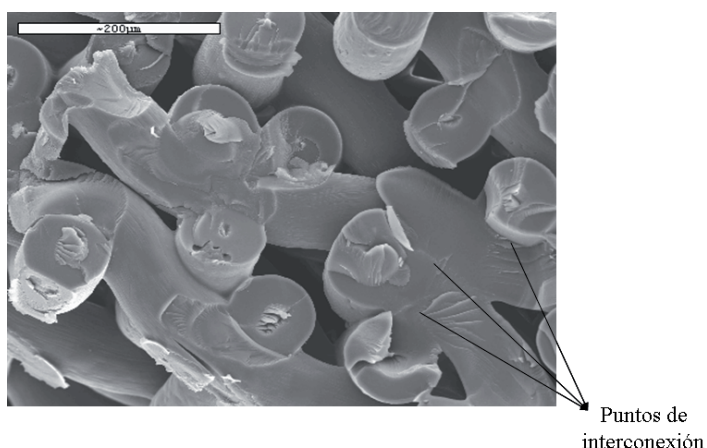


Figura 2.10: Micrografía SEM del *template* de nylon obtenido en el que se señalan algunos puntos de interconexión. Barra de escala 200 μm .

Además, el proceso descrito anteriormente (2.2.2.1.1) da lugar a un *template* poroso (**Figuras 2.6 y 2.7**) que permite que la solución monomérica pueda penetrar en el *template* y posteriormente polimerizar en éste, tal y como se describe en la **figura 2.5** del apartado 2.2.2.2. La polimerización se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno para purgar el oxígeno del sistema. El oxígeno actúa como un secuestrador de radicales libres, y puede acortar la longitud de la cadena del polímero y añadir enlaces peróxido que posteriormente se podrían romper para formar radicales libres. Además, los radicales libres afectan negativamente a la viabilidad celular, por lo que su presencia podría afectar negativamente la biocompatibilidad de los polímeros (Dziubla et al. 2001).

Cuando el *template* es eliminado, el *scaffold* obtenido es la estructura inversa del *template* con una estructura interconectada de poros abiertos (**Figura 2.5**). Una consecuencia de la morfología del *template* obtenido es que obtenemos *scaffolds* con canales cilíndricos paralelamente alineados con

interconexiones controladas. Esto, se ve claramente en las **figuras 2.11** y **2.12**. Por tanto, con el procedimiento descrito en los apartados 2.2.2.1.1 y 2.2.2.2 se pueden obtener *scaffolds* tal y como se puede ver en las **figuras 2.11** y **2.12**.

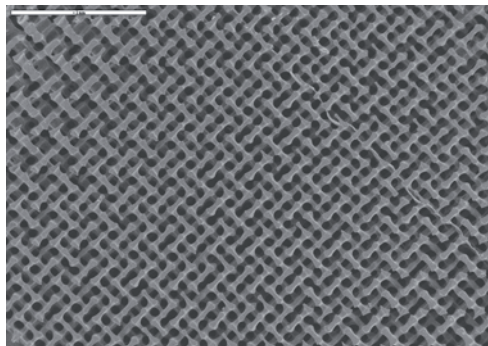


Figura 2.11a: Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 1 mm.

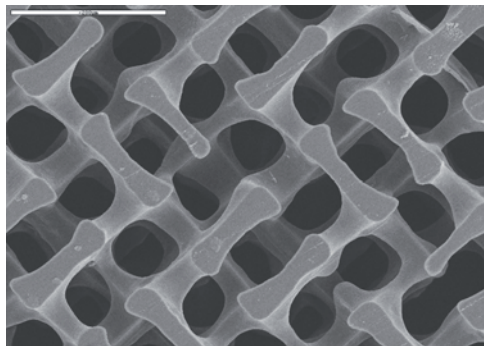


Figura 2.11b: Detalle de los canales de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro de poro de interconexión es de $67 \pm 5 \mu\text{m}$. Barra de escala 200 μm .

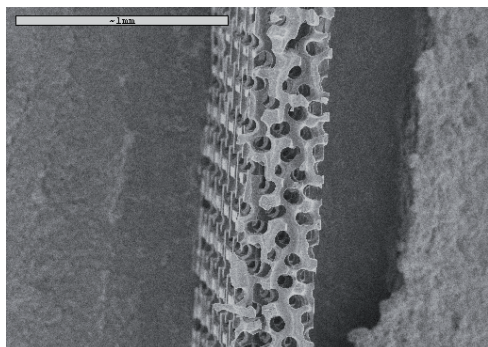


Figura 2.12a: Sección transversal del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. La superficie exterior de la muestra se puede ver a la izquierda de la imagen. Barra de escala 1 mm.

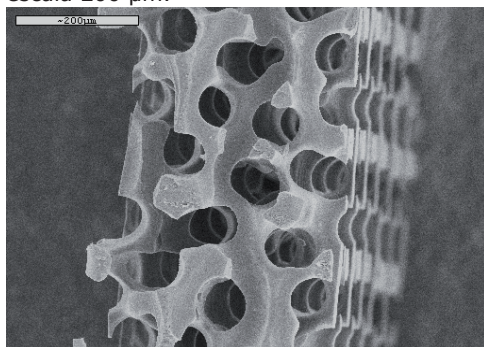


Figura 2.12b: Detalle de los canales de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $72 \pm 6 \mu\text{m}$. Barra de escala 200 μm .

La **figura 2.11a**, muestra la superficie exterior del *scaffold*, apreciándose una estructura altamente regular, con una matriz de poros idénticos en la forma de un ensamblaje ortogonal de canales cilíndricos. La **figura 2.11b** es una ampliación de la misma muestra. Los puntos circulares más oscuros de las **figuras 2.11a** y **b** son las interconexiones transversales entre las capas. Estos

puntos de interconexión están uniformemente distribuidos en el *scaffold*, con una forma regular, casi superponibles. El diámetro de poro de interconexión medio es de $67 \pm 5 \mu\text{m}$ que es menor que el diámetro del monofilamento de nylon, pues éstos se producen por el contacto de un monofilamento con otro cuando se sinterizan.

Las **figuras 2.12a** y **b** muestran otras vistas del *scaffold* (sección transversal). La inspección profunda dentro de las muestras, muestra la ausencia de porógeno residual. En la **figura 2.12a**, se puede observar la superficie exterior del *scaffold* en la parte izquierda de la imagen, donde de nuevo, se puede apreciar su alta regularidad. Los diámetros de los canales porosos del *scaffold* se midieron a partir de la sección transversal del *scaffold* en la **figura 2.12b**, que es una ampliación del mismo *scaffold* que se muestra en la **figura 2.12a**. El diámetro de canal medio es de $72 \pm 6 \mu\text{m}$, que es ligeramente inferior al diámetro del monofilamento (según los datos suministrados por el proveedor y medidos sobre la **figura 2.1** es de $80 \mu\text{m}$ y $(78 \pm 4) \mu\text{m}$ respectivamente). Esto, podría ser debido a la distorsión de la medida debido a errores de perspectiva en la micrografía SEM.

Los *scaffolds* mostrados pueden encontrar aplicaciones como soporte físico para cultivos celulares y/o como estructuras que faciliten tanto la regeneración de tejidos como la reparación durante operaciones de reconstrucción. Una aplicación prevista es la regeneración neural ya que según algunos estudios, tal y como se ha indicado en la introducción de este capítulo:

- La alineación preferencial de canales puede suponer una ventaja en ciertas aplicaciones médicas, como la regeneración de nervios (Kang et al. 1999).

- Macroporos altamente orientados han demostrado ser eficaces en la regeneración axonal tanto del SNC como del SNP (Blacher et al. 2003).

- Un ensamblaje en paralelo de tubos macroporosos (diámetro $\sim 100 \mu\text{m}$) de copolímeros de carácter anfifílico puede suponer una prometedora estrategia para reparar la médula de ratas adultas. Se ha confirmado una alta densidad de células en la superficie de estructuras porosas interconectadas (Maquet et al. 2001).

- La regeneración neuronal puede ocurrir sólo a través de una estructura de poros interconectados de diámetro entre 10 y 100 μm . (Schugens et al. 1996).

- Una estrategia interesante iría encaminada en conseguir redes orientadas a lo largo de toda la esponja de hidrogel, con diámetros alrededor de 12-30 μm . Esponjas 3D de PHEMA (hidrogel) permiten hospedar una población purificada de células gliales y servir de soporte para el crecimiento regenerativo de axones en el tracto óptico lesionado en ratas (Plant et al. 1995).

Por otra parte, los *templates* obtenidos mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.1.2 (obtención del *template* en dos pasos) se pueden observar en las **figuras 2.13** y **2.14**.

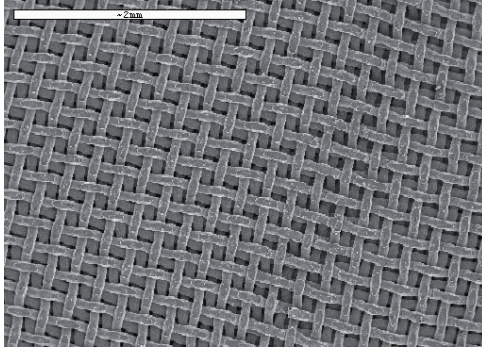


Figura 2.13: Micrografía SEM de la superficie exterior del *template* de 20 capas. Barra de escala 2 mm.

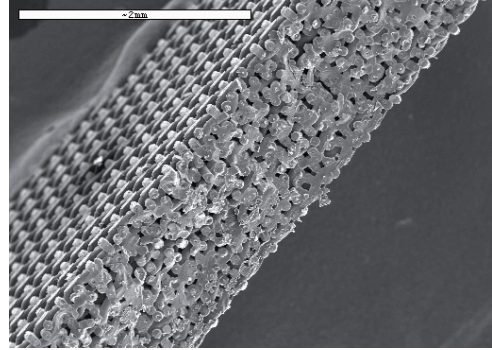


Figura 2.14: Sección transversal del *template* de 20 capas. En la parte izquierda de la imagen se puede observar la superficie exterior del *template*. Barra de escala 2 mm.

En este estudio se ha analizado las influencias de las variables presión y tiempo en el grosor del *template*. La temperatura de compresión para evaluar la compresibilidad de las telas de nylon fue 180°C, que es mucho mayor que la T_g del nylon 6.6 (35-78°C) (Mark, 1999) para obtener una deformación permanente. Esto está de acuerdo con estudios en los que se demuestra que al aplicar presión por encima de ciertos valores en materiales viscoelásticos puede dar lugar a una deformación permanente y aumentar la temperatura acelera este proceso (Li et al. 2001). Esta deformación se atribuye al incremento del movimiento de las cadenas moleculares a medida que la temperatura aumenta (Zubiaga, 2000). De esta forma, a temperaturas altas, el módulo de Young se reduce y da lugar a mayores deformaciones a una presión determinada. Por otro lado, en la compactación de telas, se producen una serie de efectos tales como: deformación de la sección transversal, aplanamiento, deformación por flexión del filamento, *nesting* y condensación de espacios huecos (**Figura 2.15**) (Chen et al. 2001a; Chen y Ye, 2006). El efecto del tiempo y la presión de compresión en el grosor final del *template* obtenido a partir de 33 capas de nylon según las condiciones de la **tabla 2.1** se presenta en la **figura 2.16**. El proceso de compresión fue más rápido y las telas de nylon apiladas se comprimieron más a mayor presión como se observa en la **figura 2.16**. Por otro lado, mientras que a una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ Pa y de $(70 \pm 3) 10^6$ Pa el tiempo requerido para alcanzar un grosor de compresión estable ya se ha alcanzado a 60 min,

para una presión de $(13.2 \pm 0.5)10^7$ Pa el tiempo requerido parece ser mayor de 90 min.







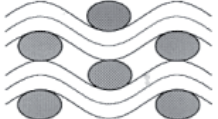
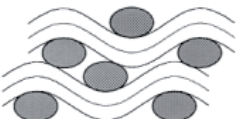


Efectos	Sin compresión	Con compresión
Deformación de la sección transversal del filamento		
Aplanamiento del filamento		
Deformación por flexión del filamento		
<i>Nesting</i>		
Condensación de espacios huecos		

Figura 2.15: Efectos de la compresión de las preformas (Chen et al. 2001a).

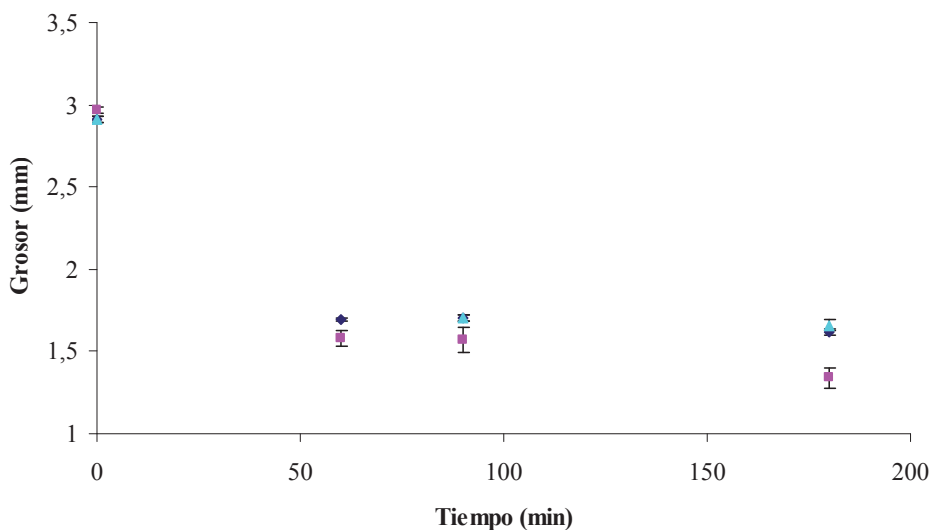


Figura 2.16: Cambio del grosor del *template* en función del tiempo de compresión térmica a 180°C y a una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ Pa (▲), $(70 \pm 3) 10^6$ Pa (◆) y de $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa (■) para una preforma de 33 capas.

También se ha analizado la influencia del número de capas apiladas en el grosor del *template* (**Tabla 2.1**). Por una parte, el grosor del *template* se puede variar dependiendo de la cantidad de capas de tela que se apilan. Como cabe esperar, a menor número de capas de tela apiladas menor será el grosor del *template*. Esto, se puede ver al comparar las **figuras 2.7** y **2.14** que corresponden a *templates* obtenidos a partir de 8 y 20 capas apiladas de tela respectivamente. Por otra parte, el efecto del número de capas en la compresibilidad de las telas de nylon apiladas a presión atmosférica (101325 Pa) y a $(67 \pm 3) 10^6$ Pa se muestra en la **figura 2.17**, donde se observa una disminución del grosor por capa para 8 capas de tela apiladas manteniéndose este valor prácticamente constante para 20 y 33 capas apiladas. Además, se observa que para un determinado número de capas un aumento de la presión hace disminuir el grosor por capa. La razón de esto es que las telas tienen una superficie con un cierto relieve y las capas de tela se colocan una en relación a otra de forma que cuando las capas se comprimen se produce el efecto denominado “*nesting*” de las “colinas” y los “valles” de las capas adyacentes (**Figura 2.15**), es decir los filamentos de una capa se sitúan en los “valles” formados por los filamentos de la capa inmediatamente inferior a ésta (Shady y Gowayed, 2010). El grosor total $t(N)$ de N capas es menor que $N t(1)$, donde $t(1)$ es el grosor de una capa aislada. El “*nesting*” afecta al comportamiento de la compresión de las preformas textiles, lo que da lugar a una disminución del grosor medio de una capa de la preforma de varias capas a una presión dada en comparación con el grosor de una capa de la misma preforma a la misma presión (Lomov et al. 2011). El hecho de que a presión atmosférica se observe este efecto puede ser debido a la presión ejercida con el micrómetro al medir el espesor además de que el “*nesting*” se pudo haber inducido al apilar de forma aleatoria las capas de tela.

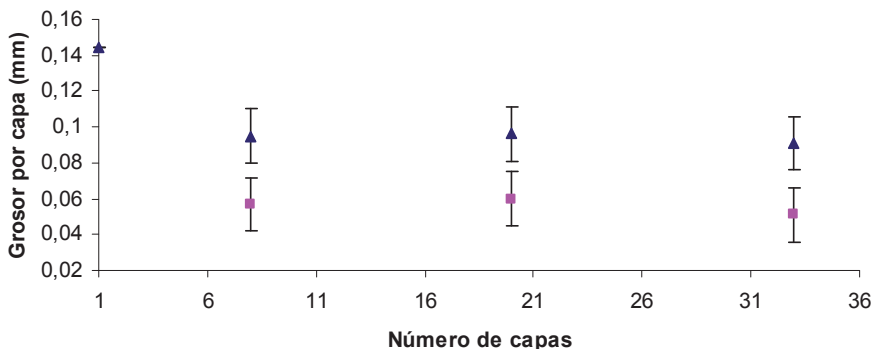


Figura 2.17: Grosor por capa vs el número de capas a presión atmosférica ($\approx 0.1 \times 10^6$ Pa) (▲) y a $(67 \pm 3) \times 10^6$ Pa (■).

Además, también es posible observar el efecto de "nesting" en la **figura 2.18**, donde se han señalado con elipses blancas algunas zonas en las que se ha producido un movimiento entre fibras adyacentes generando "nesting" y empaquetamiento entre las capas.

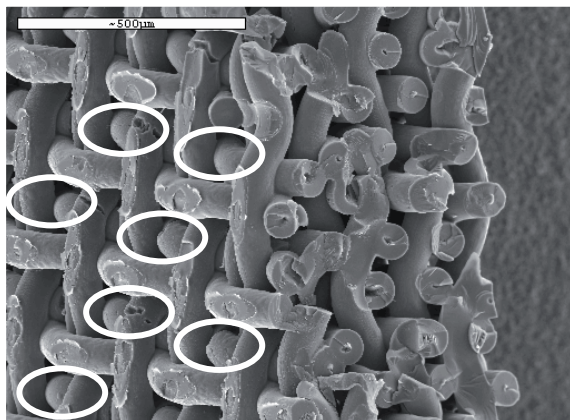


Figura 2.18: Nesting de las capas de nylon en el *template* obtenido según el procedimiento 2.2.2.1.1. Barra de escala 500 μm .

El proceso descrito en el apartado 2.2.2.1.2 da lugar a un *template* con canales y poros interconectados (**Figuras 2.13** y **2.14**), que al igual que en el procedimiento 2.2.2.1.1, permite obtener *scaffolds* con una estructura inversa a la del *template*. Una consecuencia de la variación de la presión aplicada para obtener el *template* es que obtenemos *scaffolds* con distinta morfología. Esto se ve claramente en las **figuras 2.19** y **2.22**.

La **figura 2.19**, muestra la superficie exterior de los *scaffolds* según las condiciones de la **tabla 2.1**, apreciándose estructuras muy regulares. Los puntos circulares o con forma elíptica más oscuros de las muestras, son las interconexiones transversales entre las capas. Mientras que para una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ y $(70 \pm 3) 10^6$ Pa se obtienen estructuras en forma de canales cilíndricos ortogonales, para una presión de $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa las estructuras han colapsado; es decir, la estructura de canales cilíndricos se ha destruido o deformado en gran medida. Los canales obtenidos a $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa tienen menor curvatura que a $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ o $(70 \pm 3) 10^6$ Pa, resultando en una morfología laminar. Esto se puede ver más claramente al comparar las **figuras 2.20** y **2.21** donde se puede observar la superficie exterior del *scaffold* en la parte izquierda de las imágenes para *scaffolds* obtenidos a una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ Pa (**Figura 2.20**) y de $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa (**Figura 2.21**).

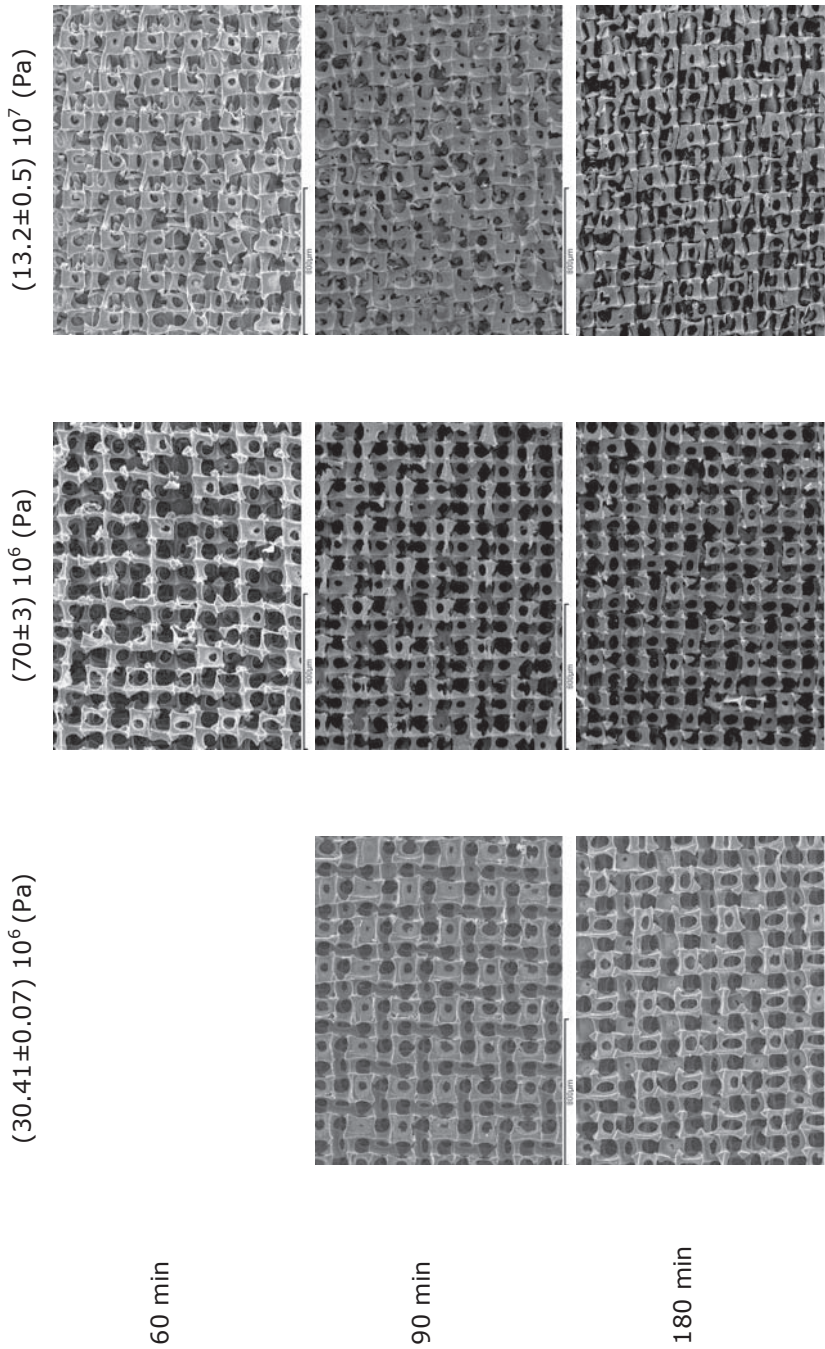


Figura 2.19: Micrografías SEM de la superficie exterior de los scaffolds de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA producidos a partir de *templates* de 33 capas de nylon según las condiciones de la **tabla 2.1**. Barra de escala 800 μm.

Por tanto, la presión, en el intervalo de valores estudiados, afecta a la morfología de la estructura porosa obtenida.

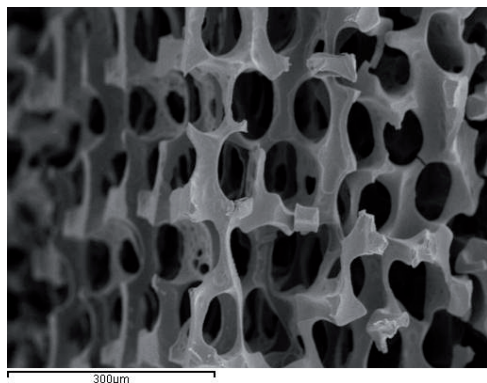


Figura 2.20: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA a partir de un *template* de 33 capas de nylon a $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ Pa. La sección transversal se muestra en la parte derecha de la imagen y la superficie exterior en la izquierda. Barra de escala 300 μm .



Figura 2.21: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA a partir de un *template* de 33 capas de nylon a $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa. La sección transversal se muestra en la parte derecha de la imagen y la superficie exterior en la izquierda. Barra de escala 200 μm .

La **figura 2.22**, muestra la sección transversal de los *scaffolds* de la **figura 2.19**. En ninguna de las figuras se observan residuos de porógeno. Los diámetros de los canales porosos de los *scaffolds* de las muestras 1, 2, 3, 4 y 5 (**Tabla 2.1**) se han medido a partir de la sección transversal de cada una de ellas. Los diámetros máximos de canal medio para estas son $(92 \pm 7) \mu\text{m}$, $(93 \pm 3) \mu\text{m}$, $(96 \pm 4) \mu\text{m}$, $(97 \pm 7) \mu\text{m}$ y $(98 \pm 5) \mu\text{m}$ respectivamente. Por tanto, teniendo en cuenta que el diámetro del monofilamento, según los datos suministrados por el proveedor y medidos sobre la **figura 2.1**, es de $80 \mu\text{m}$ y $(78 \pm 4) \mu\text{m}$ respectivamente, tanto a una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6$ Pa como de $(70 \pm 3) 10^6$ Pa la forma circular de los monofilamentos que conforman la trama y urdimbre de la tela se deforman adoptando una forma elíptica. Esto, está de acuerdo con Chen et al. (2001), acerca de que la compresión deforma la sección transversal del monofilamento tal y como se muestra en la **figura 2.15**. Por otra parte, a una presión de $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa la estructura del *scaffold* tiene una forma laminar tal y como se puede apreciar en la **figura 2.22**. Esto es debido a que a $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ Pa se produce el aplanamiento de los monofilamentos tal y como se muestra en la **figura 2.15**. Además, también se produce la compresión del monofilamento. Esto se puede ver mejor en las **figuras 2.23** y **2.24**, donde la longitud máxima del poro en la dirección de las x

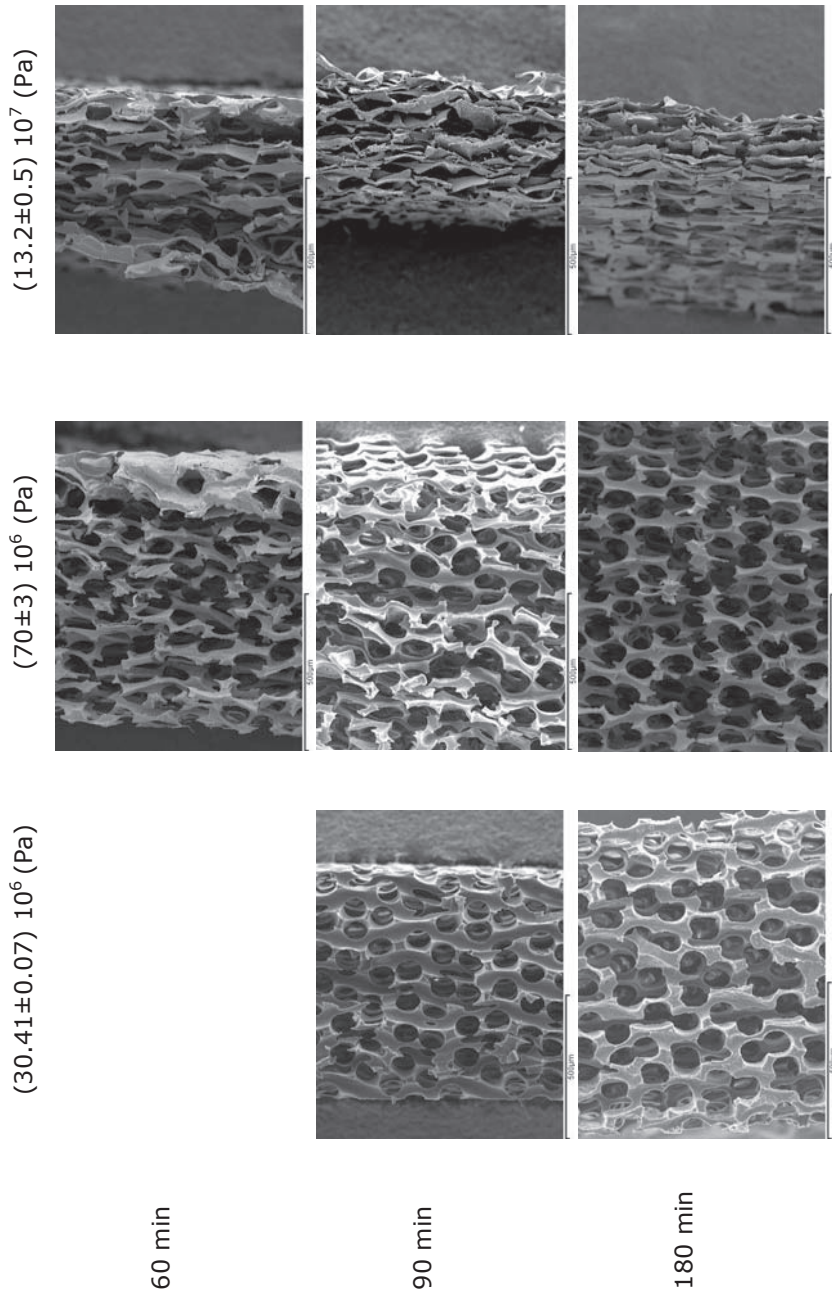


Figura 2.22: Micrografías SEM de la sección transversal de los scaffolds de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA producidos a partir de templates de 33 capas de nylon según las condiciones de la **tabla 2.1**. Barra de escala 500 µm.

de las muestras 7 y 8 (**Tabla 2.1**) son de aproximadamente 41 y 40 μm respectivamente, que son mucho menores que el diámetro de monofilamento antes de la compresión (aproximadamente 80 μm). Por otra parte, a una presión de $(13.2 \pm 0.5) 10^7$ el aplanamiento del monofilamento va acompañado de una reducción de la ondulación del monofilamento (reducción por *crimp*) tal y como se puede ver en las **figuras 2.21, 2.22, 2.23 y 2.24**.

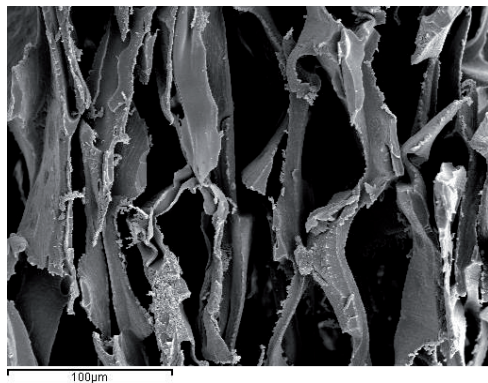


Figura 2.23: Micrografía SEM de la sección transversal ampliada de la muestra 7 (**tabla 2.1**) de la **figura 2.22**. Barra de escala 100 μm .

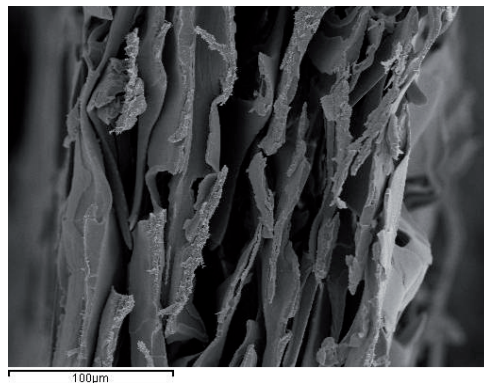


Figura 2.24: Micrografía SEM de la sección transversal ampliada de la muestra 8 (**tabla 2.1**) de la **figura 2.22**. Barra de escala 100 μm .

Por tanto, la morfología del poro así como la estructura final obtenida se ha visto afectada por la presión.

Por otra parte, mediante el proceso descrito anteriormente (2.2.2.1.2) y con las condiciones de la **tabla 2.1** (muestra 9) es decir, 33 capas de tela apiladas, 90 min y $(7.0 \pm 0.9) 10^6$ Pa; también se han obtenido IPN's de PEA y [PEA-co-PHEMA]-*i*-[PEA-co-PHEMA] con una relación EA/HEMA de 90/10, 70/30 y 50/50 (% en peso) con la misma morfología tal y como se puede observar en las **figuras 2.25, 2.26, 2.27 y 2.28**.

Todas las muestras obtenidas fueron fáciles de manejar y físicamente estables.

Por tanto, el método desarrollado permite obtener *scaffolds* con una morfología de poro regular en forma de canales cilíndricos con distintos polímeros biocompatibles, ya sean polímeros hidrófobos como el PEA y PMMA con distintas propiedades físicas, es decir el PEA es un polímero flexible mientras que el PMMA es un polímero rígido, como copolímeros hidrófobos-hidrófilos de PEA/PHEMA con distintas composiciones. El PHEMA es un hidrogel biocompatible que en estado hinchado tiene un contenido en agua similar al de los tejidos del cuerpo y actualmente se utiliza en aplicaciones médicas tales como implantes de

cornea, lentes de contacto, implantes cardiovasculares, uréteres, cirugía de reparación de tejidos, aplicaciones dentales, etc (Han et al. 2009). Sin embargo, tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo y en el Capítulo 1, la principal desventaja de los hidrogeles es su baja resistencia mecánica. Sin embargo, la incorporación de un componente hidrofóbico en la red polimérica mejora las propiedades mecánicas (Bavaresco et al. 2002). Por tanto, sintetizar

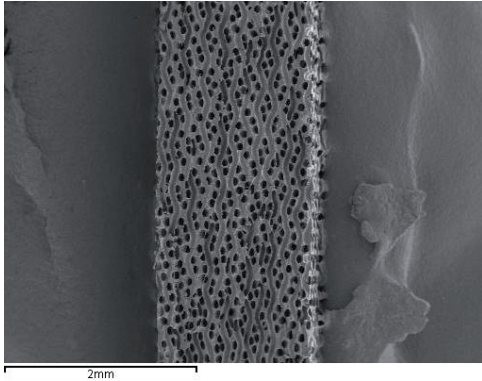


Figura 2.25a: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-co-PHEMA]-i-[PEA-co-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 70/30. Barra de escala 2 mm.

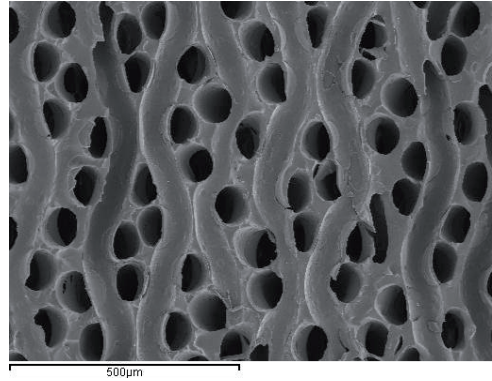


Figura 2.25b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-co-PHEMA]-i-[PEA-co-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 70/30. Barra de escala 500 μm.

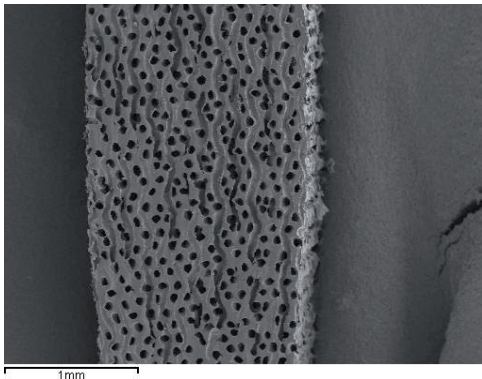


Figura 2.26a: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de PEA-i-PEA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 1 mm.

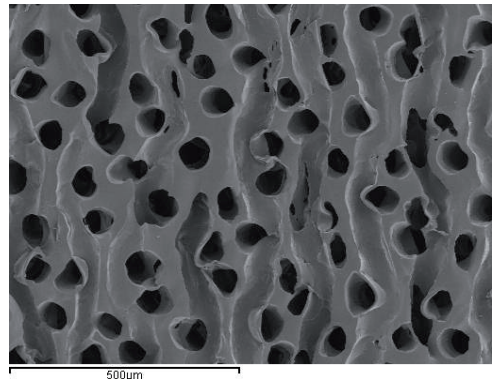


Figura 2.26b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-i-PEA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 500 μm.

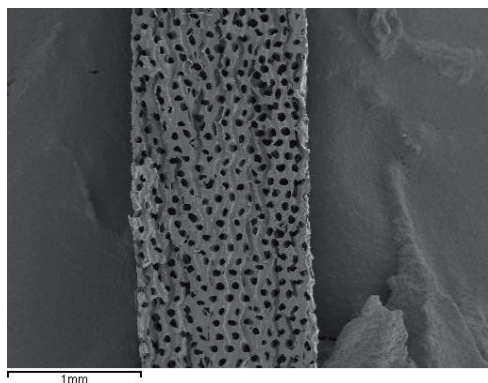


Figura 2.27a: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-co-PHEMA]-*i*-[PEA-co-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 90/10. Barra de escala 1 mm.

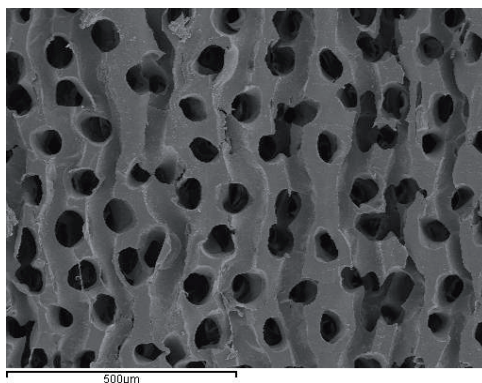


Figura 2.27b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-co-PHEMA]-*i*-[PEA-co-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 90/10. Barra de escala 500 μm.

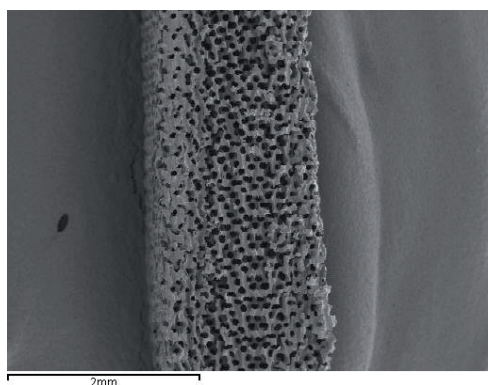


Figura 2.28a: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-co-PHEMA]-*i*-[PEA-co-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 50/50. Barra de escala 2 mm.

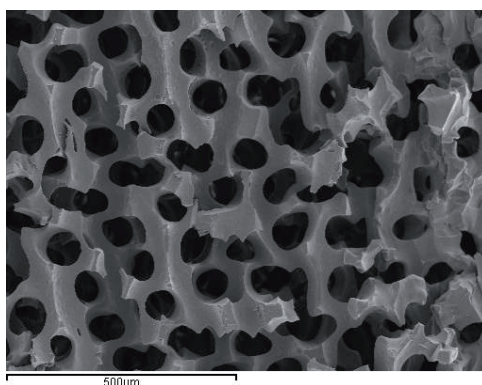


Figura 2.28b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de [PEA-co-PHEMA]-*i*-[PEA-co-PHEMA], 1% en peso EGDMA; PEA/PHEMA: 50/50. Barra de escala 500 μm.

copolímeros de PHEMA (hidrofílico) con PEA (hidrófobo) tiene la ventaja de reforzar las propiedades mecánicas del PHEMA. Además, la obtención de copolímeros tiene la ventaja de poder optimizar la relación hidrófilo e hidrófobo para una adecuada adhesión celular (Kubinová et al. 2009).

Por otro lado, el método desarrollado también permite obtener *scaffolds* con la misma arquitectura 3D y con distintas estructuras macromoleculares, es decir

redes e IPN's. La formación de IPN's tiene la ventaja de reforzar las propiedades mecánicas.

En resumen, el método desarrollado permite obtener una nueva estructura regular de canales alineados con una gran variedad de materiales biocompatibles, pudiendo de este modo modificar las propiedades mecánicas y la relación hidrófilo e hidrófobo.

2.3.2 Porosidad

2.3.2.1 Porosidad de la tela de nylon

La porosidad de la tela de nylon se determinó tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.2.3.2, ecuación 2.6, con un valor del diámetro del monofilamento de aproximadamente $(78 \pm 4) \mu\text{m}$. La porosidad obtenida es de aproximadamente $71 \pm 2\%$. Por lo que la porosidad del *scaffold*, al ser la estructura inversa del *template*, sería de $29 \pm 2\%$. Este valor se puede modificar por compresión del *template*.

Las medidas de los diámetros de los cilindros se realizaron mediante análisis de imagen a partir de la micrografía SEM de la tela de nylon comercial (**Figura 2.2**). Para ello, el diámetro de los hilos que conforman la trama y urdimbre de la tela se midió respecto a la barra de escala de las micrografías SEM utilizando el programa Image Tools 2.0. Tal y como se observa en la **figura 2.2**, la textura (disposición y orden de los hilos en una tela) es 1:1 y según los datos facilitados por el proveedor, se trata de una tela PW43, lo que significa que hay 43 monofilamentos por cm.

2.3.2.2 Porosidad del scaffold obtenido según el procedimiento 2.2.2.1.1

La porosidad del *scaffold* se determinó tal y como se describió en el apartado 2.2.2.3.1 i), ecuación 2.1, con un valor de $\rho_{PMMA \text{ entrecruzado}} = 1.18 \text{ g/cm}^3$ determinado mediante la ecuación 2.2. La porosidad media del *scaffold* es del $79.9 \pm 0.2\%$. La porosidad del *scaffold* aumenta desde un valor inicial de aproximadamente 29% a la presión atmosférica hasta 79.9%. Esto puede ser debido a la presión ejercida, sobre las telas de nylon apiladas, por las pinzas al sellar las dos placas de vidrio.

2.3.2.3 Porosidad del scaffold de PMMA-i-PMMA obtenido según el procedimiento 2.2.2.1.2

La porosidad del *scaffold* se determinó tal y como se describió en el

apartado 2.2.2.3.1 ii), ecuación 2.3, con un valor de $\rho_{PMMA-i-PMMA} = 1.15 \text{ g/cm}^3$ determinado mediante la ecuación 2.4 La porosidad media de los *scaffolds* de PMMA-*i*-PMMA fabricados con 33 capas de nylon según las condiciones de la **tabla 2.1** se muestran en la **figura 2.29** donde se puede observar el efecto de la presión en la porosidad de los *scaffolds* obtenidos.

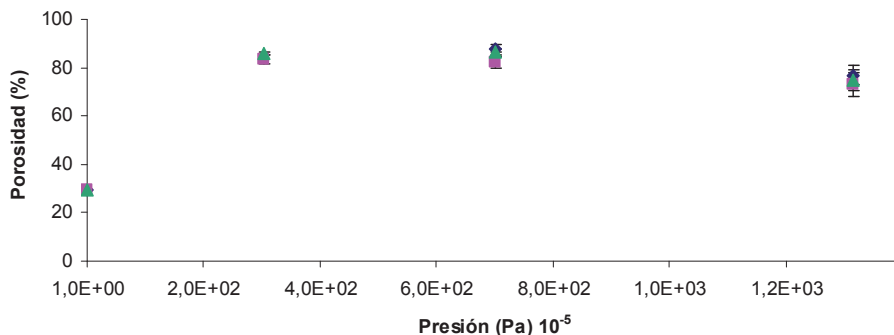


Figura 2.29: Efecto de la presión y el tiempo sobre la porosidad de los *scaffolds* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA obtenidos a partir de *templates* según las condiciones de la **tabla 2.1**. 60 min (◆), 90 min (■) y 180 min (▲) y 33 piezas de nylon.

La porosidad del *scaffold* depende de la presión a la que las telas de nylon apiladas se comprimen. La porosidad aumenta desde un valor inicial de 29% a la presión atmosférica hasta aproximadamente 86% para una presión de $(30.41 \pm 0.07) 10^6 \text{ Pa}$. Esto es debido a que al aumentar la presión, el grosor del *template* se reduce mientras aumenta la fracción en volumen de las fibras (Cheng et al. 2001a) y por tanto la porosidad en el *scaffold* resultante aumenta debido al proceso de inversión. Esta reducción del grosor del *template* es debida a una reducción del volumen de poro del *template*, es decir una compresión del espacio intersticial provocado por los monofilamentos que llenan estos poros. Esto se puede atribuir a la capacidad de las capas de tela para inducir *nesting* y se puede ver más claramente en la **figura 2.18**. A $(70 \pm 3) 10^6 \text{ Pa}$ la porosidad es prácticamente la misma que a $(30.41 \pm 0.07) 10^6 \text{ Pa}$, mientras que a $(13.2 \pm 0.5) 10^7 \text{ Pa}$ se produce una disminución de la porosidad del *scaffold* resultante. Esta disminución de la porosidad, puede ser debida a que la compactación provoca un aplanamiento de los monofilamentos, reducción por "crimp" así como una mayor compresión del nylon favoreciendo una reducción de la fracción en volumen de los monofilamentos. De hecho, tal y como se ha comentado anteriormente se produce la compresión del material (nylon) ya que el diámetro del canal medio ha variado. Estos efectos se pueden ver en las estructuras inversas del *template* (**Figuras 2.21, 2.22, 2.23 y 2.24**). De hecho, Shady y Gowayed (2010), dicen que si el efecto de "nesting" ocurre principalmente en

los “valles”, es de esperar que en estas zonas aumente la fracción en volumen de las fibras; sin embargo, la fracción en volumen local en los “valles” es menor cuando las fibras están compactadas debido a que la compactación provoca el aplanamiento de los filamentos y por tanto reduce la distancia vertical permitida para *nesting*. Sin embargo, bajo las condiciones de realización de este estudio, los tiempos utilizados (60, 90 y 180 min) parecen no influir en la porosidad de los *scaffolds* obtenidos.

Por tanto, la porosidad del *scaffold* se puede cambiar mediante el proceso de compresión de las telas. La presión ejercida en la compactación de las telas afecta a la organización espacial del *template* y subsiguientemente a la geometría y porosidad del *scaffold* resultante una vez se ha llevado a cabo la polimerización e inversión de la matriz.

Los datos indican que la porosidad de los *scaffolds* obtenida es lo suficientemente alta para su utilización en la ingeniería de tejidos (Salgado et al. 2002).

2.3.3 Propiedades mecánicas del scaffold fabricado a partir del template producido según el primer procedimiento (2.2.2.1.1)

Las propiedades mecánicas del *scaffold* dependen de la porosidad. La **figura 2.30** compara el módulo dinámico E' del *scaffold* con el del material en bloque, es decir con una matriz no porosa, con la misma composición química que el *scaffold*, obtenida por el mismo procedimiento pero sin infiltración en el *template*. El efecto de la porosidad es un desplazamiento vertical de la curva, que corresponde a una disminución tanto del módulo de goma como del módulo vítreo del *scaffold* por un factor de diez en comparación con los módulos del material en bloque. Esto es debido a la disminución del área efectiva de la sección transversal debido a la porosidad. Es notable, sin embargo, que la estructura porosa conserva el resto de las propiedades mecánicas del material en bloque, que no se alteran por el proceso de producción: la caída del módulo en la transición vidrio-goma es prácticamente la misma que en el material en bloque, al igual que también la temperatura de transición vítrea. Esto se puede ver más claramente en la **figura 2.31**, donde se representa el factor de pérdidas mecánicas, $\tan \delta$. La $\tan \delta$ es la relación entre el módulo de pérdida, que está relacionado con la energía disipada, y el módulo de almacenamiento que está relacionado con la energía que se almacena elásticamente en cada ciclo; y es una medida de la movilidad molecular (Mucci, 2008).

En la **figura 2.30**, se puede observar la coincidencia en temperatura y en intensidad de la transición principal para ambos materiales. La dispersión de los

datos de E' y $\tan \delta$ después de la transición vítrea es una característica prevista de la medida de los *scaffolds* debido probablemente a factores tales como una adhesión más pobre en las abrazaderas del aparato.

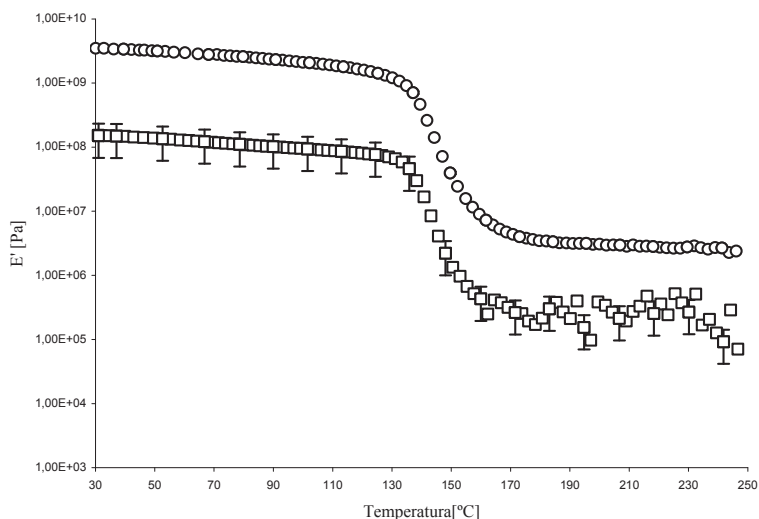


Figura 2.30: Módulo dinámico, E' , en función de la temperatura, a 1 Hz, del *scaffold* de PMMA 1% en peso EGDMA (□) y del PMMA en bloque 1% en peso EGDMA (○).

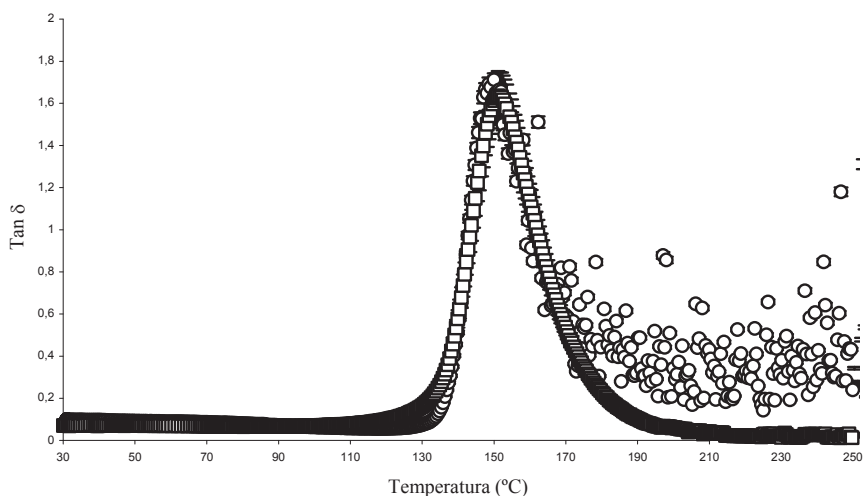


Figura 2.31: Factor de pérdidas mecánicas, $\tan \delta$, en función de la temperatura, a 1 Hz, del *scaffold* de PMMA 1% en peso EGDMA (○) y del PMMA en bloque 1% en peso EGDMA (□).

2.4 Conclusiones

- Se ha modificado el método *solvent casting in combination with particulate leaching* de forma que permite obtener *scaffolds* con formas y distribuciones de poro altamente regulares con una interconectividad completa que da lugar a estructuras estables mecánicamente sin restos de porógeno. El método resultante es sencillo y económico.
- Se han obtenido *scaffolds* porosos muy ordenados con el nuevo método. Estos *scaffolds* son la estructura inversa de un *template*. Como resultado, se obtienen canales cilíndricos ortogonales, que están alineados paralelamente con una conectividad controlada, que se obtiene por la sinterización de las telas de nylon.
- Los *templates* se pueden producir en un único paso o en dos.
- Las *scaffolds* son estables y fáciles de manejar.
- Se ha comprobado que esta estructura se puede obtener con distintos materiales como PEA, PMMA y copolímeros en distintas composiciones PEA-co-PHEMA; redes e IPN's e hidrogeles y no hidrogeles.
- El grosor de los *scaffolds* se puede variar fácilmente modificando el número de capas que se apilan y/o la presión.
- La morfología del poro y del *scaffold* se puede variar modificando la presión y/o la morfología del porógeno.
- La porosidad del *scaffold* se puede modificar mediante el proceso de compresión térmica.
- La presión ejercida en la compactación de las telas afecta a la organización espacial del *template* y subsiguientemente a la geometría y porosidad de *scaffold* resultante una vez se ha llevado a cabo la polimerización e inversión de la matriz.
- El comportamiento mecánico del *scaffold* de PMMA conserva las propiedades mecánicas comparado con el material en bloque con la misma composición a diferencia del módulo de almacenamiento (E') que es menor debido a la disminución del área efectiva de la sección transversal debido a la porosidad.
- Los resultados demuestran la viabilidad de este método para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación controlada de una gran variedad de estructuras y proporciona nuevas estructuras con propiedades adecuadas para su estudio en la ingeniería de tejidos así como para membranas y filtros.

2.5 Recomendaciones

Hasta el momento, se ha obtenido una estructura altamente ordenada con un método nuevo. A la vista de los resultados obtenidos, se propone a continuación algunas líneas que permitirían completar y continuar este estudio.

- Cultivos celulares y de tejidos: los *scaffolds* obtenidos muestran una nueva arquitectura espacial porosa 3D con canales alineados paralelamente. Sería interesante, evaluar la influencia de esta nueva arquitectura espacial en el desarrollo de cultivos en los *scaffolds* obtenidos, especialmente en la regeneración de SNC y SNP.
- Estudiar si para las mismas condiciones de obtención del *template* (presión, tiempo y temperatura), la porosidad del *scaffold* se modifica con distintas estructuras macromoleculares (redes e IPN's).
- Estudiar el efecto de la presión en la porosidad y morfología de los *scaffolds* resultantes en el intervalo $1 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^7$ Pa.
- Estudiar las propiedades mecánicas de todas las estructuras obtenidas y en función de los resultados obtenidos, evaluar si es necesario reforzar la matriz polimérica, ya sea aumentando el porcentaje de entrecruzador (Lee et al. 1999) y/o añadiendo materiales de refuerzo como cerámicas (Migliaresi y Alexander, 2004) para mejorar las propiedades mecánicas.

NOTA

Los resultados mostrados para la obtención del *scaffold* mediante el primer procedimiento (2.2.2.1.1), es decir el *scaffold* de PMMA así como su caracterización se presentaron para la obtención del diploma de estudios avanzados en febrero de 2004 en la UPV.

2.6 Bibliografía

- Bhattacharya, A., Ray, P. (2009). Basic features and techniques. En "Polymer grafting and crosslinking". (Bhattacharya, A., Rawlins, J. W., Ray, P. eds.), pp. 7-64. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA.
- Bavaresco, V. P., Zavaglia, C. A. C., Malmonge, S. M., Reis, M. C. (2002). Viability of pHEMA hidrogels as coating in human synovial joint prosthesis. *Mater. Res.* **5**, 481-484.
- Belmonte, J. (2008). Lentes intraoculares opacificadas. *Microcirugía Ocular* **3**.
- Binyamin, G., Shafi, B. M., Mery, C. M. (2006). Biomaterials: A primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery* **15**, 276-283.
- Blacher, S., Maquet, V., Schils, F., Martin, D., Schoenen, J., Moonen, G., Jérôme, R., Pirard, J-P. (2003). Image analysis of the axonal ingrowth into poly(D,L-lactide) porous scaffolds in relation to the 3-D porous structure. *Biomaterials* **24**, 1033-1040.
- Cavallini, A., Notarnicola, M., Berloco, P., Lippolis, A., Leo, A. D. (2000). Use of macroporous polypropylene filter to allow identification of bacteria by PCR in human fecal samples, *J. Microbiol. Meth.* **39**, 265-270.
- Chen, B., Lang, E. J., Chou, T-W. (2001)a. Experimental and theoretical studies of fabric compactation behaviour in resin transfer molding. *Mater. Sci. Eng., A* **317**, 188-196.
- Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. (2001)b. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C.* **17**, 63-69.
- Chen, Z-R., Ye, L. (2006). A micromechanical compactation model for woven fabric performs. Part II: Multilayer. *Compos. Sci. Technol.* **66**, 3263- 3272.
- Dziubla, T. D., Torjman, M. C., Joseph, J. I., Murphy-Tatum, M., Bowman, A. M. (2001). Evaluation of porous networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) as interfacial drug delivery devices. *Biomaterials* **22**, 2893-2899.
- Eschbach, L. (2000). Nonresorbable polymers in bone surgery. *Injury, Int. J. Care Injured* **31**, DS22-27.
- Gomes, M. E., Ribeiro, A.S., Malafaya, P. B., Reis, R. L., Cunha, A. M. (2001). A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: morphology, mechanical and degradation behaviour. *Biomaterials* **22**, 883-889.

Hacker, M. C., Mikos, A. G. (2008). Synthetic polymers. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 604-635. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Han, Y. A., Li, E. M., Ji, B. C. (2009). The physical properties of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) copolymer hydrogels used as intravaginal rings. *Chin. J. Polym. Sci.* **27**, 359-366.

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529-2543.

Hutmacher, D. W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K. W., Teoh, S. H., Tan, K. C. (2001). Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling. *J. Biomed. Mater. Res.* **5**, 203-216.

Jandt, K. D. (2007). Evolutions, revolutions and trends in biomaterials science-a perspective**. *Adv. Eng. Mater.* **9**, 1035-1050.

Kang, H-W., Tabata, Y., Ikada, Y. (1999). Fabrication of porous gelatine scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **20**, 1339-1334.

Kauly, T., Kaufman-Francis, K., Lesman, A., Levenberg, S. (2010). Vascularization: The conduit to viable engineered tissues. En "Advances in tissue engineering: angiogenesis" (Johnson, P. C., Mikos, A. G. eds), pp. 17-27. Mary Ann Liebert, Inc. Publishers, New York, USA.

Kothari, V. K., Das, A. (1991). Compressional behaviour of nonwoven geotextiles. *Geotext. Geomembr.* **11**, 235-253.

Kubinová, S., Horák, D., Syková, E. (2009). Cholesterol-modified superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 4601-4609.

Lee, J. W., Kim, S. Y., Kim, S. S., Lee, Y. M., Lee, K. H., Kim, S. J. (1999). Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 113-120.

Li, Y., Ma, T., Yang, S-T., Kniss, D. A. (2001). Thermal compression and characterization of three-dimensional nonwoven PET matrices as tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **22**, 609-618.

Liu, C., Xia, Z., Czemuska, J. T. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **85 (A7)**, 1051-1064.

Lomov, S. V., Gorbatiikh, L., Kotanjac, Z., Koissin, V., Houille, M., Rochez, O., Karahan, M., Mezzo, L., Verpoest, I. (2011). Compressibility of carbon woven

fabrics with carbon nanotubes/nanofibres grown on the fibres. *Compos. Sci. Technol.* **71**, 315-325.

Lou, X., Vijayasekaran, S., Chirila, T. V., Maley, M. A. L., Hicks, C. R., Constable, I. J. (1999). Synthesis, physical characterization, and biological performance of sequential homointerpenetrating polymer network sponges based on poly (2-hydroxyethyl methacrylate). *J. Biomed. Mater. Res.* **47**, 404-411.

Maquet, V., Martin, D., Scholtes, F., Franzen, R., Schoenen, J., Moonen, G., Jérôme, R. (2001). Poly(D,L-lactide) foams modified by poly(ethylene oxide)-block-poly(D,L-lactide) copolymers and a-FGF: in vitro and in vivo evaluation for spinal cord regeneration, *Biomaterials* **22**, 1137-1146.

Migliaresi, C., Alexander, H. (2004). Composites. Introduction. En "Biomaterials science: an introduction to materials in medicine". 2ª ed. (Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E eds.), pp. 181-196. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Mucci, V. Formulación de nuevos materiales nanocompuestos para aplicaciones dentales. (2008). URL: http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/jovenesSAM08/Trabajos_completos/11.Biomateriales/11007MucciV.pdf

Nikpour, M., Chaouk, H., Mau, A., Chung, D. J., Wallace, G. (1999). Porous conducting membranes based on polypyrrole-PMMA composites. *Synth. Met.* **99**, 121-126.

Park, K., Chen, J., Park, H. (2001). Hydrogel composites and superporous hydrogel composites having fast swelling, high mechanical strength, and superabsorbent properties. U.S. Patent number 6271278.

Patist, C. M., Mulder, M. B., Gautier, S. E., Maquet, V., Jérôme, R., Oudega, M. (2004). Freeze-dried poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* **25**, 1569-1582.

Peña, M. A. V., Alvarado, D. A. G. (2010). Scaffolds implants for bone regeneration. Materials, techniques and modeling by means of reaction-diffusion systems. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* **29**, 140-154.

Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345-1360.

Plant, G. W., Harvey, A. R., Chirila, T. V. (1995). Axonal growth within poly (2-hydroxyethyl methacrylate) sponges infiltrated with Schwann cells and implanted into the lesioned rat optic tract, *Brain Res.* **671**, 119-130.

Prang, P., Müller, R., Eljaouhari, A., Heckmann, K., Kunz, W., Weber, T., Faber, C., Vroemen, M., Bogdahn, U., Widner, N. (2006). The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials* **27**, 3560-3569.

Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K. W. (2001). Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composite Science and Technology* **61**, 1189-1224.

Salgado, A. J., Gomes, M. E., Chou, A., Coutinho, O. P., Reis, R. L., Hutmacher, D. W. (2002). Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. *Mater. Sci. Eng., C* **20**, 27-33.

Sartorius. (1999). Part 1. Density. En "Manual of Weighing Applications". URL:http://www.sartorius-mechatronics.com/uploads/tx_sartoriusmechpdf/BRO-DensityDeterminationManual-e.pdf.

Schmidt, C. E., Leach, J. B. (2003). Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **5**, 293-347.

Shady, E., Gowayed, Y. (2010). Interlaminar shear stress distribution between nested layers of plain weave composites. *Polym. Compos.* **31**, 1838-1845.

Schugens, C., Maquet, V., Grandfils, C., Jérôme, R., Teyssie, P. (1996). Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: 1. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation. *Polymer* **37**, 1027-1038.

Suresh, P. k., Suryawani, S. K., Dewangan, D. (2011). Chitosan-based interpenetrating polymer network (IPN) hydrogels: a potential multicomponent oral drug delivery vehicle. *Pharmacie Globale (IJCP)*, **8** (01).

Taboas, J. M., Maddox, R. D., Krebsbach, P. H., Hollister, S. J. (2003). Indirect solid free form fabrication of local an global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials* **24**, 181-194.

Thomson, R. C., Wake. M. C., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. (1995). Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv. In Polym. Sci. (Biopolymers II)* **122**, 245-273.

Viers, B. D. (1999). Nylon 6.6. En "Polymer Data Handbook" (Mark, J. E. eds), pp. 189-206. Oxford University Press, Inc, NY.

Whang, K., Thomas, C. H., Healy, K. E., Nuber, G. (1995). A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer* **36**, 837-842.

Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 1169-1185.

Zubiaga, A. H. (2000). Propiedades mecánicas. En "Macromoléculas". pp. 391-458. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid. España.

**3 MICROESTRUCTURAS TUBULARES CON
MACROESTRUCTURAS LAMINARES O CILÍNDRICAS**

3.1 Introducción

Cada año millones de personas sufren enfermedades que se podrían beneficiar de terapias tales como el trasplante de órganos. Sin embargo, muchos pacientes mueren mientras esperan la donación de órganos (Khamdemhosseini et al. 2005). El principal objetivo de la ingeniería de tejidos es la reconstrucción de tejidos vivos que puedan utilizarse para la restitución de tejidos/órganos de organismos vivos que estén dañados o se hayan perdido. Para conseguir esto, es necesario combinar el uso de células junto con *scaffolds* (Rosso et al. 2004) tal y como se vio en el Capítulo 1. El *scaffold* debe imitar la estructura biológica y la función biológica de la matriz extracelular nativa (*ECM*) tanto como sea posible, tanto en términos de su estructura física, como de su composición química (Hosseinkhani et al. 2006), teniendo en cuenta que la respuesta biológica a un biomaterial se rige por las propiedades del material de la superficie, principalmente la superficie química y la estructura (García, 2008), en otras palabras, el comportamiento celular está fuertemente influenciado por la microestructura (tamaño de poro, forma...) así como por propiedades de la superficie, incluyendo la mojabilidad y la rugosidad (Chang y Wang, 2011), así el material de la superficie del *scaffold* en el que el cultivo celular se deposita, debe ser diseñado para promover y no comprometer la evolución del tejido (Kasemo, 2002).

A la hora de diseñar *scaffolds*, la estructura morfológica del *scaffold* debe imitar a la de los tejidos naturales a reparar. Por otro lado, muchos tejidos naturales tales como los tendones, nervios, ligamentos, médula espinal, articulaciones de los cartílagos, músculos, vasos y dientes tienen estructuras orientadas, es decir tienen arquitecturas fibrilares o tubulares (Ma y Zhang, 2001), que estarían estrechamente relacionadas con la función fisiológica y mecánica de los tejidos (Yang et al. 2006). Por todo ello, un objetivo de este trabajo es desarrollar técnicas que permitan producir *scaffolds* tridimensionales (3D) porosos para la ingeniería de tejidos con una morfología de poro en forma de canales tubulares abiertos orientados longitudinalmente en la misma dirección y en distintas direcciones con arquitecturas laminares y cilíndricas así como estructuras laminares con poros en forma de canales tubulares interconectados entre las capas.

Por otra parte, respecto a las características de la superficie del *scaffold* hay que tener en cuenta que éstas no deben ser tóxicas para el cultivo celular y además debe producir una adecuada adsorción de proteínas, ya que la capa de adsorción de proteínas que siempre se forma influye en las interacciones célula-superficie.

Cuando un biomaterial se implanta en el cuerpo, las primeras moléculas que alcanzan la superficie son las moléculas de agua (en nanosegundos) formando una capa de agua. Después en micro-milisegundos se produce la interacción de las proteínas que se adsorben a la superficie formando una capa de proteínas. Con el tiempo, las células llegan a la superficie y su interacción se produce a través de la superficie de la capa de proteínas cuyas propiedades están determinadas por la superficie y las propiedades de la capa de agua adherida (**Figura 3.1**) (Kasemo, 2002). Por tanto, los materiales interactúan con las células a través de la capa de proteínas adsorbidas. La composición y la estructura de esta capa de proteínas juegan un papel crítico en la determinación de los comportamientos de las células (Ma et al. 2007).

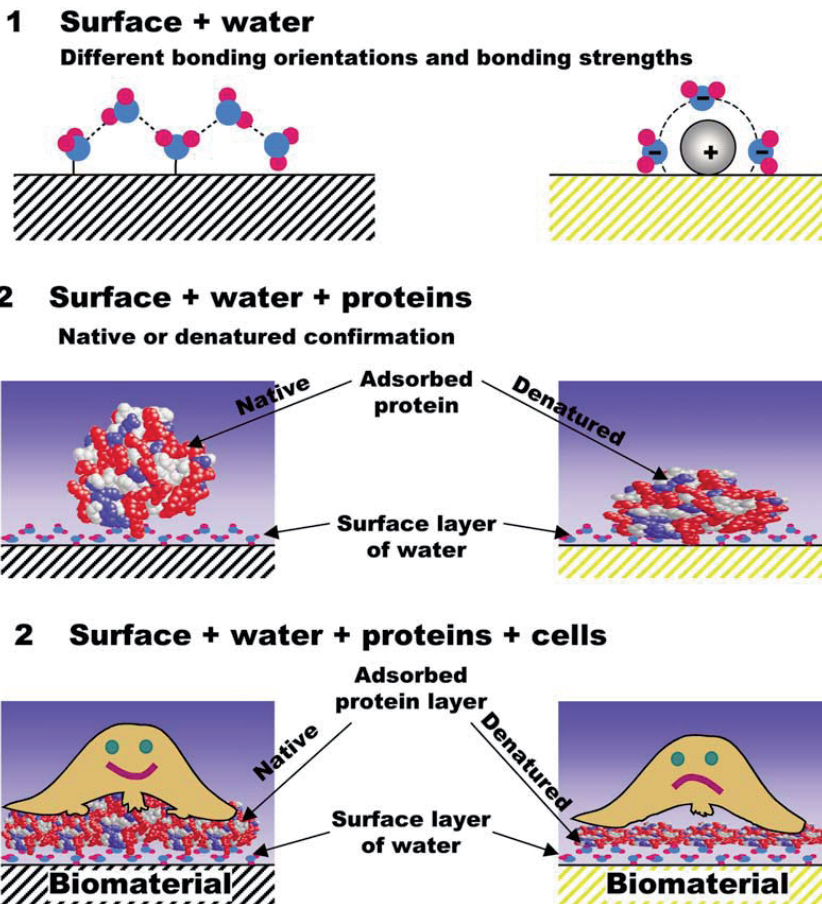


Figura 3.1: Representación esquemática de las sucesivas etapas que acontecen después de la implantación de un biomaterial (Kasemo, 2002).

La mojabilidad de la superficie del biomaterial así como su rugosidad (la rugosidad de una superficie influye en la mojabilidad (Lampin et al. 1997; Arifvianto y Suyitno, 2009)) determina la reactividad de la capa de agua en la superficie del biomaterial (Vogler, 1998). Esta capa de agua determina las propiedades de la capa de proteínas, por ejemplo si las proteínas se desnaturalizan o no, su orientación etc. (Kasemo, 2002). Es sabido que las superficies hidrofóbicas favorecen la adsorción de las proteínas de una disolución acuosa, pero pueden desnaturalizar la conformación nativa de la proteína y la actividad biológica (una conformación natural de una proteína es un requisito para su actividad biológica). Por otro lado, una superficie altamente hidrofílica puede inhibir la adsorción de proteínas (Ma et al. 2007), ya que una vez que el hidrogel se ha hinchado en un medio acuoso, un desplazamiento de las moléculas de agua de la capa de polímero es termodinámicamente desfavorable. Por tanto, las interacciones fuertes entre las moléculas de agua y el polímero evitan las interacciones atractivas entre las proteínas y el hidrogel; como resultado, las proteínas que se acercan a un material que se ha recubierto con un hidrogel polimérico son repelidas de la superficie (Tirrell et al. 2002). Ahora es bien aceptado que tanto superficies muy hidrofílicas como muy hidrofóbicas no son buenas para la adhesión celular, más bien, las superficies con una mojabilidad moderada son capaces de adsorber una cantidad apropiada de proteínas y al mismo tiempo preservar su conformación natural, dando lugar a respuestas celulares positivas (Ma et al. 2007).

Un ejemplo donde la adsorción de proteínas puede dar lugar a un problema serio se representa en la **figura 3.2** (Tirrell et al. 2002). Después de que las proteínas se han adsorbido al material, pequeñas células en forma de disco

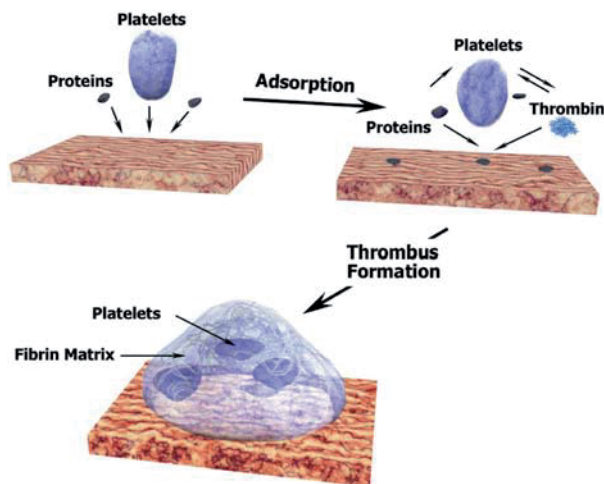


Figura 3.2: Esquema de la formación de un coágulo de pequeñas células sanguíneas y proteínas adsorbidas a la superficie ("formación de trombos") (Tirrell et al. 2002).

(plaquetas) se adhieren a la interfase. Las plaquetas liberan la proteína trombina que dirige la formación de una matriz de fibrina. Esta matriz, estabiliza las proteínas y las células adsorbidas. Como consecuencia la adhesión de proteínas y células a la superficie puede formar grandes agregados (trombos). Finalmente, estos trombos pueden provocar la obstrucción en el lugar donde se han formado, o incluso más grave, si el proceso tiene lugar en un vaso sanguíneo *in vivo* y la corriente sanguínea desplaza el trombo desde la superficie del material y el coágulo bloquea una arteria (embolia).

Por otra parte, la rugosidad de la superficie del material es otro parámetro que hay que tener en cuenta tanto en la adhesión como en el comportamiento celular. Además de influir en la mojabilidad, según Chang y Wang (2011) influye en la morfología celular, proliferación y expresión del fenotipo tanto *in vivo* como *in vitro*. Dependiendo de la escala de las irregularidades de la superficie del material la rugosidad superficial se puede dividir en macrorugosidad (100 μm a mm), microrugosidad (100 nm a 100 μm) y nanorugosidad (menor de 100 nm). La respuesta celular a la rugosidad es diferente dependiendo del tipo de célula. Bartolo et al. (2008) estudiaron el comportamiento de las células neuronales en superficies con una rugosidad desde la escala micrométrica hasta la nanométrica. Los resultados mostraron que en superficies rugosas nanométricas la densidad de la red axonal aumentó así como las neuritas fueron más elaboradas y altamente ramificadas. Es por ello, que otro objetivo de este trabajo es obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales tubulares con superficies internas de canal rugosas, que se caracterizan cualitativamente mediante SEM.

En lo referente a su composición química, los hidrogeles se están estudiando cada vez más como matrices para la ingeniería de tejidos, ya que se asemejan a los tejidos naturales más que cualquier otra clase de materiales sintéticos (Peppas et al. 2000). Los hidrogeles, son redes poliméricas hidrofílicas 3D (Singh et al. 2006), que son capaces de embeber grandes cantidades de agua o de fluidos biológicos (Peppas et al. 2000; Coviello et al. 2007) y retenerlos; concretamente, desde el 10-20% hasta miles de veces su peso seco (Shu et al. 2004; Singh et al. 2006), manteniendo definida una estructura 3D (Gupta et al. 2002). Los hidrogeles tienen la ventaja de poder absorber grandes cantidades de agua además de ser tan flexibles como el tejido blando, lo que minimiza la posible irritación mecánica del tejido circundante (Kubinová et al. 2009; Guiseppi-Elie, 2010). Además, son altamente permeables y por tanto facilitan el intercambio de oxígeno, nutrientes y otros metabolitos solubles en agua (Shu et al. 2004). Por otro lado, normalmente son biocompatibles (Peppas et al. 2006; Satarkar y Hilt, 2008). Además, tal y como se ha comentado anteriormente, las superficies altamente hidrofílicas pueden inhibir la adsorción de proteínas y por tanto al bioensuciamiento y la adhesión celular (Gupta et al. 2002; Guiseppi-Elie, 2010), lo que los hace buenos candidatos en aplicaciones

en las que sea conveniente minimizar las interacciones con las proteínas y células sanguíneas, evitando así la formación de trombos (Tirrell et al. 2002) Aunque también es posible modificar la superficie del hidrogel para obtener una adecuada adhesión celular mediante la optimización de la relación hidrófilo e hidrófobo (Kubinová et al. 2009). Sin embargo, su principal desventaja es su baja resistencia mecánica, aunque esto se puede superar ya sea por entrecruzamiento, formación de redes de interpenetración (IPN's) o por cristalización y de este modo reforzar su estructura (Lee et al. 1999).

Por tanto, teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de los hidrogeles, otro objetivo de este trabajo es obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales tubulares sintetizando diferentes estructuras macromoleculares (redes e IPN's) con el fin de mejorar sus características mecánicas, así como copolímeros con distintas relaciones hidrófilo/hidrófobo, con el objetivo de obtener una buena adhesión celular, que posteriormente se caracterizarán mediante las medidas de hinchamiento (*swelling*).

Por todo ello, los objetivos que se proponen en este estudio son:

- Desarrollar técnicas que permitan producir *scaffolds* 3D porosos para la ingeniería de tejidos con una morfología de poro en forma de canales tubulares abiertos orientados longitudinalmente con arquitecturas laminares y cilíndricas así como estructuras laminares con poros en forma de canales tubulares interconectados entre las capas.

- Obtener *scaffolds* con superficies internas de canal rugosas.

- Obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales tubulares sintetizando diferentes estructuras macromoleculares (redes e IPN's), así como copolímeros con distintas relaciones hidrófilo/hidrófobo.

- Caracterizar los *scaffolds* obtenidos con el fin de disponer de información sobre su posible utilización en la ingeniería de tejidos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

Para la síntesis de los polímeros y copolímeros se han utilizado los siguientes reactivos:

Monómeros: metacrilato de metilo (MMA, 99%, Aldrich), acrilato de etilo (EA, 99%, Aldrich), metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, 99%, Aldrich), acrilato de 2-hidroxietilo (HEA, 96%, Aldrich) y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA,

98%, Aldrich) como entrecruzador. Asimismo se ha utilizado 2,2'-Azobisisobutironitrilo (AIBN, pureza $\geq 98\%$, Fluka) como iniciador radicalario.

Para la obtención del *template*, se han utilizado telas (**Figuras 3.3, 3.4 y 3.5**), multifilamento (hebra compuesta de multitud de monofilamentos) y monofilamento (**Figura 3.6**) de poliacrilonitrilo (PAN) facilitadas por Fisipe. Los diámetros de los monofilamentos de los *templates* se dan en la **tabla 3.1**. Para eliminar los *templates* de PAN se ha utilizado N,N-Dimetilformamida (DMF, 99.8%, Scharlab).

Para lavar las muestras se ha utilizado etanol absoluto (99.7%, Scharlab) y para realizar las medidas de porosidad se ha utilizado agua destilada. Para cortar las muestras se ha utilizado parafina como material de embutición.

Todos los materiales se han utilizado tal y como los suministra el proveedor.

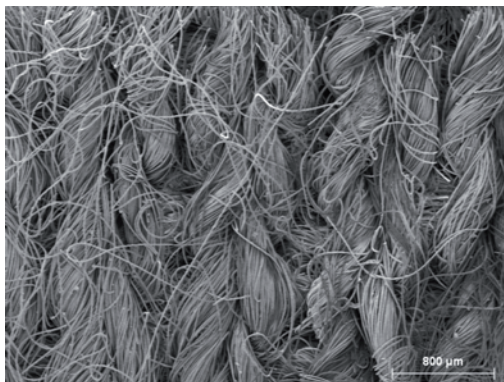


Figura 3.3: Micrografía SEM de la superficie de la tela de PAN tal y como la suministra el proveedor. Barra de escala 800 μm .

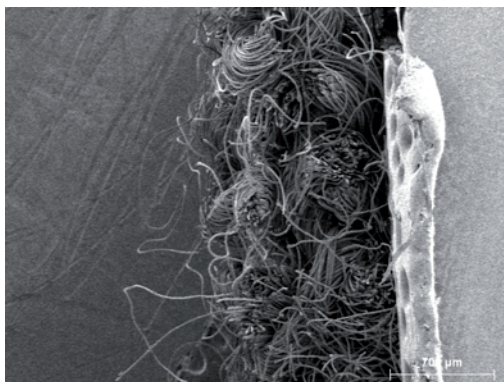


Figura 3.4: Micrografía SEM del corte transversal de la tela de PAN tal y como la suministra el proveedor. Barra de escala 700 μm .

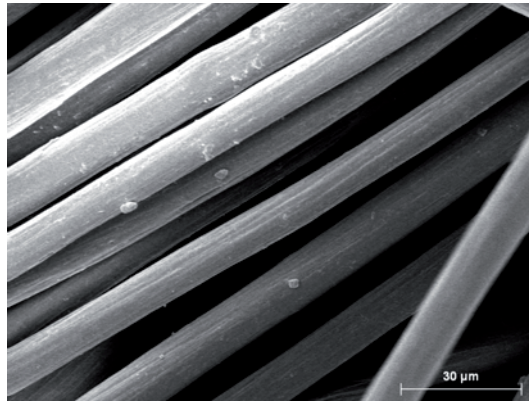


Figura 3.5: Micrografía SEM de los monofilamentos del tejido de PAN que constituyen la hebra. Barra de escala 30 µm.

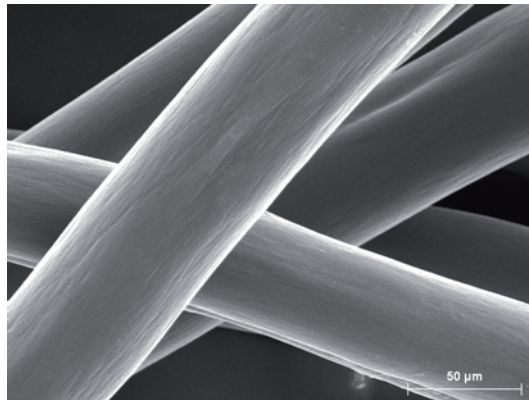


Figura 3.6: Micrografía SEM de los monofilamentos de PAN utilizados para producir los *templates*. Barra de escala 50 µm.

<i>Template</i>	Diámetro del monofilamento (µm)
M. de PAN	42 ± 2
M. de la hebra de PAN	14 ± 1
M. de la hebra de la tela de PAN	11 ± 1

Tabla 3.1: Diámetro de los monofilamentos de los *templates* utilizados en este estudio donde M indica monofilamento.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Fabricación de scaffolds 3D con templates de tela

El proceso de fabricación de *scaffolds* se muestra en la **figura 3.7**:

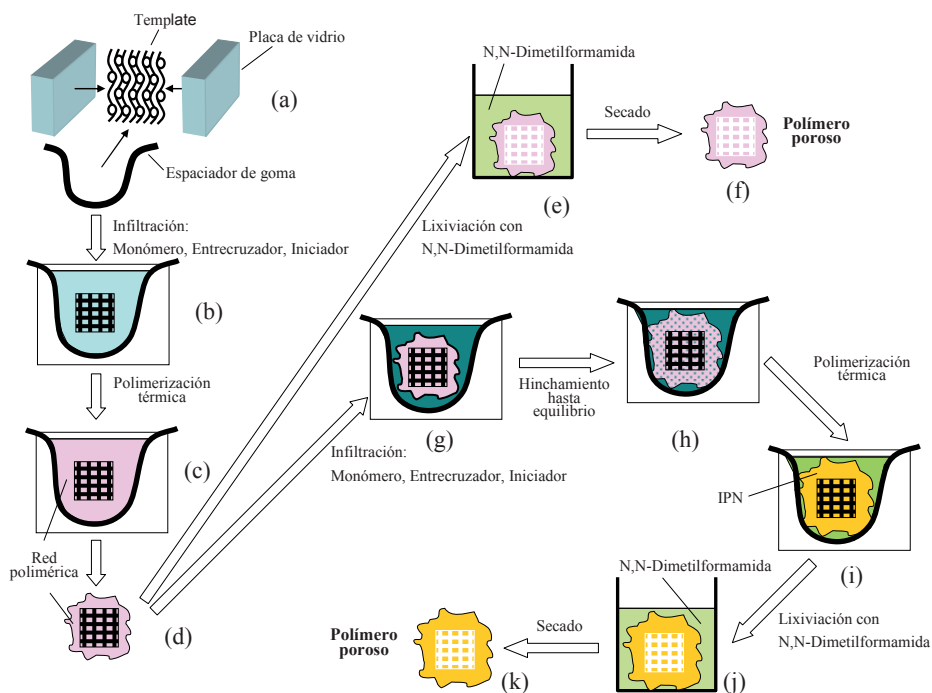


Figura 3.7: Diagrama esquemático del proceso de fabricación de *scaffolds* 3D con macroestructura laminar y con estructura macromolecular de red y de IPN.

El *template* de tela de PAN con diámetro medio de hebra de $313 \pm 49 \mu\text{m}$ y diámetro medio de monofilamento de $11 \pm 1 \mu\text{m}$, se colocó entre dos placas de vidrio cubiertas con una película de celofán y se sellaron con espaciadores de goma (a). Cantidades apropiadas de los monómeros, agente entrecruzador (EGDMA, 1% en peso) e iniciador térmico (AIBN, 0.2% en peso) se colocaron en un vaso de precipitados. La mezcla homogénea líquida de monómero, agente entrecruzador e iniciador se vertió en el molde de cristal donde se encuentra el *template* (b). La polimerización se realizó a 65°C en un baño termostático (Dziubla et al. 2001) durante 30 min en atmósfera de nitrógeno (Dziubla et al. 178

2001). Seguidamente, el molde se colocó en un horno a 65°C durante 4 h seguido de 24 h a 75°C (c).

Una vez concluido el proceso de polimerización, la muestra se extrajo del molde (d). Seguidamente las superficies de la muestra se pulieron con papel de lija para facilitar la eliminación del porógeno.

Para eliminar el porógeno, la muestra se sumergió a temperatura ambiente durante 2 días en DMF para disolver al porógeno (e), y seguidamente el material se lavó en un extractor Soxhlet, utilizando etanol como solvente durante 48 h, para extraer las sustancias de bajo peso molecular y eliminar los restos de DMF. Posteriormente, la muestra se secó en condiciones ambientales durante 1 día, permitiendo que se encoja lentamente, intentando de esta forma evitar que se enrolle o flexione al principio del secado, y finalmente se secó a vacío hasta peso constante a 120°C (f). Los *scaffolds* se almacenaron en un desecador hasta su caracterización.

Mediante el proceso descrito anteriormente, la estructura macromolecular del polímero que constituye el *scaffold* es una red polimérica de PMMA.

Alternativamente, como se muestra en la **figura 3.7**, se pueden obtener IPN's. Para ello, se procedió como se ha descrito anteriormente hasta la etapa (d); obteniéndose una muestra que comprende el *template* y la red polimérica. Seguidamente, cantidades apropiadas de los monómeros, agente entrecruzador (EGDMA, 1% en peso) e iniciador térmico (AIBN, 0,2% en peso) se colocaron en un vaso de precipitados. La mezcla homogénea líquida de monómero se vertió en el molde (g) donde se encuentra la muestra (d). Posteriormente, la muestra (d) con la mezcla homogénea líquida de monómero se dejó en reposo, hinchándose, hasta que se alcanzó el equilibrio (h). La polimerización se realizó a 65°C en un baño termostático durante 30 min en atmósfera de nitrógeno. Seguidamente, el molde se colocó en un horno a 65°C durante 4 h seguido de 24 h a 75°C (i).

Una vez concluido el proceso de polimerización, la muestra se extrajo del molde y se pulió.

El resto del procedimiento, eliminar el porógeno (j) y secar las muestras (k), es similar a la descrita anteriormente para la obtención de la red polimérica.

Se sintetizaron dos IPN's con distinta composición química. Se utilizó MMA para sintetizar la primera red polimérica de PMMA (d). Para la obtención de la segunda red polimérica (i), se utilizó por un lado MMA (g), obteniéndose una homo-IPN de PMMA (PMMA-*i*-PMMA) y por otro lado se utilizó HEA, sintetizando una full-IPN (PMMA-*i*-PHEA). La temperatura de secado a vacío hasta peso constante para estas estructuras macromoleculares (k) fue de 120°C.

3.2.2.2 Fabricación de scaffolds 3D con templates de filamentos

En la **figura 3.8** se muestra el montaje para la fabricación de los *scaffolds* con *templates* de filamentos.

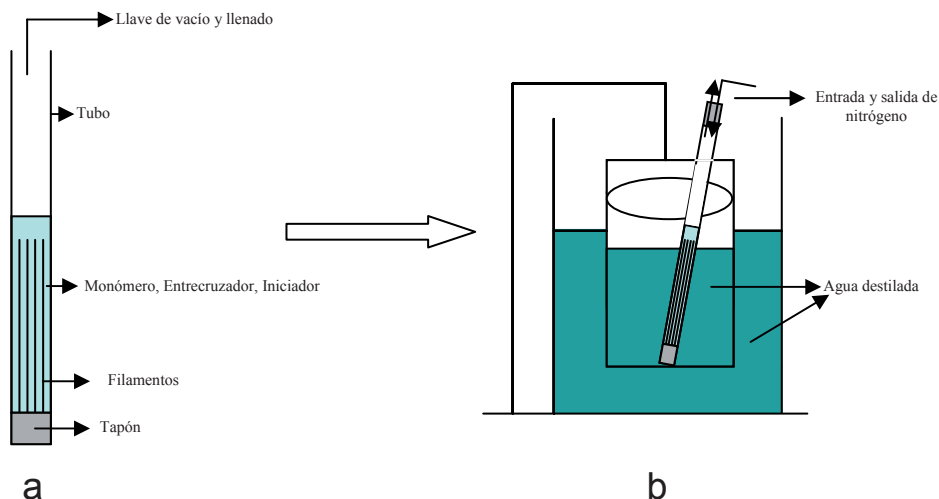


Figura 3.8: Diagrama esquemático del montaje para la fabricación de *scaffolds* con geometría cilíndrica. Primero, se llena el tubo con los filamentos y se infiltra a vacío el monómero(s), agente entrecruzador e iniciador (a). Posteriormente, se polimeriza en un baño termostático (b).

Para obtener los *scaffolds*, los monofilamentos de PAN de aproximadamente $42 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro medio se agruparon en un haz que se introdujo en un tubo cilíndrico de vidrio de 7.35 mm de diámetro interior hasta que salió por el otro extremo. Entonces, se tensó el haz con el fin de que los monofilamentos quedaran alineados y paralelos tal y como se muestra en la **figura 3.8 (a)**. Posteriormente, se selló uno de los extremos para proceder al llenado a vacío de la mezcla reactiva, preparada de manera similar a la descrita en el apartado 3.2.2.1. Después, se polimerizó en un baño termostático (**Figura 3.8 (b)**) y se procedió tal y como se muestra en la **figura 3.9** que es básicamente el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 3.2.2.1 para obtener redes e IPN's (**Figura 3.7**); a diferencia de que en este caso, una vez concluido el proceso de polimerización, la muestra se extrae del molde (d) pero no se pule, además en la etapa (g), es decir la fase de hinchamiento de polímero, no es hasta el equilibrio como en el caso de las macroestructuras laminares sino que el hinchamiento está determinado por el diámetro del cilindro utilizado y los moldes utilizados.

Para la obtención de IPN's, la muestra obtenida (d) se colocó en un tubo cilíndrico de 7.85 mm de diámetro interior y se procedió como con el procedimiento descrito en la **figura 3.7**.

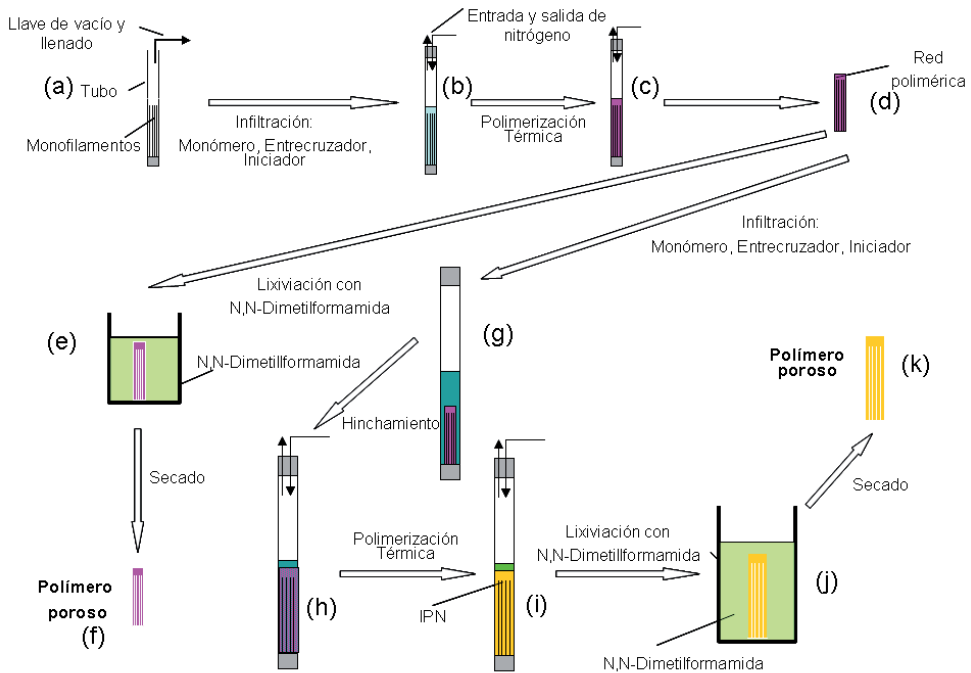


Figura 3.9: Diagrama esquemático del proceso de fabricación de *scaffolds* 3D con macroestructura cilíndrica y con estructura macromolecular de red y de IPN.

En el diseño de experimentos de este apartado se han utilizado monómeros que dan lugar a hidrogeles (PEA-co-PHEMA), con distintas relaciones hidrófilo (PHEMA)/hidrófobo (PEA), y no hidrogeles (PEA) con estructuras macromoleculares de red (PEA, PEA-co-PHEMA) y de IPN (PEA-*i*-PHEMA, PEA-*i*-(PEA-co-PHEMA), (PEA-co-PHEMA)-*i*-(PEA-co-PHEMA)) como se muestra en la **tabla 3.2**.

Se sintetizaron, redes e IPN's con distinta composición química (**Tabla 3.3**). Por un lado, los monómeros utilizados fueron EA y HEMA, en una relación en peso de EA/HEMA de 100/0, 70/30, 50/50 y 30/70 (b), y tras la polimerización térmica se sintetizó la primera red polimérica de PEA y de los copolímero PEA-co-PHEMA en una relación en peso de EA/HEMA de 70/30, 50/50 y 30/70 (d). Los mismos monómeros con los mismos porcentajes se utilizaron (g) para la obtención de la segunda red polimérica (i), sintetizando full-IPN's de PEA-*i*-

PHEMA y PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) con una relación en peso de EA/HEMA de 70/30, 50/50 y 30/70 respectivamente y homo-IPN's de (PEA-*co*-PHEMA)-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) con una relación en peso de EA/HEMA de 70/30, 50/50 y 30/70 respectivamente. Las temperaturas de secado a vacío hasta peso constante para las distintas muestras sintetizadas fueron superiores a su T_g (**Tabla 3.3**).

Redes		IPN's
		PEA- <i>i</i> -PHEMA
Hidrogeles	PEA- <i>co</i> -PHEMA	PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) (PEA- <i>co</i> -PHEMA)- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA)
No Hidrogeles	PEA	-

Tabla 3.2: Polímeros obtenidos con distintas estructuras macromoleculares y composiciones.

Composición	M.	% PEA	% PHEMA	T ^a (°C)
PEA	3R1	100	0	40
(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	3R2	70	30	50
(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	3R3	50	50	60
(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	3R4	30	70	80
PEA- <i>i</i> -PHEMA	3I1	56.3	43.7	110
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	3I2	82.4	17.6	50
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	3I3	78.1	21.9	60
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	3I4	72.8	27.2	80
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	3I5	70	30	50
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	3I6	50	50	60
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	3I7	30	70	80

Tabla 3.3: Composición de las muestras, donde R e I indican red polimérica e IPN respectivamente, M muestra y T^a es la temperatura de secado. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.

Por otro lado, también se utilizó multifilamento de PAN con un diámetro medio de hebra de aproximadamente $253 \pm 6 \mu\text{m}$, el cual está compuesto por un manojo de monofilamentos de $14 \pm 1 \mu\text{m}$ de diámetro medio por monofilamento, para fabricar el *template*. El proceso de obtención del *template* consistió en recubrir cada hebra con una disolución saturada de hebras de PAN en DMF. Posteriormente, se dejaron secar a temperatura ambiente con el objetivo de estudiar si la mezcla monomérica podía penetrar entre cada uno de los monofilamentos que constituyen la hebra. Después, se procedió de manera similar a la descrita para los monofilamentos de PAN. Se sintetizó una homo-IPN de PMMA.

3.2.2.3 Fabricación de scaffolds 3D con templates de filamentos sinterizados en atmósfera de disolvente

Para preparar el *template* se alinearon monofilamentos de PAN formando una capa. Posteriormente, se prepararon 4 capas más de manera similar y se colocaron sucesivamente una encima de otra de tal forma que los monofilamentos de una capa respecto a otra formasen un ángulo de aproximadamente 90° . Después, el conjunto de las cuatro capas se mojó con una disolución de DMF y se secó con papel de filtro. Posteriormente, se colocó en atmósfera de disolvente (DMF) durante 2 h. Después, se dejó evaporar el disolvente durante 24 h. De esta forma se pretendía conseguir la sinterización de los monofilamentos. Luego, para obtener el *scaffold* se procedió de la misma manera que la descrita en el apartado 3.2.2.1 (**Figura 3.7**) para obtener una red de PMMA.

Para caracterizar los *scaffolds* obtenidos se ha determinado su porosidad, morfología, relación de hinchamiento y contenido de agua en equilibrio.

3.2.2.4 Porosidad

La porosidad de los *scaffolds* se ha caracterizado a dos niveles. Por un lado, se han determinado las dimensiones de los poros obtenidos y por otro lado, se ha determinado la porosidad total del *scaffold*.

Las dimensiones de los poros se han determinado mediante análisis de imagen a partir de las micrografías SEM de los *scaffolds* obtenidos. Para ello, las dimensiones de los poros del *scaffold* se midieron respecto a la barra de escala de cada micrografía SEM utilizando el programa Image Tools 2.0.

La porosidad total se ha determinado a partir de las medidas de densidad aparente por dos métodos (inmersión del *scaffold* e inmersión de la muestra antes de eliminar el *template*), medidas de masa y dimensiones y análisis de imagen.

3.2.2.4.1 Inmersión de los scaffolds

La porosidad de los *scaffolds* se calculó a partir de la siguiente expresión (Sartorius, 1999; Grant et al. 2006):

$$\Pi(\%) = \frac{V_p}{V_t} 100 \quad (3.1)$$

donde Π es la porosidad, V_p y V_t son el volumen ocupado por los poros y el volumen total de la muestra, respectivamente.

El volumen ocupado por los poros, se determinó pesando las muestras antes de eliminar el porógeno. Posteriormente, se eliminó el porógeno ((e) o (j)), se lavaron las muestras y se secaron ((f) o (k)), tal y como se ha descrito anteriormente (**Figuras 3.7** y **3.9**). Después, se pesaron las muestras sin el porógeno (*scaffold*) y se aplicó la siguiente expresión:

$$V_p = V_{PAN} = \frac{m_{PAN}}{\rho_{PAN}} = \frac{m_{sp} - m_s}{\rho_{PAN}} \quad (3.2)$$

donde m_{PAN} y V_{PAN} son la masa y el volumen ocupado por el porógeno (PAN), $\rho_{PAN} = 1.15 \text{ g/cm}^3$, m_{sp} es la masa de la muestra seca antes de eliminar el porógeno y m_s la masa del *scaffold* seco.

V_t se determinó a partir de las medidas de densidad aparente del *scaffold*. Para ello, el *scaffold* se sumergió en agua destilada y se anotó la masa de la muestra sumergida en agua destilada. Para determinar V_t se aplicó la siguiente expresión:

$$V_t = \frac{m_s}{\rho_s} \quad (3.3)$$

donde m_s es la masa del *scaffold* seco y ρ_s es la densidad aparente del *scaffold*.

La densidad aparente del *scaffold* se determinó teniendo en cuenta el empuje del aire mediante la siguiente expresión (Sartorius, 1999):

$$\rho_s = (\rho_l - \rho_{aire}) \frac{m_s}{m_s - m_l} + \rho_{aire} \quad (3.4)$$

donde ρ_l es la densidad del líquido, $\rho_{aire} = 0.0012 \text{ g/cm}^3$ (Sartorius, 1999), m_s y m_l son la masa del *scaffold* seco en el aire y en el agua destilada respectivamente.

Para realizar las medidas, se utilizó una balanza Mettler Toledo AG245 con una sensibilidad de 0.00001 g y un kit de determinación de densidades para

balanzas AG.

3.2.2.4.2 Inmersión de la muestra antes de eliminar el template

La porosidad de los *scaffolds*, se determinó aplicando las ecuaciones 3.1 y 3.2 y con el mismo procedimiento que el descrito en el apartado anterior a diferencia de V_t .

V_t se determinó a partir de las medidas de densidad aparente del *scaffold* con porógeno. Para ello, el *scaffold* junto con el porógeno se sumergió en agua destilada y se anotó la masa de la muestra sumergida en agua destilada. Para determinar V_t , se aplicó la siguiente expresión:

$$V_t = \frac{m_{sp}}{\rho_{sp}} \quad (3.5)$$

donde m_{sp} y ρ_{sp} son la masa y la densidad aparente de la muestra seca antes de eliminar el porógeno.

La densidad aparente de la muestra seca antes de eliminar el porógeno se determinó teniendo en cuenta el empuje del aire mediante la siguiente expresión (Sartorius, 1999):

$$\rho_{sp} = (\rho_l - \rho_{aire}) \frac{m_{sp}}{m_{sp} - m_{sl}} + \rho_{aire} \quad (3.6)$$

donde ρ_l es la densidad del líquido, $\rho_{aire} = 0.0012 \text{g/cm}^3$ (Sartorius, 1999), m_{sp} y m_{sl} son la masa de la muestra seca antes de eliminar el porógeno en el aire y en el agua destilada respectivamente.

Para realizar las medidas, se utilizó una balanza Mettler Toledo AG245 con una sensibilidad de 0.00001 g y un kit de determinación de densidades para balanzas AG.

3.2.2.4.3 Medidas de masa y dimensiones

La porosidad de los *scaffolds*, se ha determinado a partir de la ecuación 3.1, donde V_p se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$V_p = V_{PAN} = \frac{m_{PAN}}{\rho_{PAN}} \quad (3.2)$$

siendo m_{PAN} la masa del porógeno (PAN) y $\rho_{PAN} = 1.15 \text{g/cm}^3$. Para determinar m_{PAN} se pesaron los monofilamentos.

V_t , se ha determinado a partir de las medidas de las dimensiones de la muestra, considerando que es un cilindro, con la siguiente expresión:

$$V_t = nR^2h \quad (3.7)$$

donde V_t , es el volumen total de la muestra, R es el radio del cilindro y h es la longitud del monofilamento.

3.2.2.4.4 Análisis de imagen

Algunas de las muestras preparadas con geometría cilíndrica, se embutieron con parafina antes de eliminar el porógeno. Posteriormente, se cortaron discos con un espesor de 200 μm con un microtomo. Después, se eliminó el porógeno y se procedió de manera similar a la descrita en la **figura 3.9** para el lavado y secado de la muestra.

Posteriormente, se calculó la porosidad del *scaffold* resultante a partir de las imágenes de las muestras tomadas con un microscopio óptico (Leika) y a continuación se trataron mediante el programa Omnimet Advantage Manual Versión 1.0 (Grant et al. 2006). Para ello, se capturó la imagen y cuando fue necesario se mejoró con distintas funciones como, aumentar/disminuir el brillo y aumentar la nitidez entre otras. Posteriormente, se procedió a segmentar la imagen mediante la función *Thresholds* con el fin de definir aquellas partes de la imagen que correspondían a los poros y las que correspondían al material. Después, se realizaron las medidas de área con la función *Area fractionate sample* obteniéndose los valores numéricos. Finalmente se calculó la porosidad como la proporción de área de los poros respecto al área de la imagen (Grant et al. 2006).

3.2.2.5 Morfología

La morfología de las muestras se ha estudiado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con los equipos HITACHI S-4100 y JEOL JSM6300. Para ello, las muestras se cortaron transversalmente con un bisturí o microtomo (Micron HM 350-S) y se montaron sobre portamuestras. Posteriormente se procedió a la metalización de las superficies y secciones transversales de las muestras.

3.2.2.6 Medidas de hinchamiento (Swelling)

Se cortaron discos de las IPN's de los *scaffolds* preparados a partir de *templates* de monofilamentos de PAN de aproximadamente 42 μm de diámetro. Posteriormente, se secaron a las temperaturas indicadas en la **tabla 3.3**, primero en un horno y después a vacío hasta peso constante. Los pesos secos

de los *scaffolds* se midieron inmediatamente (Hsieh et al. 2005). Después, los *scaffolds* se sumergieron en agua destilada a temperatura ambiente (Lv et al. 2005). A determinados valores de tiempo, las muestras se sacaron del agua destilada y se pesaron después de eliminar con papel de filtro el exceso de agua en la superficie (Draye et al. 1998; Singh et al. 2006).

La relación de hinchamiento de las muestras se ha determinado de acuerdo con la siguiente ecuación (Hsieh et al. 2005):

$$\text{Relación - de - hinchamiento (\%)} = \frac{m_h - m_s}{m_s} 100 \quad (3.8)$$

donde m_h es la masa del *scaffold* hidratado y m_s es la masa del *scaffold* seco.

Por otra parte, el contenido de agua en equilibrio (*EWC*), se calculó a partir de la siguiente ecuación (Lévesque et al. 2005; Singh et al. 2006):

$$EWC(\%) = \frac{m_e - m_s}{m_e} 100 \quad (3.9)$$

donde m_e es la masa del *scaffold* hidratado en estado de equilibrio y m_s es la masa del *scaffold* seco.

Para realizar las medidas, se utilizó una balanza Mettler Toledo AG245 con una sensibilidad de 0.00001 g y un kit de determinación de densidades para balanzas AG.

3.3 Resultados y discusión

Como se ha comentado anteriormente, el principal objetivo de este trabajo era desarrollar técnicas para producir *scaffolds* 3D porosos para la ingeniería de tejidos. Un segundo objetivo era obtener *scaffolds* con una morfología de poros en forma cilíndrica con diferentes materiales. Un tercer objetivo era producir *scaffolds* con poros en forma de canales paralelos orientados longitudinalmente en la misma dirección y en distintas direcciones. Un cuarto objetivo era fabricar *scaffolds* con geometrías cilíndricas y laminares y que poseyeran poros en forma de canales tubulares y un quinto objetivo era obtener estructuras laminares con poros en forma de canales tubulares interconectados entre las capas.

3.3.1 Desarrollo del método y su influencia sobre la morfología

Se ha sintetizado PMMA por su excelente hemo- y biocompatibilidad (Hacker

y Mikos, 2008). De hecho se utiliza en implantes ortopédicos, cementación ósea, lentes intraoculares y de contacto y como material de relleno dental (Eschbach, 2000). El PHEMA, se ha sintetizado porque al igual que el PMMA su biocompatibilidad es excelente. Se utiliza en lentes de contacto e intraoculares (Belmonte, 2008). Además, tanto el EGDMA como el PEA se utilizan en lentes intraoculares (Hacker y Mikos, 2008).

Por otro lado, las polimerizaciones se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno para purgar el oxígeno de la mezcla. El oxígeno actúa como un secuestrador de radicales libres, y puede tanto acortar la longitud de la cadena del polímero como añadir enlaces peróxido que posteriormente se podrían romper para formar radicales libres. Ya que los radicales libres afectan negativamente a la viabilidad celular, su presencia podría afectar negativamente la biocompatibilidad de los polímeros (Dziubla et al. 2001).

Con el objeto de obtener *scaffolds* con una morfología de poro en forma de canales alineados interconectados y no interconectados, con distintos diámetros de canal y rugosidad, así como distintas arquitecturas externas, se diseñaron tres procedimientos con distintos *templates* (telas, monofilamentos y multifilamentos). Por otra parte, con el objeto de evaluar la viabilidad de los procedimientos y poder obtener estas estructuras con materiales poliméricos con diferentes propiedades físicas y químicas, en el diseño de experimentos se han utilizado monómeros que dan lugar a hidrogeles (PEA-co-PHEMA), con distintas relaciones hidrófilo (PHEMA)/hidrófobo (PEA), y no hidrogeles (PEA, PMMA) con estructuras macromoleculares de red (PEA, PEA-co-PHEMA, PMMA) y de IPN (PEA-*i*-PHEMA, PEA-*i*-(PEA-co-PHEMA), (PEA-co-PHEMA)-*i*-(PEA-co-PHEMA) PMMA-*i*-PMMA, PMMA-*i*-PHEA) con el objeto de reforzar las estructuras.

3.3.1.1 Fabricación de *scaffolds* 3D con *templates* de tela

Mediante este procedimiento, descrito en el apartado 3.2.2.1, es posible obtener *scaffolds* laminares que poseen una arquitectura consistente en la inversa del porógeno.

Este método es sencillo, al mismo tiempo que económico y consiste en la disolución de un *template* (porógeno) a base de una malla de tela compuesta por hebras que a su vez esta formada por multitud de monofilamentos. Tal y como se puede observar en las **figuras 3.10, 3.11, 3.12 y 3.14**, se han obtenido *scaffolds* con una morfología de poro tubular en forma de agrupaciones de canales con distintas orientaciones. Es interesante señalar, que la disolución monomérica penetra entre cada uno de los monofilamentos que conforman la hebra que a su vez forma la malla tejida, ya que si comparamos las **figuras 3.10 y 3.3**, observamos que en la **figura 3.10** se obtiene un *scaffold* en el que los canales están agrupados en forma de hebra con la misma disposición espacial que el *template* utilizado (**Figura 3.3**). Por otra parte, en el *scaffold*

de la **figura 3.11** se muestran los entrecruzamientos de las hebras, donde de nuevo, se puede observar que los canales se mantienen agrupados y con la misma distribución que en el *template* de PAN (véase **Figuras 3.3** y **3.4**). Además, tal y como se observa en la **figura 3.13** el diámetro medio de los poros en forma de canal es de aproximadamente $11 \pm 1 \mu\text{m}$, que es el mismo que el diámetro medio de los monofilamentos, $11 \pm 1 \mu\text{m}$, que conforman la hebra (**Figura 3.5**).

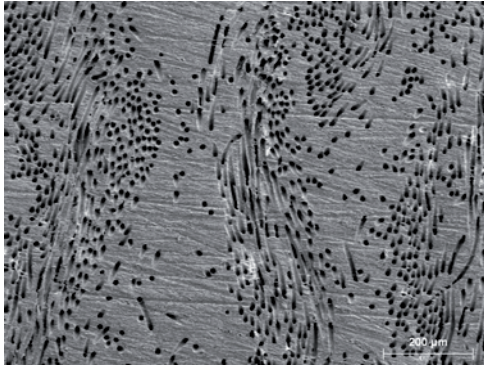


Figura 3.10: Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA fabricado a partir de tela de PAN en forma de malla. Detalle de la inversa de las hebras que contienen multitud de canales. Barra de escala $200 \mu\text{m}$.

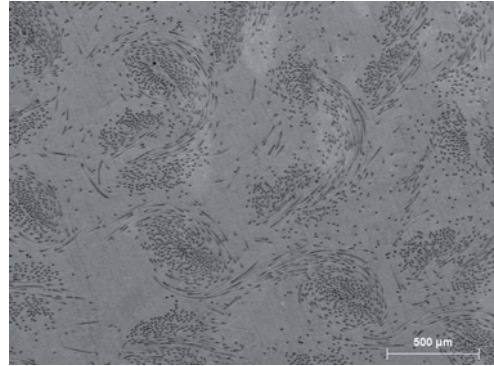


Figura 3.11: Micrografía SEM de la superficie del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. Detalle de la inversa del entrelazamiento de las hebras. Barra de escala $500 \mu\text{m}$.

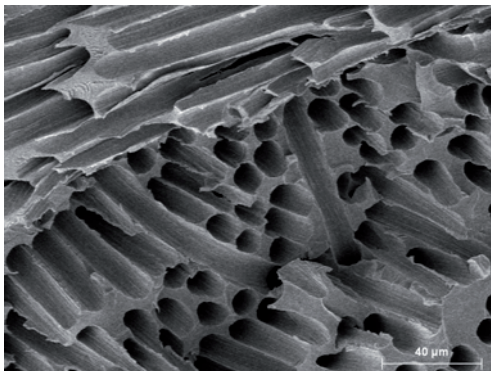


Figura 3.12: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA fabricado a partir de tela de PAN en forma de malla. Barra de escala $40 \mu\text{m}$.

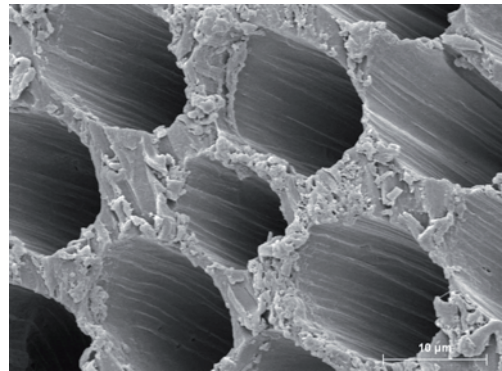


Figura 3.13: Detalle de los canales del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $11 \pm 1 \mu\text{m}$. Barra de escala $10 \mu\text{m}$.

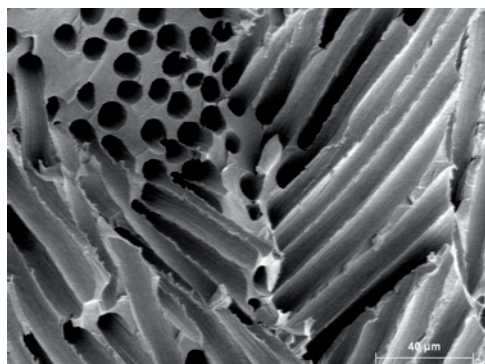


Figura 3.14: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de tela de PAN en forma de malla. Barra de escala 40 μm .

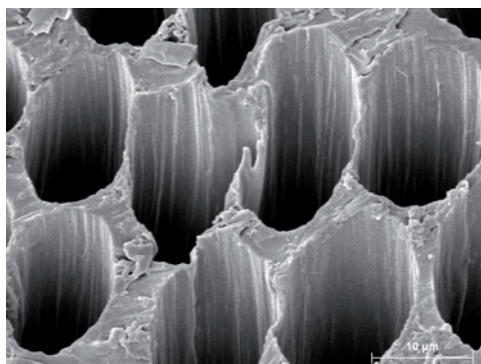


Figura 3.15: Detalle de los canales del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de $11 \pm 1 \mu\text{m}$. Barra de escala 10 μm .

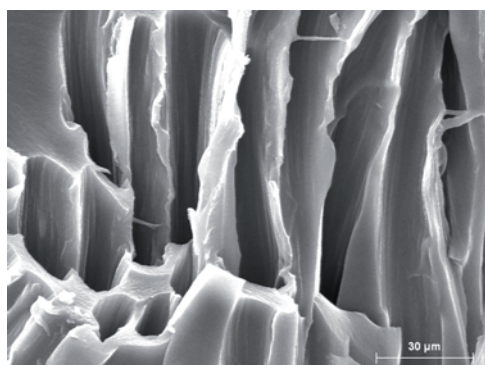


Figura 3.16: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PHEA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de tela de PAN en forma de malla. El diámetro del canal es de $11.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$. Barra de escala 30 μm .

Por otro lado, es interesante remarcar que el diámetro del canal del *scaffold* es aproximadamente el mismo, independientemente de la estructura macromolecular que se sintetice, es decir ya sea una red o una IPN (estructura reforzada). Esto se puede observar mejor al comparar las **figuras 3.13 y 3.15** en las que el diámetro medio del canal es de aproximadamente $11 \pm 1 \mu\text{m}$ tanto para la red como para la homo-IPN de PMMA. Además, también es posible obtener el mismo diámetro de canal con hidrogeles, como se puede observar en la **figura 3.16** en la que se ha sintetizado una full-IPN de PMMA-*i*-PHEA con un diámetro medio de canal de $11.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$.

Todas las dimensiones se midieron con respecto a la barra de escala en cada micrografía SEM mediante el programa Image Tools.

Todas las muestras obtenidas fueron fáciles de manejar y físicamente estables.

Por tanto, el proceso de obtención de *scaffolds* a partir de la disolución de la tela utilizada como *template* es eficaz, reproducible, además de versátil, con diámetros de canal que dependen del diámetro del monofilamento de la hebra de la tela. Los *scaffolds* obtenidos tienen una geometría en forma de lámina con poros en forma de canales tubulares orientados en distintas direcciones.

3.3.1.2 Fabricación de *scaffolds* 3D con templates de filamentos (monofilamento y multifilamento)

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los objetivos era obtener *scaffolds* con distintas composiciones, con una geometría cilíndrica y en la que los poros de los *scaffolds* tuviesen la forma de canales paralelos orientados longitudinalmente. Además se pretende obtener *scaffolds* con distintos diámetros de canal así como obtener estructuras reforzadas mediante la síntesis de IPN's; teniendo en cuenta que el principal objetivo de este trabajo era desarrollar técnicas para producir *scaffolds* 3D porosos para la ingeniería de tejidos.

Mediante este procedimiento, descrito en el apartado 3.2.2.2, ha sido posible obtener *scaffolds* cilíndricos que poseen una arquitectura consistente en la inversa del *template*. Este método es sencillo y económico y consiste en la eliminación del *template* por disolución con el disolvente adecuado, es decir, un disolvente que disuelva el *template* y no disuelva al polímero. Los *scaffolds* obtenidos han demostrado ser estables durante la lixiviación del *template*.

Para evaluar la viabilidad de este método, se han utilizado distintos diámetros de monofilamento (véase **Tabla 3.1**), observándose que al variar el diámetro del monofilamento, se obtienen *scaffolds* con diferente diámetro de canal. Como cabe esperar, se puede observar que con *templates* en los que el diámetro de monofilamento es más pequeño, se obtienen canales de poro en el *scaffold* menores en comparación con *templates* con mayor diámetro de monofilamento. Esto, se puede ver claramente al comparar las micrografías SEM de la sección transversal de los *scaffolds* obtenidos a partir de monofilamento de PAN, **figuras 3.17b, 3.18b, 3.19a, 3.20a, 3.21a, 3.22a y 3.23a**, en las que el diámetro del canal en los *scaffolds* obtenidos está comprendido entre 41 y 44 μm y la **figura 3.25** que corresponde al *scaffold* producido a partir de *templates* de hebras de PAN compuestas de multitud de monofilamentos, en las que el diámetro del canal en el *scaffold* es de $14 \pm 2 \mu\text{m}$. Además, en todos los casos, el diámetro del canal del *scaffold* es prácticamente el mismo que el del diámetro del monofilamento que se ha utilizado como *template*, lo que sugiere que la mezcla monomérica penetra bien entre los huecos dejados por el *template* y

posteriormente polimeriza en éstos. Por otra parte, el polímero proporciona suficiente soporte para prevenir el colapso de la estructura durante el proceso de lixiviación así como durante el secado del *scaffold* a diferencia de la técnica denominada separación de fases durante la polimerización en la que la estructura porosa colapsa durante el proceso de secado y eliminación del disolvente (Fang et al. 2007).

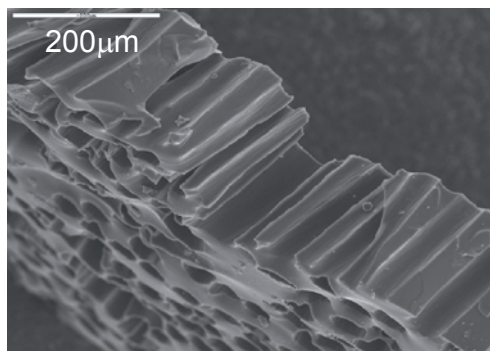


Figura 3.17a: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-co-PHEMA (70:30), 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. En la parte izquierda de la imagen se aprecia la sección transversal del *scaffold*. Barra de escala 200 µm.

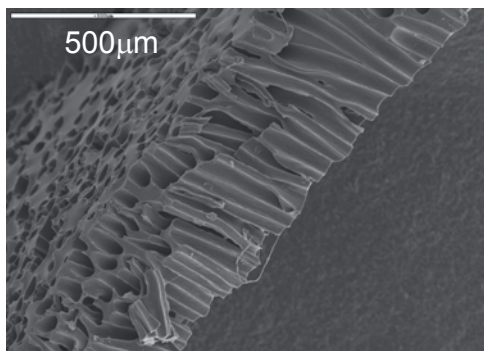


Figura 3.18a: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. En la parte izquierda de la imagen se aprecia la sección transversal del *scaffold*. Barra de escala 500 µm.

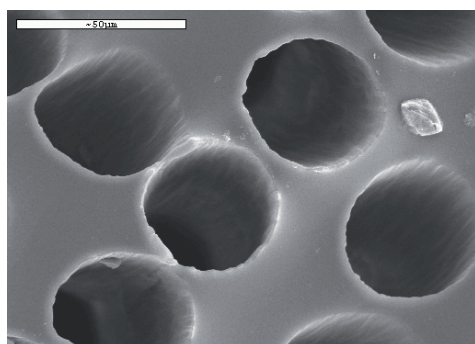


Figura 3.17b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-co-PHEMA (70:30), 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de 42 ± 2 µm. Barra de escala 50 µm.

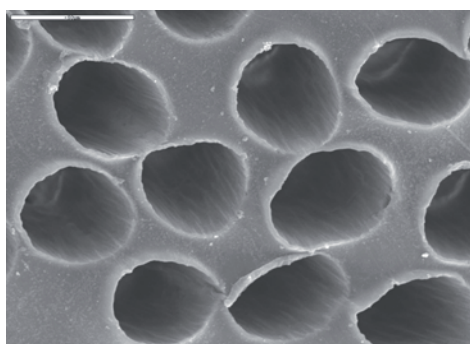


Figura 3.18b: Detalle de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA, 1% en peso EGDMA. El diámetro del canal es de 42 ± 5 µm. Barra de escala 50 µm.

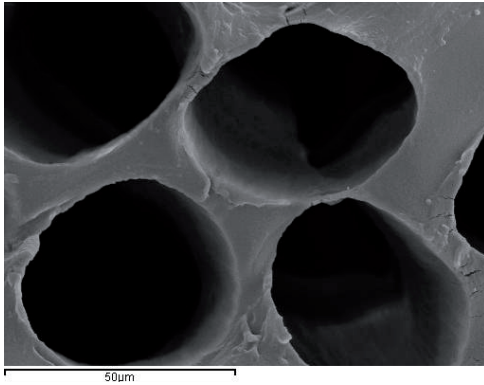


Figura 3.19a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-PHEMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $44 \pm 5 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm .

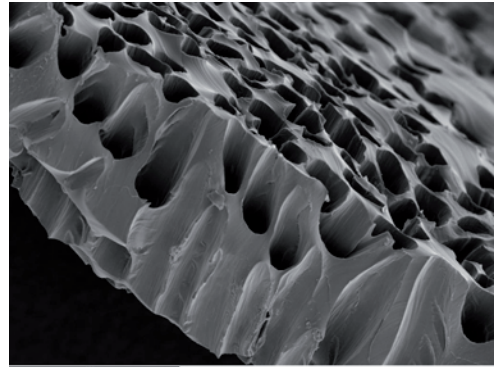


Figura 3.19b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-PHEMA, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver a la derecha de la imagen. Barra de escala 200 μm .

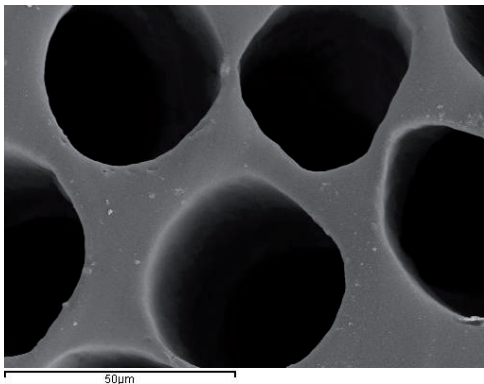


Figura 3.20a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 70:30, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $42 \pm 3 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm .

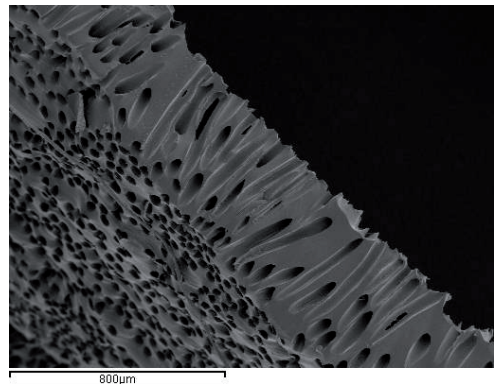


Figura 3.20b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 70:30, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver a la izquierda de la imagen. Barra de escala 800 μm .

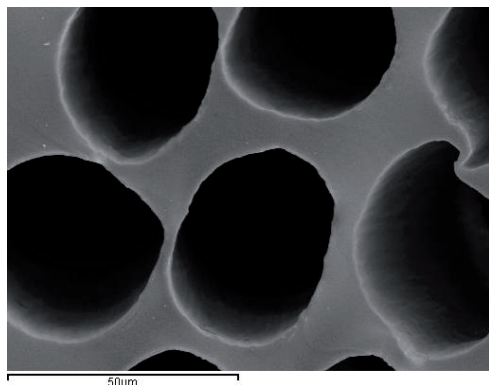


Figura 3.21a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 50:50, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $42 \pm 4 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm .

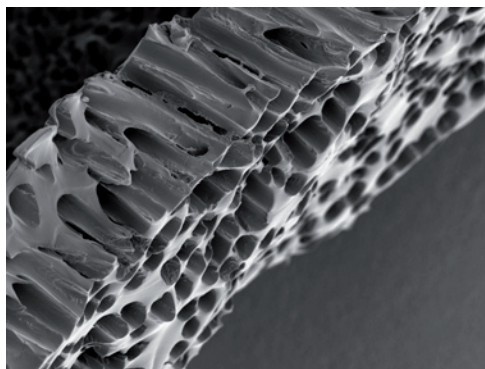


Figura 3.21b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 50:50, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver a la derecha de la imagen. Barra de escala 500 μm .

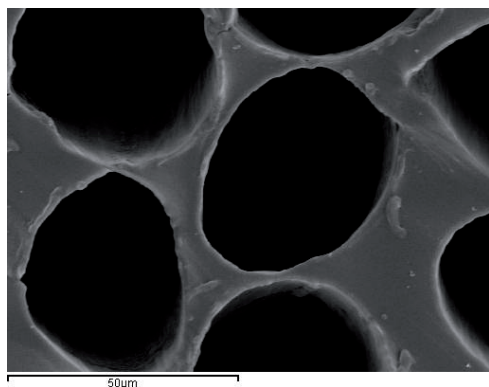


Figura 3.22a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 30:70, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de $41 \pm 4 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm .

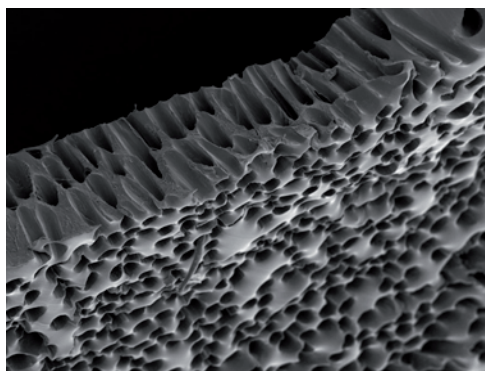


Figura 3.22b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de PEA-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) 30:70, 1% en peso EGDMA. La sección transversal de la muestra se puede ver en la parte inferior de la imagen. Barra de escala 500 μm .

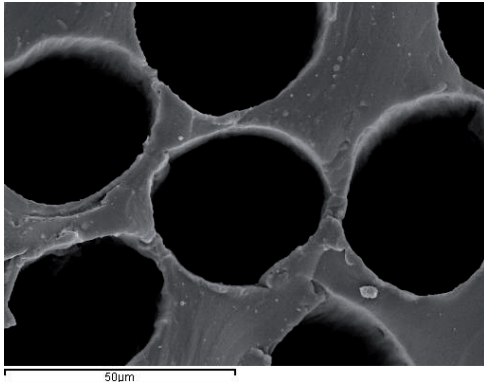


Figura 3.23a: Micrografía SEM de los canales de la sección transversal del *scaffold* de una homo-IPN de PEA-co-PHEMA 70:30, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. El diámetro del canal es de 41 ± 4 μm . Barra de escala 50 μm .

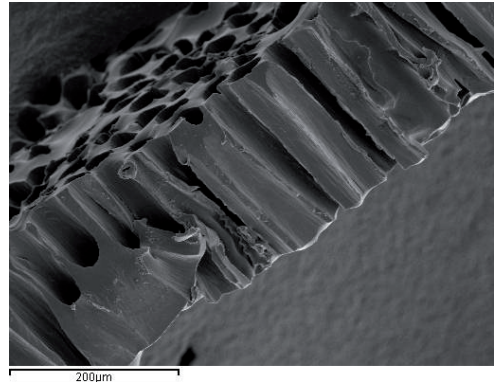


Figura 3.23b: Micrografía SEM de la sección longitudinal del *scaffold* de una homo-IPN de PEA-co-PHEMA 70:30, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 200 μm .

Además, también se han obtenido mediante este procedimiento *scaffolds* con distinta estructura macromolecular (**Tabla 3.3**), redes e IPN's (homo-IPN's y full-IPN's) y distintas composiciones (distintas relaciones hidrófobo/hidrófilo) (véase **Figuras 3.17a, 3.18a, 3.19b, 3.20b, 3.21b, 3.22b, 3.23b, 3.25 y 3.26**).

Por otra parte, las micrografías SEM muestran que mediante este procedimiento es posible obtener *scaffolds* con una geometría cilíndrica (véase **Figura 3.24**) con poros en forma de canales paralelos orientados longitudinalmente, tal y como se puede observar en las **figuras 3.17a, 3.18a, 3.19b, 3.20b, 3.21b, 3.22b, 3.23b, 3.25 y 3.26**.

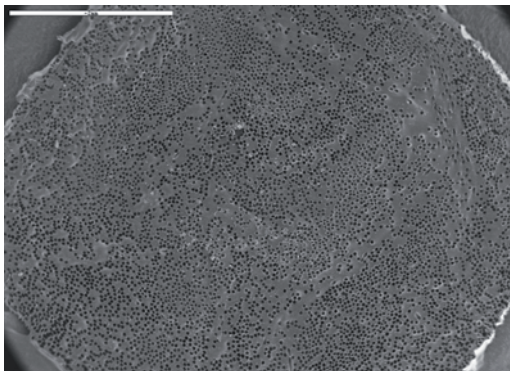


Figura 3.24: Micrografía SEM del *scaffold* de PEA, 1% en peso EGDMA con forma de disco obtenido a partir de un *template* de monofilamentos de PAN. Barra de escala 2 mm.

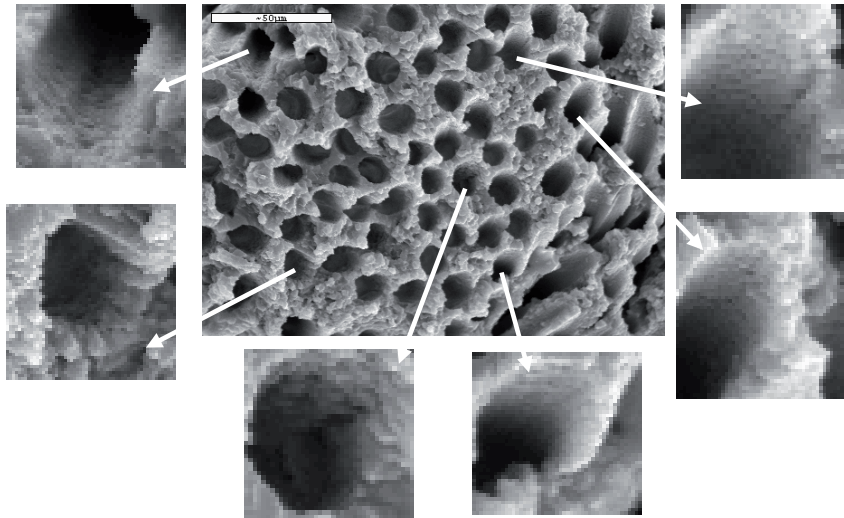


Figura 3.25: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de hebras de PAN recubiertas con una disolución de DMF y hebras de PAN, en la que se muestra con mayor aumento algunos ejemplos de canales con superficies internas rugosas. El diámetro medio del canal es de aproximadamente $14 \pm 2 \mu\text{m}$. Barra de escala 50 μm .

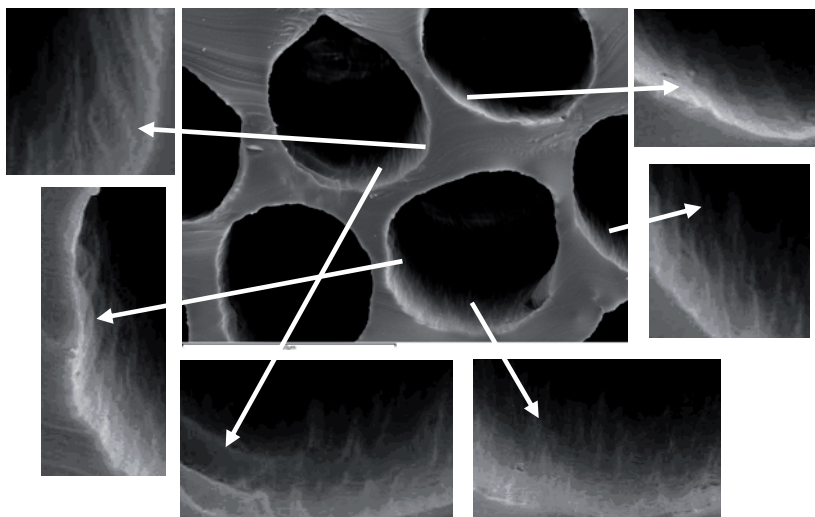


Figura 3.26: Micrografía SEM del *scaffold* de (PEA-*co*-PHEMA)-*i*-(PEA-*co*-PHEMA) con una relación PEA/PHEMA 30:70, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de monofilamentos de PAN, donde se aprecia la textura rugosa de la superficie interior del canal. Barra de escala 50 μm .

Además, es interesante señalar que la superficie interior de los canales en los *scaffolds* es rugosa como demuestran a nivel cualitativo las micrografías SEM (**Figuras 3.13, 3.15, 3.25 y 3.26**). Si comparamos las ampliaciones de las superficies internas de los canales de los poros de las **figuras 3.25 y 3.26** observamos que los perfiles de rugosidad son distintos. Probablemente, la textura rugosa en los *scaffolds* obtenidos a partir de hebras de PAN recubiertas con una disolución saturada de hebras de PAN con DMF se ha generado por un proceso que implica la precipitación de PAN (de la disolución saturada de PAN con DMF) sobre las superficies de los monofilamentos de PAN al evaporarse el disolvente (**Figura 3.25**), mientras que los *scaffolds* obtenidos sin la disolución saturada de hebras de PAN con DMF, la textura rugosa puede ser debida a la rugosidad de los monofilamentos de PAN (**Figura 3.26**).

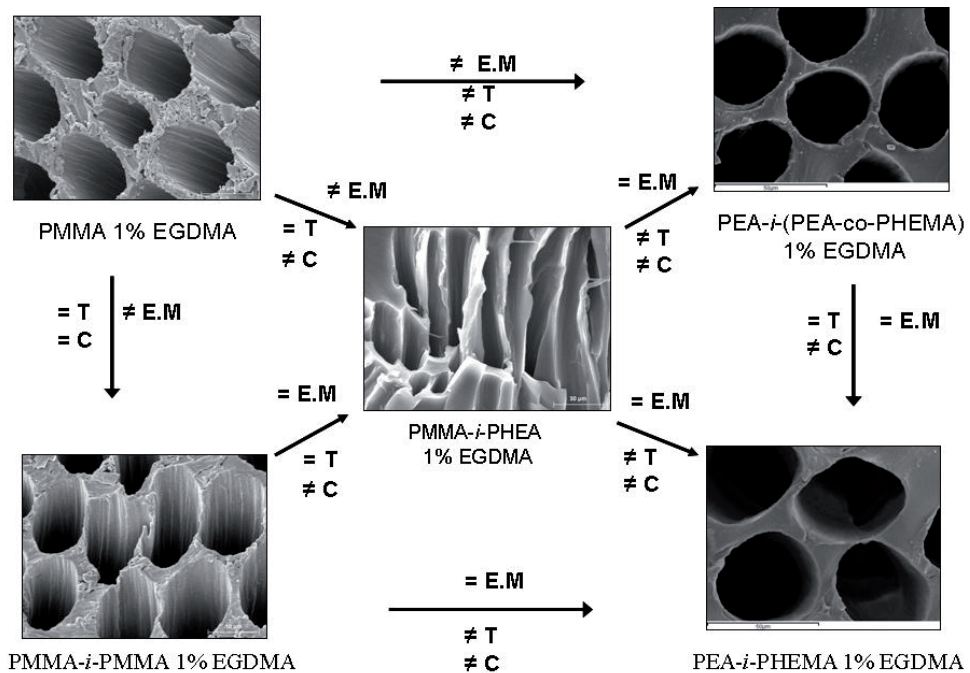


Figura 3.27: Micrografías SEM de *scaffolds* con diferentes características donde E.M, T y C representan estructura macromolecular (red o IPN), tamaño y composición respectivamente.

Por tanto, ya sea con el procedimiento 3.2.2.1 o con el procedimiento 3.2.2.2 podemos obtener *scaffolds* con diferentes características (estructura macromolecular, composición química, tamaño de diámetro de canal) tal y como

se puede observar en la **figura 3.27**, además de obtener distintas texturas superficiales demostrando de esta forma la versatilidad de estas técnicas.

Los *scaffolds* mostrados pueden encontrar aplicaciones como soporte físico para cultivos celulares y/o como estructuras que faciliten tanto la regeneración de tejidos como la reparación durante operaciones de reconstrucción. Teniendo en cuenta que a la hora de diseñar *scaffolds*, un parámetro importante es que la estructura morfológica del *scaffold* debe imitar a la de los tejidos naturales a reparar, y ya que muchos tejidos naturales tales como los tendones, nervios, ligamentos, médula espinal, articulaciones de los cartílagos, músculos, vasos y dientes (véase **Figura 3.28**) tienen estructuras orientadas, es decir tienen arquitecturas fibrilares o tubulares (Ma y Zhang, 2001), que estarían estrechamente relacionadas con la función fisiológica y mecánica de los tejidos (Yang et al. 2006), las aplicaciones previstas para los *scaffolds* obtenidos son las anteriormente mencionadas.

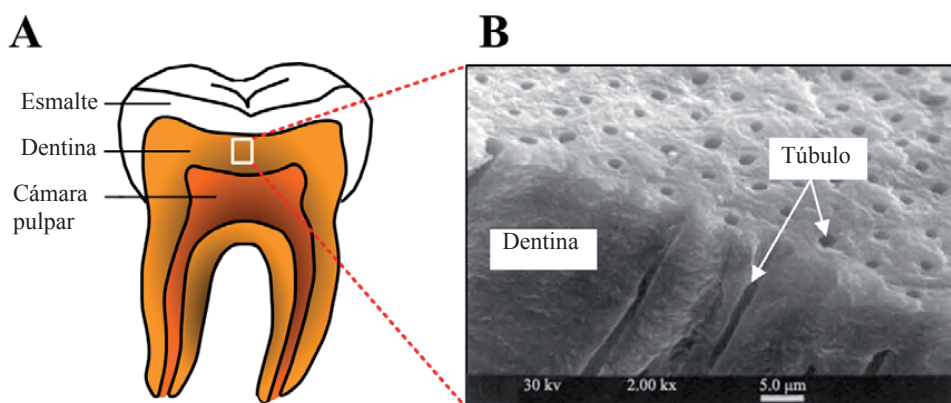


Figura 3.28: A) Imagen transversal de los dientes humanos. B) Micrografía SEM de la dentina en la que se muestra el material sólido dentina y los microtúbulos dentinarios en dirección perpendicular desde la pared pulpar hacia la unión dentina esmalte (Lin et al. 2011).

3.3.1.3 Fabricación de scaffolds 3D con templates de filamentos (monofilamento) sinterizados en atmósfera de disolvente

Por otra parte, tal y como se ha mencionado anteriormente uno de los objetivos de este trabajo era obtener estructuras interconectadas mediante un procedimiento nuevo. Tal y como se ha visto en el Capítulo 2, ha sido posible obtener *scaffolds* interconectados para la ingeniería de tejidos a partir de un nuevo método que consiste en la sinterización mediante calor. Sin embargo, la

aplicación de este procedimiento a los monofilamentos de PAN no mostró la unión de los monofilamentos a temperaturas superiores a su T_g (370 K) (Andrady, 1999) e inferiores a su punto de fusión (590 K) (Najaraj et al. 2012). Concretamente, se han hecho pruebas en el intervalo de temperaturas entre 508 y 523 K, y de tiempos entre 2 y 30 min, observándose cambios en el color de los monofilamentos de PAN desde amarillo a marrón oscuro, debido a reacciones de estabilización que incluyen ciclación, deshidrogenación, reacción oxidativa así como reacciones de entrecruzamiento (Sun et al. 2010). Por tanto, se desarrolló un nuevo método para producir *scaffolds* interconectados para la ingeniería de tejidos. Este método, ha consistido en la sinterización de los monofilamentos en atmosfera de disolvente, y de esta forma probablemente se generaría una disolución parcial de la superficie de los monofilamentos que produce una unión firme entre ellos.

Con este procedimiento, descrito en el apartado 3.2.2.3, se pueden obtener ensamblajes de monofilamentos de PAN que forman un *template* porogénico 3D, con el objeto de obtener *scaffolds* que sean la estructura inversa de estos *templates*. En las **figuras 3.29** y **3.30** se pueden observar la superficie exterior y la unión de los monofilamentos del *template* respectivamente.

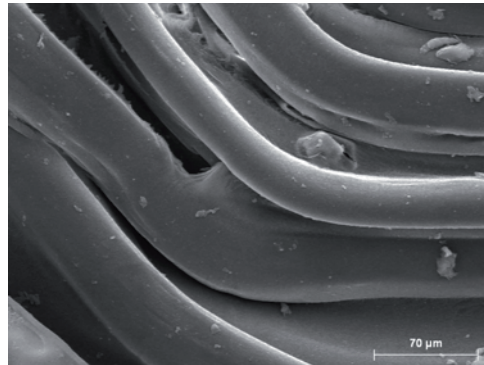
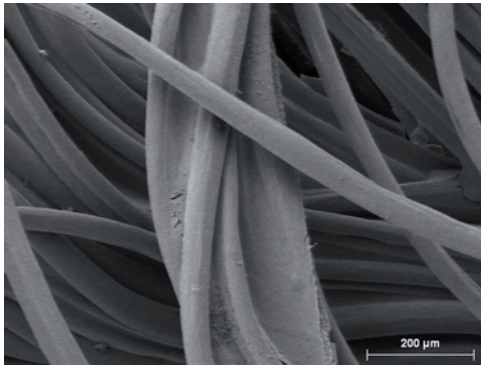


Figura 3.29: Micrografía SEM del *template* de monofilamentos de PAN unidos con atmósfera de disolvente. Barra de escala 200 μm .

Figura 3.30: Detalle de la unión de los monofilamentos de PAN. Barra de escala 70 μm .

Para sinterizar los monofilamentos de PAN y formar un *template* 3D, se mojaron los monofilamentos que forman el *template* con DMF con el objeto de que el proceso de sinterización fuese más rápido y al mismo tiempo asegurar que los monofilamentos de las capas interiores del *template* se sinterizaran.

Se probaron distintos tiempos de exposición en DMF, observándose que por encima de 2 h los *templates* se disolvían en gran medida, dando lugar a un

fluido viscoso que provocaba una oclusión de la mayor parte de los huecos del *template* y, por tanto, se perdía la arquitectura de éste.

El tratamiento en atmósfera de disolvente de los monofilamentos, descrito previamente en el apartado 3.2.2.3, produjo una unión firme entre las láminas de monofilamentos apiladas así como entre algunos de los monofilamentos de la misma capa tal y como se aprecia en la **figuras 3.29** y **3.30**, probablemente debido a un proceso que implica la solubilidad del polímero en el disolvente y la posterior evaporación de éste.

La disolución de un polímero en un disolvente implica dos procesos de transporte: difusión del disolvente y desenmarañamiento de la cadena (Miller-Chou y Koenig, 2003). Cuando un polímero no entrecruzado está en contacto con un disolvente termodinámicamente compatible, éste se difunde en el polímero hinchándolo y cuando la concentración de disolvente en el polímero hinchado alcanza cierto valor crítico, el desenmarañamiento de la cadena empieza a dominar y finalmente el polímero se disuelve (Narasimhan y Peppas, 1996).

Este proceso de disolución, se ve afectado por muchos parámetros, como: tipo de disolvente, temperatura, peso molecular, polidispersidad, composición y conformación del polímero entre otros (Miller-Chou y Koenig, 2003). Respecto a la compatibilidad termodinámica del disolvente, teniendo en cuenta la teoría de disolución de Flory-Huggins, que trata de las interacciones que se producen entre polímero-disolvente y polímero-polímero, se pueden dar los siguientes casos:

- Las interacciones polímero-disolvente y polímero-polímero son iguales, con lo que los segmentos no muestran especial preferencia por interactuar con uno u otro. Entonces se tiene una situación ideal: la molécula adopta el tamaño que tendría en ausencia de disolvente.

- Las interacciones polímero-disolvente son mayores que las interacciones polímero-polímero: se favorecen las primeras interacciones y para ello entra disolvente dentro de la molécula, ésta se expande y aumenta de tamaño. Puesto que las interacciones son favorables, el polímero es soluble, por lo que se denomina buen disolvente.

- Las interacciones polímero-disolvente son menores que las interacciones polímero-polímero: la molécula tiende a expulsar el disolvente y se contrae: De hecho, cada segmento tiende a rodearse sólo de polímero, por lo que en cuanto el efecto se hace apreciable, el polímero precipita, denominándolo mal disolvente (Peña y Muntaner, 1998).

En este estudio, se ha utilizado como disolvente la DMF ya que es un buen disolvente del PAN (Phadke et al. 2005; Bercea et al. 2008) y por tanto, según

lo comentado anteriormente se produce la disolución del *template* de PAN obteniendo el *scaffold* sin residuos de porógeno tal y como se vio en los apartados 3.2.2.1 y 3.2.2.2.

Sin embargo, para la sinterización de los monofilamentos de PAN se utiliza DMF y no se produce una disolución total del *template*. Probablemente, esto es debido a que cuando el solvente penetra en el polímero, las cadenas no se desenmarañan instantáneamente. Así, una cadena polimérica necesita un periodo de tiempo para completar el movimiento desde un estado gomoso enmarañado hasta un estado de líquido disuelto. En cada punto en un polímero, el desenmarañamiento empieza cuando la concentración de disolvente en ese punto alcanza la concentración de gel crítica. Después de un periodo de tiempo igual al tiempo de desenmarañamiento, las moléculas en ese punto se disuelven (Peppas et al. 1994). Si no se ha alcanzado ese tiempo de desenmarañamiento para todas las moléculas del polímero, es posible que al dejar evaporar el disolvente, las moléculas de polímero solidifiquen por gelación y/o cristalización en una estructura densa (Reverchon et al. 2009) y/o se produzca la precipitación de las moléculas disueltas debido a la supersaturación, ya que según Stupperich-Sequeira et al. (2006), si la concentración de soluto en el disolvente está por encima de un nivel de concentración, el material disuelto empieza a precipitar. Así, es posible generar un estado intermedio entre disolución completa del polímero y precipitación, en el que la superficie de los monofilamentos son susceptibles de unirse con los monofilamentos con los que está en contacto antes de la precipitación de las cadenas entrelazadas produciéndose la sinterización de los monofilamentos.

De esta forma, se obtiene un *template* porogénico 3D estable donde las capas de PAN que lo forman están conectadas formando uniones efectivas que han sido producidas por el proceso de sinterización en atmósfera de disolvente tal y como se puede ver en la **figura 3.30**, en la que se muestran algunos de los puntos de interconexión.

Por otra parte, el proceso descrito anteriormente da lugar a un *template* poroso (**Figuras 3.29 y 3.30**) que permite que la solución monomérica pueda penetrar en el *template* y posteriormente polimerizar en éste tal y como se describe en la **figura 3.7** del apartado 3.2.2.1. Como resultado, cuando el *template* es eliminado, el *scaffold* obtenido es la estructura inversa del *template* con una estructura interconectada de poros abiertos (**Figuras 3.31 y 3.32**). Una consecuencia de la morfología del *template* obtenido es que obtenemos *scaffolds* con canales cilíndricos con interconexiones. Esto, se ve claramente en las **figuras 3.31 y 3.32**.

La **figura 3.31** muestra la superficie exterior del *scaffold*, apreciándose una estructura regular, con una matriz de poros en la forma de canales. La **figura 3.32**, muestra las interconexiones transversales entre las capas.

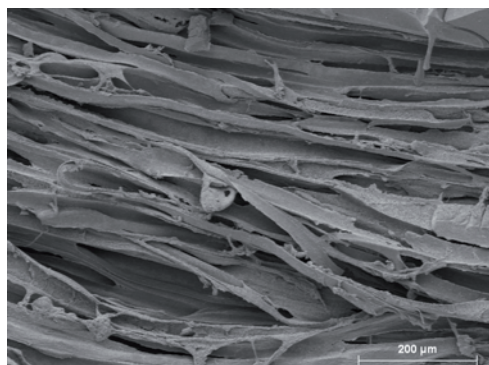


Figura 3.31: Micrografía SEM del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA obtenido a partir de la unión de monofilamentos de PAN unidos con atmósfera de disolvente. Barra de escala 200 µm.

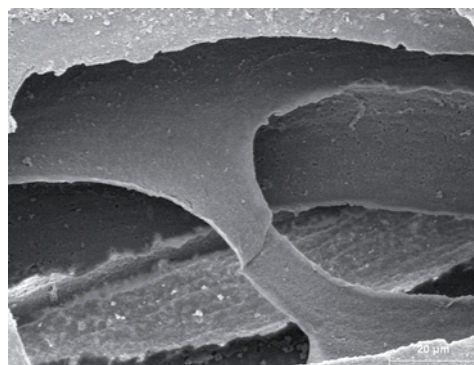


Figura 3.32: Detalle de las interconexiones entre las capas del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA PAN. Barra de escala 20 µm.

3.3.2 Porosidad

3.3.2.1 Porosidad de los scaffolds para las muestras obtenidas según el método 3.2.2.1 (fabricación de scaffolds 3D con templates de tela)

i) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.1 (inmersión de los scaffolds)

La porosidad de los *scaffolds* de PMMA y de PMMA-*i*-PMMA entrecruzados con EGDMA al 1% en peso se determinaron tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.2.4.1, mediante la ecuación 3.1, con unos valores de densidad aparente de los *scaffolds* de PMMA y PMMA-*i*-PMMA determinados mediante la ecuación 3.4 y con un valor de $\rho_{PAN} = 1.15 \text{ g/cm}^3$ (**Tabla 3.4**). La porosidad media de los *scaffolds* de PMMA y de PMMA-*i*-PMMA se muestra en la **tabla 3.4**.

ii) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.2 (inmersión de la muestra antes de eliminar el template)

La porosidad de los *scaffolds* de PMMA y de PMMA-*i*-PMMA entrecruzados con EGDMA al 1% en peso se determinaron tal y como se describió en el apartado 3.2.2.4.2, mediante la ecuación 3.1, con unos valores de densidad aparente de las muestras de PMMA y PMMA-*i*-PMMA (*scaffolds* junto con el *template*) determinados mediante la ecuación 3.6 y con un valor de $\rho_{PAN} = 1.15$

g/cm³ (**Tabla 3.4**). La porosidad media de los *scaffolds* de PMMA y de PMMA-*i*-PMMA se muestra en la **tabla 3.4**.

Procedimiento/Composición	PMMA	PMMA- <i>i</i> -PMMA
Densidad aparente método 3.2.2.4.1 (g/cm ³)	0.90 ± 0.03	0.98 ± 0.01
Densidad aparente método 3.2.2.4.2 (g/cm ³)	1.13 ± 0.03	1.17 ± 0.01
Porosidad Método 3.2.2.4.1 (%)	29 ± 3	18 ± 1
Porosidad Método 3.2.2.4.2 (%)	28 ± 1	17 ± 1

Tabla 3.4: Porosidad de los *scaffolds* y densidad aparente (de los *scaffolds* y las muestras), mediante los procedimientos 3.2.2.4.1 y 3.2.2.4.2 (antes de eliminar el *template*), obtenidos a partir de tela de PAN según el procedimiento 3.2.2.1 con una estructura macromolecular de red y de IPN. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso.

3.3.2.2 Porosidad de los *scaffolds* para las muestras obtenidas según el método 3.2.2.2 (fabricación de *scaffolds* 3D con templates de filamentos)

i) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.1 (inmersión de los *scaffolds*)

La porosidad de los *scaffolds* con una estructura macromolecular de IPN, se determinaron tal y como se describió en el apartado 3.2.2.4.1, mediante la ecuación 3.1, con unos valores de densidad aparente de los *scaffolds* para las muestras de la **tabla 3.3** mostrados en la **tabla 3.5**, determinados mediante la ecuación 3.4 y con un valor de $\rho_{PAN} = 1.15 \text{ g/cm}^3$. La porosidad media de los *scaffolds* se muestra en la **tabla 3.6**.

ii) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.2 (inmersión de la muestra antes de eliminar el *template*)

La porosidad de los *scaffolds* con una estructura macromolecular de red y de IPN, se determinaron tal y como se describió en el apartado 3.2.2.4.2, mediante

la ecuación 3.1, con unos valores de densidad aparente de los *scaffolds* junto con el template para las muestras de la **tabla 3.3** mostrados en la **tabla 3.5** y mediante la ecuación 3.6 y con un valor de $\rho_{PAN} = 1.15 \text{ g/cm}^3$. La porosidad media de los *scaffolds* se muestra en las **tablas 3.6** y **3.7**.

Composición IPN's	Densidad aparente (g/cm^3)	
	3.2.2.4.1	3.2.2.4.2
PEA- <i>i</i> -PHEMA	0.77 ± 0.05	1.14 ± 0.01
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	0.73 ± 0.03	1.14 ± 0.02
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	0.81 ± 0.02	1.12 ± 0.01
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	0.73 ± 0.01	1.14 ± 0.01
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	0.66 ± 0.03	1.11 ± 0.01
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	0.61 ± 0.03	1.08 ± 0.01
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	0.58 ± 0.04	1.09 ± 0.02

Tabla 3.5: Densidad aparente de los *scaffolds* y las muestras según los métodos 3.2.2.4.1 y 3.2.2.4.2 respectivamente con una estructura macromolecular de IPN obtenidas según el método 3.2.2.2. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.

Composición IPN's	Porosidad (%)	
	3.2.2.4.1	3.2.2.4.2
PEA- <i>i</i> -PHEMA	35 ± 1	32.7 ± 0.3
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	34.3 ± 0.8	34.6 ± 0.7
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	36.9 ± 0.9	33.6 ± 0.2
PEA- <i>i</i> -(PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	33.4 ± 0.2	34.2 ± 0.3
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 70:30	40 ± 1	39.7 ± 0.1
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 50:50	36 ± 2	38.3 ± 0.3
Homo-IPN de (PEA- <i>co</i> -PHEMA) 30:70	30 ± 1	33.7 ± 0.4

Tabla 3.6: Porosidad de los *scaffolds* obtenidos a partir de monofilamentos de PAN según el procedimiento 3.2.2.2 con una estructura macromolecular de IPN. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.

Composición REDES	(%)	Porosidad (%)	D. a. m
	Monof.	Método 3.2.2.4.2	3.2.2.4.2 (g/cm ³)
PEA	46.8 ± 0.7	47.4 ± 0.7	1.08 ± 0.02
(PEA-co-PHEMA) 70:30	43 ± 1	43.9 ± 0.7	1.09 ± 0.02
(PEA-co-PHEMA) 50:50	44.4 ± 0.7	49.6 ± 0.6	1.16 ± 0.01
(PEA-co-PHEMA) 30:70	43.0 ± 0.5	43.3 ± 0.8	1.11 ± 0.02

Tabla 3.7: Porcentaje en masa de monofilamentos utilizados para la obtención de los *scaffolds* (Monof.), densidad aparente de las muestras y porosidad de los *scaffolds* obtenidos a partir de monofilamentos de PAN según el procedimiento 3.2.2.2 con una estructura macromolecular de red donde D. a. m representa la densidad aparente según el método. Todas las muestras están entrecruzadas con EGDMA 1% en peso. Las relaciones a:b son en % en peso.

iii) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.3 (medidas de masa y dimensiones)

La porosidad de los *scaffolds* de PEA con 1% en peso EGDMA con una estructura macromolecular de red y obtenidos a partir de un porcentaje en masa de porógeno de $51.5 \pm 0.9\%$, se determinaron tal y como se describió en el apartado 3.2.2.4.3, mediante la ecuación 3.1, con un valor de V_t calculado mediante la ecuación 3.8 de $(8.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$ y con un valor de m_{PAN} y ρ_{PAN} de $(5.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ g}$ y 1.15 g/cm^3 respectivamente. La porosidad media de los *scaffolds* fue de $58 \pm 4\%$.

iv) Calculada mediante el procedimiento 3.2.2.4.4 (análisis de imagen)

La porosidad de los *scaffolds* de PEA con 1% en peso EGDMA con una estructura macromolecular de red y obtenidos a partir de un porcentaje en masa de porógeno de $51.5 \pm 0.9\%$, se determinaron tal y como se describió en el apartado 3.2.2.4.4, resultando una porosidad media de $60 \pm 4\%$.

Los resultados indican que la porosidad de los *scaffolds* se puede modificar al variar el porcentaje de monofilamentos. Además, a la vista de los resultados de la **tabla 3.7** observamos que al aumentar el porcentaje en masa de porógeno, la porosidad aumenta. Sin embargo, para el *scaffold* con una composición de PEA/PHEMA 50:50, observamos que no se produce este efecto,

probablemente debido a que la mezcla monomérica no ha penetrado completamente entre cada uno de los monofilamentos para posteriormente polimerizar y por tanto obtenemos poros debidos tanto al porógeno como poros debidos a los puntos de contacto entre fibras en los que no ha penetrado la mezcla reactiva con lo que la porosidad obtenida es mayor. Esto, se puede observar mejor en la **figura 3.33** donde las zonas marcadas en blanco, muestran los poros generados por el contacto entre monofilamentos.

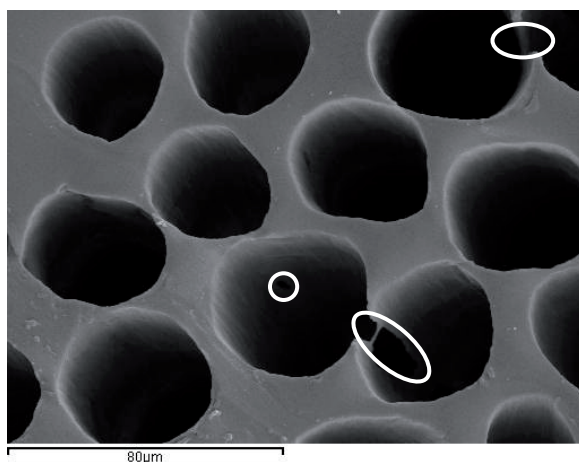


Figura 3.33: Micrografía SEM en la que se muestran en blanco algunos poros debido al contacto entre monofilamentos. Barra de escala 80 μm .

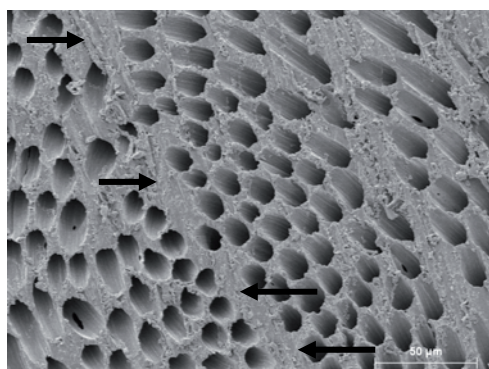


Figura 3.34: Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA, 1% en peso EGDMA fabricado a partir de tela de PAN en forma de malla. Barra de escala 50 μm .

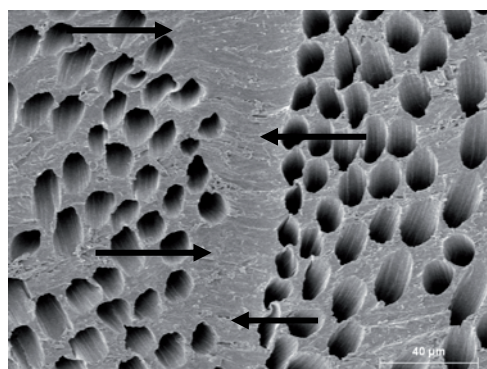


Figura 3.35: Micrografía SEM de la superficie exterior del *scaffold* de PMMA-*i*-PMMA, 1% en peso EGDMA. Barra de escala 40 μm .

Por otra parte, tal y como se ve en la **tabla 3.4** y al comparar los resultados obtenidos para las redes de copolímeros (**Tabla 3.7**) y sus respectivas homo-IPN's (**Tabla 3.6**), la porosidad disminuye al sintetizar IPN's, probablemente debido a que en el proceso de hinchamiento de la red junto con el *template* (véase **Figura 3.9**, etapas g y h), los monómeros utilizados para la formación de la IPN penetran en el interior de la primera red pero no difunden en el *template*, con lo que el volumen total de la muestra aumenta mientras que el volumen del *template* es prácticamente el mismo y por tanto el volumen de poros permanece constante. De hecho, el diámetro del canal es prácticamente el mismo al del monofilamento del *template* utilizado independientemente de que se sintetice una red o una IPN tal y como se ha comentado en el apartado 3.3.1.1. Además, si comparamos las **figuras 3.34** y **3.35**, observamos que la distancia entre las agrupaciones de poros formados por las hebras, marcada con flechas, es mayor en la IPN (**Figura 3.35**) que en la red (**Figura 3.34**), es decir, la primera red se expande en el proceso de hinchamiento para obtener la IPN y por tanto el volumen aumenta.

Respecto a los distintos métodos utilizados para calcular las porosidades, observamos que para los métodos basados en el principio de Arquímedes (métodos 3.2.2.4.1 y 3.2.2.4.2), las porosidades son muy similares y con poca desviación (véase **Tablas 3.4**, **3.6** y **3.7**), mientras que con el método a partir de medidas dimensionales y análisis de imagen se obtienen mayores dispersiones (apartados 3.3.2.5 y 3.3.2.6).

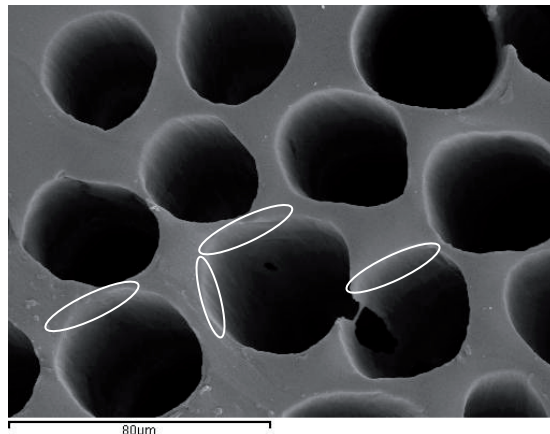


Figura 3.36: Micrografía SEM mostrando con elipses blancas algunas zonas en las que la escala de grises es prácticamente la misma en la superficie del *scaffold* y en la pared interna del poro. Barra de escala 80 μm .

Por una parte, los resultados de la porosidad a partir de las medidas dimensionales dependen de la exactitud de las medidas lineales (longitud y

diámetro) (Ho y Hutmacher, 2006) del cilindro. Por tanto, los efectos de posibles bordes rugosos introducidos durante el proceso de corte del *scaffold*, así como la medición de muestras flexibles generan dimensiones lineales inexactas. Por otra parte, la elección del corte así como las posibles rugosidades generadas en la superficie del *scaffold* en el proceso del corte de la muestra tienen un efecto significativo en los resultados de la porosidad a partir de análisis de imagen. Un problema del análisis de micrografías 2D de estructuras 3D es que la intensidad en la escala de grises del material de la pared es a menudo comparable con la situada en el borde. En consecuencia, el software de análisis de imagen es incapaz de detectar los límites reales del poro (Grant et al. 2006). Esto lo podemos ver mejor en la **figura 3.36** donde se señalan con elipses blancas algunas zonas donde la escala de grises es la misma para la parte interior del poro y de la superficie del *scaffold*.

3.3.3 Medidas de hinchamiento (Swelling)

Las propiedades superficiales de los biomateriales desempeñan un papel importante en la interacción celular, tales como la adhesión celular, infiltración y proliferación. La superficie química de muchos polímeros sintéticos es hidrofóbica e influye de forma negativa en su biocompatibilidad durante la etapa inicial de contacto con el entorno biológico ya que no promueven completamente ni la adhesión celular ni la proliferación (Lee et al. 2006). Es por ello, que la hidrofiliicidad es una importante propiedad para los biomateriales. Además, la capacidad de los materiales para retener y difundir agua, es una de las propiedades más importantes para un biomaterial, ya que está directamente relacionada con la capacidad de un biomaterial para absorber fluido biológico y para transportar nutrientes celulares y metabolitos (Cai et al. 2007). Para determinar la hidrofiliicidad de los *scaffolds*, así como su capacidad de retener y difundir el agua, se ha estudiado la relación de hinchamiento (Hsieh et al. 2005; Lee et al. 2006) y el contenido de agua en equilibrio (*ECW*).

Cuando un hidrogel seco empieza a absorber agua, las primeras moléculas de agua que penetran en la matriz hidratan a los grupos más polares, es decir los grupos hidrofílicos. Esto da lugar a lo que se denomina "agua de enlace primaria". A medida que los grupos polares se hidratan, la red se hincha y se exponen los grupos hidrofóbicos, que también interaccionan con las moléculas de agua, dando lugar al "agua de enlace secundaria". Finalmente, una cantidad adicional de agua se embebe debido a la fuerza motriz osmótica de las cadenas de la red hacia dilución infinita. Este último hinchamiento se ve contrarrestado por los entrecruzamientos físicos o covalentes, dando lugar a una fuerza de retracción elástica de la red. De esta forma, el hidrogel alcanza un equilibrio. Esta última agua embebida se denomina "agua libre" y se supone que llena el espacio entre las cadenas de la red y/o el centro de los grandes poros,

macroporos o huecos (Hoffman, 2002). El contenido en agua en equilibrio (*EWC*), nos da información de la cantidad total de agua que es capaz de absorber.

Los *scaffolds* con estructura macromolecular de IPN preparados con distintas composiciones de EA/ HEMA (véase **Tabla 3.3**), se hincharon en agua destilada el tiempo necesario hasta que su masa fue constante y la relación de hinchamiento y el *EWC* se determinaron utilizando las ecuaciones 3.8 y 3.9 respectivamente. La **figura 3.37** muestra la evolución de la relación de hinchamiento en función del tiempo para las distintas IPN's, donde las muestras 3I6 y 3I7 presentan los valores más altos, mientras que las muestras 3I2 y 3I3 tienen los valores más bajos. Estos resultados, indican que la absorción de agua es mayor para las IPN's que tienen un mayor porcentaje en masa de PHEMA en la IPN, tal y como es de esperar, ya que el PHEMA es más hidrofílico que el PEA y a mayor contenido de PHEMA, mayor afinidad de los hidrogeles con el agua (para formar puentes de hidrogeno) y por tanto mayor relación de hinchamiento de los hidrogeles. Sin embargo, observamos que el comportamiento de la relación de hinchamiento no es lineal sino que se producen dos comportamientos, lo que sugiere que la relación de hinchamiento no solo depende de la composición, es decir, del porcentaje de PHEMA en la muestra, sino que la porosidad del *scaffold* así como la morfología de la IPN (full vs homo IPN) pueden influir en el *swelling*.

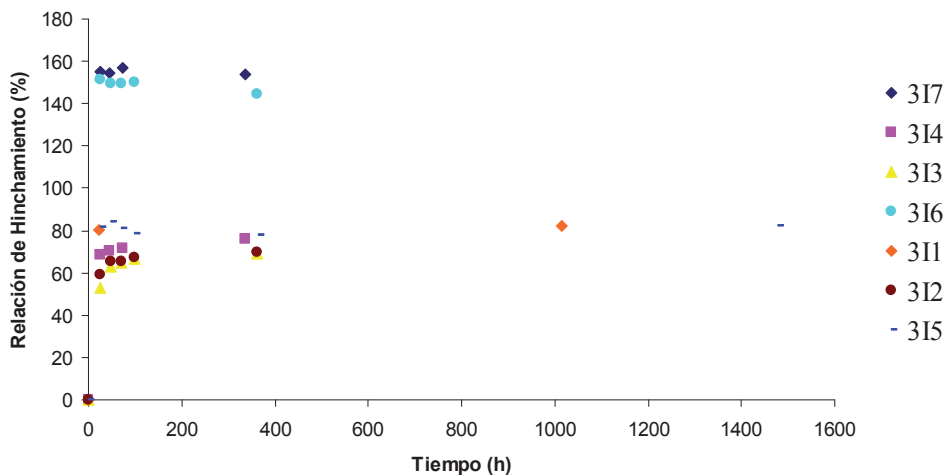


Figura 3.37: Relación de hinchamiento de las muestras, según las composiciones de la **tabla 3.3**, en agua destilada y a temperatura ambiente en función del tiempo.

Por una parte, en las homo-IPN's (muestras 3I5, 3I6 y 3I7 con un porcentaje en peso de 30%, 50% y 70% de PHEMA respectivamente), la

relación de hinchamiento sigue el siguiente orden: 3I5 < 3I6 ≈ 3I7. Los resultados indican que la absorción de agua es mayor para las IPN's con mayor porcentaje en masa de PHEMA en la IPN. Cabe destacar, que aunque el porcentaje de grupos hidrofílicos (PHEMA) es menor en la muestra 3I6 que en la muestra 3I7 la relación de hinchamiento es similar. Esto podría ser debido a que la porosidad de la muestra 3I6 es mayor que la 3I7 y por tanto la presencia de agua en los canales es mayor. Por otra parte, en las full-IPN's la relación de hinchamiento de los hidrogeles sigue el siguiente orden: 3I1 > 3I4 > 3I2 ≈ 3I3. Esto, al igual que en las homo-IPN's puede ser debido a que a mayor contenido de PHEMA, mayor afinidad de los hidrogeles con el agua (para formar puentes de hidrogeno) y por tanto mayor relación de hinchamiento de los hidrogeles. Sin embargo, la relación de hinchamiento de la muestra 3I5 es aproximadamente la misma a la de 3I1, aunque el porcentaje en masa de PHEMA es distinto. Esto, podría ser debido a que la porosidad de la muestra 3I5 es mayor que la de la muestra 3I1 y por tanto la presencia de agua dentro de los canales del *scaffold* es mayor y/o que la disposición de las cadenas en la full y en homo IPN es distinta.

Todos estos fenómenos podrían contribuir a explicar porque un *scaffold* de hidrogel que contiene un porcentaje mayor de grupos hidrófilos tiene una relación de hinchamiento menor (3I5 y 3I1) o parecida (3I7 y 3I6) a los que contiene menor porcentaje de grupos hidrófilos (PHEMA).

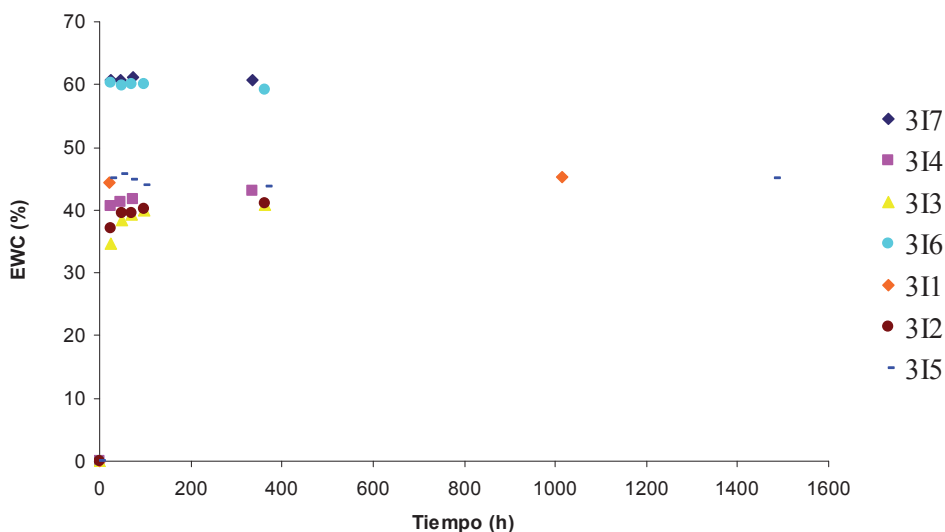


Figura 3.38: EWC de las muestras, según las composiciones de la **tabla 3.3**, en agua destilada y a temperatura ambiente en función del tiempo.

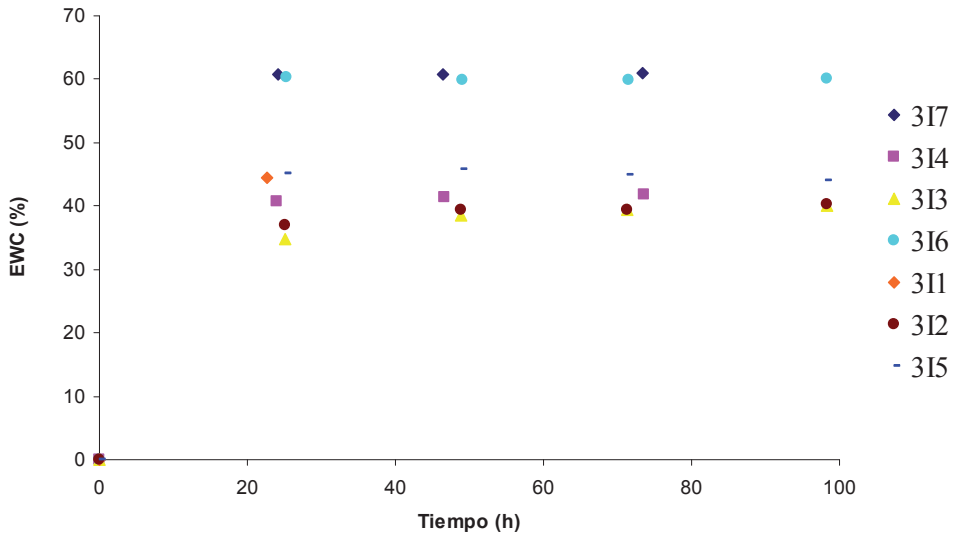


Figura 3.39: Detalle de la **figura 3.38**.

En la **figura 3.38**, se representa la evolución del contenido en agua en equilibrio (*EWC*) en función del tiempo, donde de nuevo observamos el mismo comportamiento que hemos mencionado anteriormente. Por otra parte, todos los hidrogeles se hincharon rápidamente, tal y como se aprecia en la **figura 3.39** (ampliación de la parte inicial de la **Figura 3.38**), y alcanzaron el equilibrio en menos de 26 h.

3.4 Conclusiones

- El proceso de obtención de *scaffolds* a partir de la disolución de tela utilizada como *template* porogénico (apartado 3.2.2.1) es eficaz además de versátil, con diámetros de canal que dependen del diámetro del monofilamento de la hebra de la tela. La nueva estructura obtenida, la inversa del *template* porogénico, tiene una geometría en forma de lámina con poros en forma de canales tubulares, paralelamente alineados, en distintas direcciones, de aproximadamente 11-12 μm .

- Se ha desarrollado un procedimiento (apartado 3.2.2.2) para la obtención de estructuras con geometría cilíndrica de hidrogeles reforzados mediante la formación de IPN's, que implica una primera polimerización de la solución monomérica en tubos cilíndricos rellenos con monofilamentos que actúan como *template* porogénico, hinchamiento del polímero junto con el *template* porogénico en el mismo tubo cilíndrico u otro de mayor diámetro y disolución del

template. Este procedimiento es eficaz y versátil dando lugar a la producción de *scaffolds* con dimensiones muy controladas y al mismo tiempo fácil de modificar, así como diámetros de canal de poro que depende del diámetro del monofilamento utilizado como porógeno.

- Alternativamente, se puede modificar el procedimiento anterior mediante el recubrimiento de las hebras con una disolución saturada del mismo polímero que constituye las hebras con el disolvente adecuado, dando lugar a *scaffolds* en los que el diámetro del canal corresponde a los monofilamentos que constituyen la hebra.

- Mediante el procedimiento anterior (apartado 3.2.2.2), se han obtenido estructuras tubulares con poros paralelamente alineados de forma longitudinal a lo largo de toda la longitud de la estructura de aproximadamente 14 μm y 42 μm de diámetro.

- Se ha desarrollado un nuevo, sencillo y económico método de producción de *scaffolds* mediante la sinterización en atmósfera de disolvente de polímeros (apartado 3.2.2.3). Este proceso implica una solubilización parcial del polímero que constituye el *template* porogénico en el solvente y la evaporación de éste. Esta nueva tecnología de fabricación, desarrollada en este trabajo, permite obtener formas y distribuciones de poro altamente regulares con una interconectividad completa que da lugar a estructuras estables mecánicamente, sin restos de porógeno.

- Se han obtenido *scaffolds* porosos muy ordenados con el nuevo procedimiento (apartado 3.2.2.3). Estos *scaffolds* son la estructura inversa de los *templates*. Como resultado, se obtienen canales alineados paralelamente con una conectividad controlada, que se obtiene por la sinterización en atmósfera de disolvente de los monofilamentos de PAN.

- La mezcla monomérica penetra entre cada uno de los monofilamentos que constituyen el *template* porogénico independientemente de que el *template* porogénico esté en forma de tela, multifilamento o monofilamento.

- Todas las estructuras obtenidas son estables después de la lixiviación del porógeno y fáciles de manejar.

- Se ha comprobado que estas estructuras se puede obtener con distintos materiales como PEA, PMMA y copolímeros en distintas composiciones PEA-co-PHEMA; redes e IPN's (homo-IPN's y full-IPN's) e hidrogeles y no hidrogeles.

- Se han obtenido superficies internas de canales con rugosidades distintas dependiendo del procedimiento.

- La porosidad de los *scaffolds* se puede controlar variando la cantidad de monofilamentos utilizados para construir el *template* y/o al obtener la IPN si no

se constriñe la estructura obtenida durante la primera polimerización. Se han obtenido porosidades de hasta el 60%.

- La porosidad de los *scaffolds* disminuye al sintetizar IPN's.
- En general, la absorción de agua aumenta al aumentar el porcentaje en masa de PHEMA en la IPN, ya que el PHEMA es más hidrofílico que el PEA. Sin embargo, la porosidad del *scaffold* así como la morfología de la IPN (full vs homo IPN) también pueden influir en el *swelling*.
- Los resultados demuestran la viabilidad de estos métodos para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación controlada de una gran variedad de estructuras y proporcionar nuevas estructuras con propiedades adecuadas para su estudio en la ingeniería de tejidos, concretamente estos *scaffolds* pueden ser útiles para la regeneración de tejidos naturales que están organizados en arquitecturas fibrilares o tubulares como tendones, nervios, ligamentos, médula espinal, articulaciones de los cartílagos, músculos, vasos y dientes, además de dispositivos extracorpóreos, (por ejemplo, riñón artificial), sustratos para reacciones químicas y biológicas, sistemas de liberación controlada, así como para membranas y filtros.

3.5 Recomendaciones

En este trabajo se han obtenido distintas estructuras ordenadas con poros en forma de canales cilíndricos alineados tanto con una geometría laminar como cilíndrica con distintos métodos. En base a los resultados obtenidos se recomienda estudiar:

- Cultivos celulares y de tejidos: los *scaffolds* obtenidos en este trabajo muestran arquitecturas espaciales en 2D y 3D. Por otra parte, en las arquitecturas en 2D, se han obtenido *scaffolds* con canales paralelamente alineados en la misma dirección y en distintas direcciones. Algunas investigaciones, han demostrado que la respuesta celular es muy diferente para distintas formas arquitectónicas (Sobral et al. 2011). Así, sería interesante, evaluar la influencia de la arquitectura espacial en el desarrollo de cultivos celulares en los *scaffolds* obtenidos, tanto en este capítulo como en el Capítulo 2. Con las estructuras de canales cilíndricos obtenidas, ¿qué prefieren las células, estructuras 2D (*scaffolds* con poros cilíndricos no interconectados) o 3D (*scaffolds* con poros cilíndricos interconectados), superficies con textura lisa o rugosa? Por otro lado, ¿las células prefieren canales alineados en la misma dirección o en distintas direcciones?
- Las propiedades mecánicas de todas las estructuras obtenidas y en función de los resultados obtenidos, evaluar si es necesario reforzar la matriz

polimérica, ya sea aumentando la cantidad de entrecruzador (Lee et al. 1999) y/o añadiendo materiales de refuerzo como cerámicas (Migliaresi y Alexander, 2004) para mejorar las propiedades mecánicas.

- La relación de hinchamiento y *EWC* para las muestras con canales alienados en distintas direcciones y en las muestras con interconexión y así evaluar la hidrofiliidad y la capacidad de retener y difundir el agua de las distintas muestras obtenidas. Por otra parte, sería interesante determinar cuantitativamente el agua libre y el agua enlazada de los hidrogeles obtenidos, ya que en los hidrogeles, el oxígeno principalmente se disuelve en el agua libre pasando a través de la fase agua de las membranas (Wang et al. 2008) y tal y como se comentó en el Capítulo 1, los problemas asociados a la falta de difusión de nutrientes y oxígeno dan lugar a la necrosis celular y de tejidos (Folkman y Hochberg, 1973).

El agua absorbida en los polímeros hidrofílicos, la podemos encontrar en tres estados: 1) agua de enlace que no se congela, 2) agua de enlace que se congela y 3) agua libre. El agua de enlace que no se congela absorbida en el polímero no cristaliza incluso cuando la muestra hinchada se enfría hasta -100°C . El agua de enlace que se congela cristaliza a temperaturas inferiores a 0°C mientras que el agua libre cristaliza a 0°C (Ping et al. 2001). Por tanto, a partir de las medidas de fusión realizadas mediante DSC, podemos determinar los distintos estados del agua en los polímeros hinchados.

NOTA

Durante la redacción de esta investigación, se ha tenido conocimiento de que Flynn et al. (octubre, 2003) utilizaron una técnica similar para la obtención de *scaffolds* cilíndricos con canales orientados longitudinalmente con una estructura macromolecular de red, es decir parte del primer objetivo del trabajo de este capítulo, el cual se presentó para la obtención del diploma de estudios avanzados en febrero de 2004 en la UPV (**figuras 3.17, 3.18, 3.24 y 3.25**). Por lo que los hallazgos fueron simultáneos. Sin embargo, hay que mencionar que Flynn et al. (2003) obtienen *scaffolds* cilíndricos de PHEMA (hidrogel) en los que los poros están orientados longitudinalmente a partir de fibras de PCL como *template*, a diferencia de que en este estudio se utilizó como porógeno PAN, distintos diámetros de monofilamento y se sintetizan distintos polímeros, concretamente PEA y PEA-co-PHEMA (70:30), ya que como se ha explicado en la introducción de este capítulo una superficie totalmente hidrofílica (PHEMA) puede inhibir la adsorción de proteínas. Además, posteriormente, este trabajo se desarrolló con un método nuevo para sintetizar IPNs, a diferencia de Flynn et al. (octubre, 2003) que sintetizan una red, ya que la principal desventaja de los hidrogeles es su baja resistencia mecánica, que se puede mejorar mediante la formación de redes de interpenetración (IPN) (Lee et al. 1999).

3.6 Bibliografía

Andrady, A. L. (1999). Poly(acrylonitrile). En "Polymer data handbook". (Mark, J. E. ed.), pp. 254-257. Oxford University Press, Inc, New York, USA. http://www.qmc.ufsc.br/~minatti/docs/20061/polymer_data_handbook.pdf

Arifvianto, B., Suyitno. (2009). Surface roughness and wettability of AISI 316L induced by surface mechanical attrition treatment with different milling ball diameter. En "International Conference on Instrumentation, Communications, Information Technology and Biomedical Engineering (ICICI-BME)". Bandung Indonesia. pp. 1-4.

Bartolo, L. D., Rende, M., Morelli, S., Giusi, G., Salerno, S., Piscioneri, A., Gordano, A., Vito, A. D., Canonaco, M., Drioli, E. (2008). Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *J. Membr. Sci.* **325**, 139-149.

Belmonte, J. (2008). Lentes intraoculares opacificadas. *Microcirugía Ocular* **3**.

Berecea, M., Morariu, S., Brunchi, C-E. (2008). Influence of non-solvent on the gelation phenomenon of polymer solutions. *Rev. Roum. Chim.* **53**, 769-776.

Cai, K., Zhang, J., Deng, L. H., Yang, L., Hu, Y., Chen, C., Xue, L., Wang, L. (2007). Physical and biological properties of a novel hydrogel composite based on oxidized alginate, gelatine and tricalcium phosphate for bone tissue engineering. *Adv. Eng. Mater.* **9**, 1082-1088.

Chang, H-I., Wang, Y. (2011). Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. En "Regenerative medicine and tissue engineering –cells and biomaterials". (Eberli, D. ed), pp. 569-588. In Tech.

Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified formulations. *J. Controlled Release* **119**, 5-24.

Draye, J-P., Delaey, B., Voorde, V. V., Bulcke, A. V. D., Reu, B. D., Sschacht, E. (1998). In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials* **19**, 1677-1687.

Dziubla, T. D., Torjman, M. C., Joseph, J. I., Murphy-Tatum, M., Bowman, A. M. (2001). Evaluation of porous networks of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) as interfacial drug delivery devices. *Biomaterials* **22**, 2893-2899.

Eschbach, L. (2000). Nonresorbable polymers in bone surgery. *Injury, Int. J. Care Injured* **31**, DS22-27.

Fang, D., Pan, Q., Rempel, G. L. (2007). Preparation and morphology study of microporous poly(HEMA-MMA) particles. *J. Appl. Polym. Sci.* **103**, 707-715.

Flynn, L., Dalton, P. D., Shoichet, M. S. (2003). Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4265-4272.

Folkman, J., Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *The journal of experimental medicine* **138**, 745-753.

García, A. J. (2008). Surface modification of biomaterials. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 656-665. Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA.

Grant, P. V., Vaz, C. M., Tomlins, P. E., Mikhalovska, L., Mikhalovsky, S., James, S., Vadgama, P. (2006). Physical characterisation of a polycaprolactone tissue scaffold. En "Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science" (Blitz, J. P., Gun'ko, V. M. eds), pp. 215-228. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Guisseppi-Elie, A. (2010). Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials* **31**, 2701-2716.

Gupta, P., Kavita, V., Garg, S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive delivery. *DDT* **7**, 569-579.

Hacker, M. C., Mikos, A. G. (2008). Synthetic polymers. En "Principles of Regenerative Medicine". (Atala, A., Lanza, R., Thomson, J., Nerem, R. eds.), pp. 604-635. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Ho, S. T., Hutmacher, D. W. (2006). A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* **27**, 1362-1376.

Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **43**, 3-12.

Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Tian, F., Kobayashi, H., Tabata, Y. (2006). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **27**, 4079-4086.

Hsieh, C-Y., Tsai, S-P., Wang, D-W., Chang, Y-N., Hsieh, H-J. (2005). Preparation of γ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* **26**, 5617-5623.

Kasemo, B. (2002). Biological surface science. *Surface Science* **500**, 656-677.

Khamdemhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., Vacanti, J. P. (2005). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PANS* **103**, 2480-2487.

- Kubinová, S., Horák, D., Syková, E. (2009). Cholesterol-modified superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 4601-4609.
- Lampin, M., Warocquier-Clereout, R., Legris, C., Degrange, M., Sigot-Luizard, M. F. (1997). Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J. Biomed. Mater. Res.* **36**, 99-108.
- Lee, J. W., Kim, S. Y., Kim, S. S., Lee, Y. M., Lee, K. H., Kim, S. J. (1999). Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 113-120.
- Lee, S. J., Lim, G. J., Lee, J-W., Atala, A., Yoo, J. J. (2006). In vitro evaluation of poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* **27**, 3466-3472.
- Lévesque, S. G., Lim, R. M., Shoichet, M. S. (2005). Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials* **26**, 7436-7446.
- Lin, M., Luo, Z. y., Bai, B. F., Xu, F., Lu, T. J. (2011). Fluid mechanics in dentinal microtubules provides mechanistic insights into the difference between hot and cold dental pain. *PLoS ONE* [10.1371/journal.pone.0018068](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018068).
- Lv, Q., Feng, Q., Hu, K., Cui, F. (2005). Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture. *Polymer* **46**, 12662-12669.
- Ma, A., Mao, Z., Gao, C. (2007). Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf., B* **60**, 137-157.
- Ma, P. X., Zhang, R. (2001). Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* **56**, 469-477.
- Migliaresi, C., Alexander, H. (2004). Composites. Introduction. En "Biomaterials science: an introduction to materials in medicine". 2ª ed. (Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E eds.), pp. 181-196. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Miller-Chou, B. A., Koenig, J. L. (2003). A review of polymer dissolution. *Prog. Polym. Sci.* **28**, 1223-1270.
- Narasimhan, B., Peppas, N. A. (1996). On the importance of chain reptation in models of dissolution of glassy polymers. *Macromolecules* **29**, 3283-3291.
- Nataraj, S. K., Yang, K. S., Aminabhavi, T. M. (2012). Polyacrylonitrile-based nanofibers—A state-of-the-art review. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 487-513.
- Peña, M. D., Muntaner, A. R. (1998). Macromoléculas y coloides. En "Química Física". pp. 1351- 1393. Editorial Alhambra, S. A, Madrid, España.

Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27-46.

Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345-1360.

Peppas, N. A., Wu, J. C., Meerwall, E. D. (1994). Mathematical modeling and experimental characterization of polymer dissolution. *Macromolecules* **27**, 5626-6638.

Phadke, M. A., Musale, D. A., Kulkarni, S. S., Karode, S. K. (2005). Poly(acrylonitrile) ultrafiltration membranes. I. Polymer-salt-solvent interactions. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **43**, 2061-2073.

Ping, Z. H., Nguyen, Q. T., Chen, S. M., Zhou, J. Q., Ding, Y. D. (2001). States of water in different hydrophilic polymers — DSC and FTIR studies. *Polymer* **42**, 8461-8467.

Reverchon, E., Adami, R., Cardea, S., Porta, G. D. (2009). Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications. *J. Supercrit. Fluids.* **47**, 484-492.

Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., Barbarisi, A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cell. Physiol.* **199**, 174-180.

Satarkar, N. S., Hilt, J. Z. (2008). Hydrogel nanocomposites as remote-controlled biomaterials. *Acta Biomater.* **4**, 11-16.

Sartorius. (1999). Part 1. Density. En "Manual of Weighing Applications". URL:http://www.sartorius-mechatronics.com/uploads/tx_sartoriusmechpdf/BRO-DensityDeterminationManual-e.pdf.

Shu, X. Z., Liu, Y., Palumbo, F. S., Luo, Y., Prestwich, G. D. (2004). In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 1339-1348.

Singh, A., Narvi, S. S., Dutta, P. K., Pandey, N. D. (2006). External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* **29**, 233-238.

Sobral, J. M., Caridade, S. G., Sousa, R. A., Mano, J. F., Reis, R. L. (2011). Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomater.* **7**, 1009-1018.

Stupperich-Sequeira, C., Graf, K., Wiechert, W. (2006). Modeling and simulation of micro-well formation. *Math. Comp. Modell. Dyn. Syst.* **12**, 263-276.

Sun, T., Hou, Y., Wang, H. (2010). Mass DSC/TG and IR ascertained structure and color change of polyacrylonitrile fibers in air/nitrogen during thermal stabilization. *J. Appl. Polym. Sci.* **118**, 462-468.

Tirrell, M., Kokkoli, E., Biesalski, M. (2002). The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* **500**, 61-83.

Vogler, E. A. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **74**, 69-117.

Wang, Y., Tan, G., Zhang, S., Guang, Y. (2008). Influence of water states in hydrogels on the transmissibility and permeability of oxygen in contact lens materials. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 604-606.

Yang, F., Qu, X., Cui, W., Bei, J., Yu, F., Lu, S., Wang, S. (2006). Manufacturing and morphology structure of polylactide-type microtubules orientation-structured scaffolds. *Biomaterials* **27**, 4923-4933.

**4 SCAFFOLDS BIODEGRADABLES CON UN NUEVO
DISEÑO ARQUITECTÓNICO**

4.1 Introducción

Tal y como se comentó en los Capítulos 1 y 2, dependiendo de la aplicación, el *scaffold* debería reunir diferentes características, pero una red de poros bien interconectados es necesaria para la mayoría de las aplicaciones de la ingeniería de tejidos con el fin de lograr un mejor transporte de nutrientes y facilitar la migración celular (Draghi et al. 2005; Ikada, 2006). También se requiere una porosidad y una relación área superficial/volumen elevada para el anclaje celular y el crecimiento de neo-tejidos así como para un transporte uniforme de células (Ho y Hutmacher, 2006). Parámetros arquitectónicos de los poros tales como la geometría, el tamaño, la interconectividad, la orientación y la distribución también son importantes para el cultivo celular, el transporte de masa, la formación de tejido en tres dimensiones y las propiedades mecánicas (Hutmacher et al. 2003; Lee et al. 2007). Una de las formas de poro interesante es la esférica con poros interconectados (Ma y Choi, 2001). Jeong et al. (2011) estudiaron la influencia de la forma de los poros esféricos y cúbicos en la condrogénesis. Llegaron a la conclusión de que la forma de poro esférica mejoraba la condrogénesis con respecto al diseño de poro cúbico. Con respecto al tamaño de poro, en general se acepta que un tamaño de poro grande puede permitir el suministro de nutrientes, la difusión de gases y la eliminación de residuos metabólicos de forma eficaz pero da lugar a una señalización intracelular y una adhesión celular baja, mientras que el tamaño de poro pequeño puede proporcionar las propiedades opuestas (Oh et al. 2007).

Recientemente, el diseño de *scaffolds* con estructuras gradiente, es decir, *scaffolds* con tamaño de poro variable y/o con una distribución de la porosidad, ha atraído el interés de investigadores en el campo de la ingeniería de tejidos con el fin de imitar a los tejidos nativos que poseen gradientes a través de su volumen espacial como sucede en el hueso, la piel o el cartílago (Leong et al. 2008). Según Karageougiou y Kaplan (2005), los gradientes de porosidad y de tamaño de poro influyen en el crecimiento celular y la migración, y en la regeneración y el crecimiento interno de tejido. De hecho, en un estudio *in vitro* e *in vivo* en el que se utilizó un *scaffold* con un gradiente de tamaños de poro, los resultados revelaron que los diferentes tipos de células y tejido óseo necesitan intervalos de tamaño de poro diferentes en el *scaffold* para que el crecimiento celular y regeneración de tejido sean efectivos (Oh et al. 2007). Además de la optimización de las propiedades biológicas, las propiedades mecánicas a través del *scaffold* también se pueden optimizar mediante un gradiente de porosidad (Leong et al. 2008).

Por otro lado, Lee et al. (2007) estudiaron la influencia de distintos tamaños de poro (uniforme, dos capas y tamaño de poro múltiple) en la adhesión y la

proliferación de los fibroblastos de piel humana. Llegaron a la conclusión de que tanto los *scaffolds* con tamaño de poro múltiple y los de dos capas, mostraban mejores entornos para el cultivo celular comparados con el *scaffold* con tamaño de poro uniforme. Sin embargo, el *scaffold* con tamaño de poro múltiple fue más efectivo.

Algunos polímeros sintéticos y naturales han sido considerados como biomateriales para la construcción de *scaffolds* porosos para aplicaciones en la ingeniería de tejidos (Nair y Laurencin, 2007). Recientemente, el interés en los polímeros naturales ha crecido considerablemente debido a sus similitudes con la matriz extracelular (ECM) (Mano et al. 2007; Huang y Fu, 2010). Entre ellos, el quitosano es un biomaterial interesante debido a su alta biocompatibilidad, actividad antibacteriana, carácter bioadhesivo y biodegradabilidad (Berger et al. 2004; Montembault et al. 2005; Shi et al. 2005). Además, su producto de biodegradación *in vivo*, la glucosamina, no es tóxico (Ma et al. 2001). Por otra parte, entre las características que hacen adecuada a la gelatina como biomaterial para la ingeniería de tejidos podemos citar su biocompatibilidad, bajo coste, biodegradabilidad, baja inmunogenicidad, además promueve la adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular (Malafaya et al. 2007; Thein-Han et al. 2009; Lien et al. 2009; Peter et al. 2010). Finalmente, la agarosa es un hidrogel biocompatible (Stokols y Tuszynski, 2004) que además permite una suficiente difusión y transporte de oxígeno, nutrientes esenciales y productos de desecho a través de su red (Sánchez-Salcedo et al. 2008).

Han surgido diferentes técnicas para obtener *scaffolds* poliméricos con un gradiente en sus propiedades, entre ellas: hilado (*spinning*) (Harley et al. 2006), centrifugación (Oh et al. 2007) y prototipado rápido (Sobral et al. 2011). Cada una de estas técnicas tiene un conjunto único de características, lo que da lugar a su desarrollo como sistema para formar *scaffolds*. Por ejemplo, el hilado puede producir canales de poro radialmente alineados, mientras que la centrifugación puede producir fibras. El prototipado rápido, por otro lado, puede producir diferentes formas de poro pero solo permite la fabricación de *scaffolds* con grandes tamaños de poro.

El objetivo de este estudio es modificar el método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas (*solvent casting in combination with particle leaching*) para producir una nueva estructura porosa interconectada para la ingeniería de tejidos en la que se puedan obtener *microscaffolds* dentro de los poros del *scaffold*. La creación de *microscaffolds* dentro de los poros permitirá aumentar el área superficial para el anclaje y señalización celular (Oh et al. 2007). El método convencional de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas que utiliza porógenos sólidos se ha modificado mediante la introducción de microesferas huecas que a su vez están rellenas con microesferas más pequeñas como material porogénico para producir

microscaffolds. También es un objetivo de este estudio producir *scaffolds* que muestren un gradiente de porosidad hacia la región central del *scaffold* y que estos *scaffolds* posean poros esféricos de distintos tamaños para posteriores estudios de la migración celular en el cultivo de tejidos con propiedades gradiente tales como el hueso, piel o cartílago.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materiales

Los polímeros naturales utilizados han sido:

Quitosano de bajo peso molecular con un grado de deacetilización entre 75-85%, (Sigma-Aldrich), gelatina (piel de bovino, tipo B, número Bloom 225, Sigma) y agarosa (tipo I-B, Sigma).

Para disolver el quitosano, se ha utilizado ácido acético glacial (97.7%, Panreac) y para disolver la gelatina y la agarosa se ha utilizado agua destilada.

Para la obtención del *template*, se han utilizado microesferas de polietil metacrilato (PEMA) macizas, huecas y microesferas huecas que a su vez estaban rellenas de microesferas más pequeñas (Lucite International, Ltd). Estas microesferas fueron utilizadas como material porogénico. En la **figura 4.1** se muestran las microesferas tal y como la suministra el proveedor. Para eliminar el *template* de PEMA se ha utilizado etanol absoluto para análisis (99.7%, Merk KGaA).

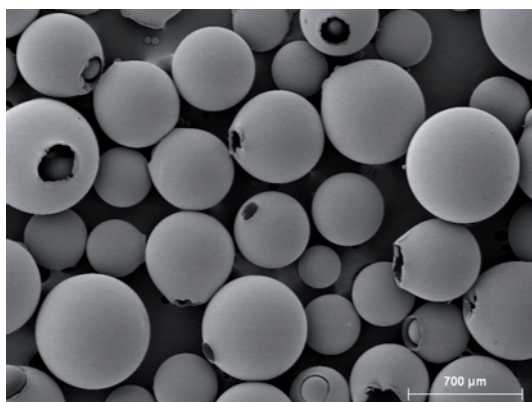


Figura 4.1: Micrografía SEM de las microesferas de PEMA polidispersas tal y como las suministra el proveedor, con un diámetro medio de aproximadamente $412 \pm 119 \mu\text{m}$ en la que se muestran algunas microesferas huecas que están rellenas de otras más pequeñas. Barra de escala $700 \mu\text{m}$.

Para realizar las medidas de porosidad se ha utilizado agua destilada.

Todos los materiales se han utilizado tal y como los suministra el proveedor.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Fabricación del *template* tridimensional

Se llenó una placa Petri de aproximadamente 7.4 cm de diámetro interno con microesferas de PEMA (macizas, huecas y huecas rellenas de microesferas más pequeñas) con un diámetro medio de $412 \pm 119 \mu\text{m}$ y la superficie superior se niveló manualmente. Seguidamente, las microesferas se sometieron a una vibración manual. Posteriormente, se colocó un vaso de precipitados lleno de bolas de acero sobre la superficie superior ejerciendo una presión de 3.2 kPa y constituyendo junto con la placa Petri llena de microesferas un molde. Posteriormente, este molde se colocó cuidadosamente en un horno (precalentado a 130°C) para sinterizarlas mediante un proceso que consistió en una isoterma de 130°C durante 65 min, obteniendo un *template*. Una vez concluido el proceso de sinterización, el *template* se sacó del molde. Se obtuvieron *templates* en forma de disco con un diámetro y altura de aproximadamente 7.4 cm y 7 mm respectivamente. Estos *templates* se cortaron en forma de paralelepípedo para posteriormente utilizarlos en la fabricación de los *scaffolds*.

4.2.2.2 Fabricación de los *scaffolds* y films de quitosano

Se disolvieron copos de quitosano en una disolución acuosa de ácido acético glacial 1 M (Ho et al. 2004) a temperatura ambiente para formar soluciones poliméricas homogéneas al 0.8, 1.5 y 2.9% en peso. Seguidamente, las soluciones resultantes se filtraron (Rinaudo, 2006). Las soluciones poliméricas se utilizaron para formar los films y los *scaffolds* de quitosano.

Para obtener los films, cada disolución se vertió en una placa Petri diferente y luego se secaron en una estufa a 60°C (Nam y Lee, 1999) durante 3 días para eliminar el disolvente. Después, los films se extrajeron de las placas Petri y se sumergieron en etanol durante 10 h a 30°C con agitación en un baño de ultrasonidos y, posteriormente, 62 h a temperatura ambiente sin agitación. El etanol se cambió diariamente. Finalmente, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente a 40°C a vacío hasta peso constante para eliminar los disolventes. Los films obtenidos se almacenaron en un desecador hasta su caracterización.

Los *scaffolds* tridimensionales de quitosano se obtuvieron mediante la modificación del método denominado colado de sólidos en combinación con el

lixiviado de partículas. Un paralelepípedo obtenido del *template* tridimensional obtenido tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.2.1, se colocó en una placa Petri. Posteriormente, la disolución de quitosano se vertió gota a gota y a temperatura ambiente sobre el *template* hasta que la placa Petri se llenó con la disolución de quitosano. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 24 h dándoles la vuelta cada 12 h para ayudar a la disolución a que penetre en la matriz permitiendo que fluya en el *template* paralelepipedico por todas las caras externas. Después, la disolución de quitosano junto con el *template* se secó en un horno a 60°C (Nam y Lee, 1999), previamente precalentado, durante 3 días para eliminar el disolvente. Una vez concluido el proceso de secado, la muestra se extrajo de la placa Petri y se cortó con una sierra para obtener la forma deseada. Seguidamente todas las superficies de la muestra se pulieron con papel de lija para facilitar la eliminación del *template*. Las muestras se sumergieron en etanol durante 10 h a 30°C con agitación en un baño de ultrasonidos y, a continuación, 62 h a temperatura ambiente sin agitación. El etanol se cambió diariamente. En esta etapa, el *template* se eliminó y se obtuvo el *scaffold*. Finalmente, los *scaffolds* se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente a 40°C a vacío hasta peso constante para eliminar los disolventes. Los *scaffolds* obtenidos se almacenaron en un desecador hasta su caracterización.

De esta forma se obtuvieron *scaffolds* con forma paralelepipedica y triangular.

El uso de etanol para disolver el *template* porogénico de PEMA respondía también a otro posible objetivo: neutralizar los restos de ácido acético glacial (Jiankang et al. 2007).

4.2.2.3 Fabricación de los *scaffolds* y films de gelatina

Los *scaffolds* de gelatina al igual que los *scaffolds* de quitosano también se obtuvieron mediante la modificación del método denominado colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas. Para ello, la gelatina se disolvió con las cantidades apropiadas de agua destilada a 50°C (Lee et al. 2003) al baño María para formar una disolución polimérica al 25% en peso. Posteriormente, un paralelepípedo obtenido del *template* (obtenido tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.2.1) se colocó en un vaso de precipitados y la disolución polimérica se infiltró por gravedad durante 2 h a 50°C al baño María para ayudar a la disolución a que penetre en la matriz permitiendo que fluya en el *template* paralelepipedico por todas las caras externas. Seguidamente, la muestra se extrajo del vaso de precipitados y se colocó en una placa Petri dejándola secar a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente en un horno a 50°C durante 4 días para eliminar el agua.

Una vez concluido el proceso de secado, la muestra se extrajo de la placa Petri se cortó con una sierra y se pulió de la misma forma que las muestras de quitosano.

Seguidamente la muestra se sumergió en etanol con agitación durante 10 h a 30°C para eliminar el *template*, obteniendo el *scaffold*. Finalmente, los *scaffolds* se dejaron secar a temperatura ambiente y después a vacío y a 40°C para eliminar el disolvente. Los *scaffolds* se almacenaron en un desecador hasta su caracterización.

Para obtener los films, se siguió el mismo procedimiento con la diferencia de que no se infiltraron las disoluciones en los *templates*.

4.2.2.4 Fabricación de los *scaffolds* y films de agarosa

Los *scaffolds* de agarosa también se obtuvieron mediante la modificación del método denominado colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas al igual que los *scaffolds* de quitosano y gelatina. Para ello, se disolvió agarosa en agua destilada a aproximadamente 95°C (Fatin-Rouge et al. 2004) y la mezcla se agitó magnéticamente, manteniendo la temperatura de la disolución, el tiempo necesario hasta la disolución completa, obteniendo disoluciones poliméricas al 2.9% en peso. Se procedió de forma similar a la obtención de los *scaffolds* de gelatina a diferencia de que la temperatura de infiltración fue de aproximadamente 95°C, el tiempo de secado en el horno y de extracción del *template* con etanol fueron de 1 día y 3 h respectivamente.

Para obtener los films, se sigue el mismo procedimiento con la diferencia de que no se infiltraron las disoluciones en los *templates*.

4.2.2.5 Porosidad

La porosidad de los *scaffolds* se ha caracterizado a dos niveles. Por un lado, se han determinado las dimensiones de los poros obtenidos y por otro lado, se ha determinado la porosidad total del *scaffold*.

Las dimensiones de los poros se han determinado mediante análisis de imagen a partir de las micrografías SEM de los *scaffolds* obtenidos. Para ello, las dimensiones de los poros del *scaffold* se midieron respecto a la barra de escala en cada micrografía SEM utilizando el programa Image Tools 2.0.

La porosidad total se ha determinado a partir de las medidas de densidad aparente del *scaffold*.

4.2.2.5.1 Inmersión de los scaffolds

La muestra seca (*scaffold*) se pesó. Posteriormente la muestra se sumergió en agua destilada y se determinó la masa de la muestra sumergida en agua. La porosidad se calculó como (Zein et al. 2002):

$$\Pi(\%) = \frac{V_a - V_s}{V_a} 100 = \frac{\frac{m_s}{\rho_s} - \frac{m_s}{\rho_m}}{\frac{m_s}{\rho_s}} 100 \quad (4.1)$$

donde Π es la porosidad, V_a y V_s son el volumen aparente y real del *scaffold* respectivamente, ρ_m es la densidad del material en bloque, m_s es la masa seca del *scaffold* y ρ_s es la densidad aparente del *scaffold*.

La densidad aparente del *scaffold* se determinó teniendo en cuenta el empuje del aire mediante la siguiente expresión (Sartorius, 1999):

$$\rho_s = (\rho_l - \rho_{aire}) \frac{m_s}{m_s - m_l} + \rho_{aire} \quad (4.2)$$

donde ρ_l es la densidad del líquido (agua destilada), $\rho_{aire} = 0.0012 \text{ g/cm}^3$ (Sartorius, 1999), m_s y m_l son la masa del *scaffold* seco en el aire y en el agua destilada respectivamente.

La densidad del material en bloque (no poroso, films) seco, se determinó pesando las muestras en el aire (m_a) y en agua destilada (m_{al}), y se aplicó la siguiente expresión:

$$\rho_m = (\rho_l - \rho_{aire}) \frac{m_a}{m_a - m_{al}} + \rho_{aire} \quad (4.3)$$

Para realizar las medidas, se utilizó una balanza Mettler Toledo AG245 con una sensibilidad de 0.00001 g y un kit de determinación de densidades para balanzas AG.

4.2.2.6 Morfología

La morfología de las muestras se ha estudiado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un equipo HITACHI S-4100. Para ello, las muestras se seccionaron en varios planos y se montaron sobre portamuestras. Posteriormente, las superficies y secciones transversales de las muestras se recubrieron con una capa de Au/Pd con un sputter (Polaron, Modelo SC7640).

4.3 Resultados y discusión

Como se ha comentado anteriormente, el principal objetivo de este trabajo era desarrollar técnicas para producir un nuevo diseño de *scaffold* 3D poroso para la ingeniería de tejidos. Un segundo objetivo era obtener *scaffolds* con gradientes de porosidad.

4.3.1 Desarrollo del método

Hasta la fecha, normalmente los *scaffolds* de polímeros naturales se fabrican mediante liofilización (*freeze-drying*) (Lee et al. 2004; Jiankang et al. 2007) porque se utiliza el agua como disolvente para el polímero (Park et al. 2002). Sin embargo, si la temperatura no es lo bastante baja, la matriz no será lo suficientemente rígida para soportar la tensión interfacial provocada por la sublimación del disolvente sin colapsar (Ho et al. 2004). Por tanto, se forma una densa capa, que afecta en gran medida la eficacia de la difusión en el *scaffold* (Yeong et al. 2000). Además el tamaño de poro que se obtiene no es muy grande. Por otro lado, el quitosano tiene una temperatura de transición vítrea alta (aproximadamente 203°C) (Sakurai et al. 2000) y se descompone a 270°C antes de fundir (Sarasam et al. 2006, Song et al. 2008). Por lo tanto, no se podrá utilizar en aquellas técnicas que necesitan trabajar por encima de su punto de fusión, tales como modelado por deposición en fundido (FDM) (Yeong et al. 2000), hilado en estado fundido (*melt spinning*) (Lim et al. 2008) o fusión en molde (*melt molding*) (Leong et al. 2003).

El método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas así como sus modificaciones ya se han descrito utilizando sal, azúcar y esferas de parafina y gelatina como sistemas porogénicos (Ma y Choi, 2001). Este método consiste en verter en un molde la disolución polimérica junto con partículas solubles. Después de la evaporación del disolvente, las partículas son lixiviadas utilizando el disolvente adecuado de las partículas para formar los poros del *scaffold* (Liu et al. 2007). El tamaño de los poros, la porosidad y la interconectividad se pueden controlar por el tamaño del porógeno, la relación porógeno/polímero y un proceso de tratamiento térmico, respectivamente (Ma y Choi, 2001). Sin embargo, esta técnica está limitada a diseños de poro tales como formas cúbicas o esféricas sin microestructuras dentro de los poros del *scaffold* ya que utilizan porógenos macizos. Además, el uso de disolventes adicionales, como en el caso de las esferas de parafina (hexano y ciclohexano) (Ma y Choi, 2001), para lixiviar el porógeno puede ser perjudicial para las células si no se eliminan bien (Vaquette et al. 2008).

En este trabajo, se ha desarrollado una modificación del método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas con el fin de obtener

tanto un *scaffold* de quitosano con gradiente de porosidad y una nueva estructura porosa de quitosano, gelatina y agarosa que consiste en la formación de *microscaffolds* dentro de algunos de los poros del *scaffold*. Para ello, se utilizó como material porogénico algunas microesferas huecas de PEMA que a su vez están rellenas de microesferas más pequeñas de PEMA. Una micrografía SEM representativa de la morfología y la distribución del tamaño de microesferas de PEMA se muestra en la **figura 4.1**. Además, en la misma figura se pueden observar algunas microesferas rellenas. El diámetro medio de las microesferas a partir de diferentes micrografías SEM es de $412 \pm 119 \mu\text{m}$.

Con el procedimiento descrito en el apartado 4.2.2.1 se pueden obtener ensamblajes de microesferas de PEMA que forman un *template* 3D, con el objeto de obtener *scaffolds* que sean la estructura inversa de estos *templates*. En la **figura 4.2** se puede observar el *template* obtenido.

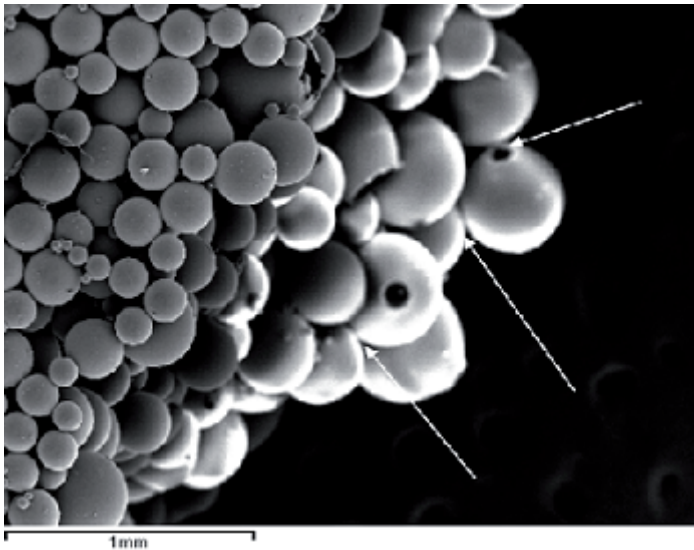


Figura 4.2: Micrografía SEM del *template* de PEMA obtenido donde se señalan con flechas blancas algunos cuellos de interconexión. Barra de escala 1 mm.

El tratamiento de sinterización previamente descrito en el apartado 4.2.2.1 produjo una unión firme entre las microesferas, obteniéndose un *template* 3D estable donde las microesferas que lo constituyen están conectadas formando uniones efectivas que han sido producidas por el proceso de sinterización tal y como se puede ver en la **figura 4.2**, en la que se señalan algunos de los cuellos de interconexión mediante flechas blancas. La temperatura se fijó por encima de la temperatura de transición vítrea del PEMA (335 K) (Meschede et al. 2008) con el fin de promover la formación de cuellos de interconexión entre las

microesferas. Estos cuellos de interconexión quizás se formaron principalmente por el mecanismo de flujo viscoso (Hornsby y Maxwell, 1992).

Por otra parte, también se puede comprobar que se han producido estos cuellos de interconexión entre las microesferas si pulimos el *template*, tal y como se puede apreciar en la **figura 4.3** donde se señalan algunos de los cuellos de interconexión entre las microesferas mediante flechas blancas. Además, cabe señalar que la superficie externa de una microesfera, que está dentro de otra microesfera más grande, está unida a la superficie interior de la microesfera más grande (microesfera número 1). Se aplicó una pequeña presión durante el tratamiento térmico con el fin de disminuir la posible distorsión geometría que pudiese producirse.

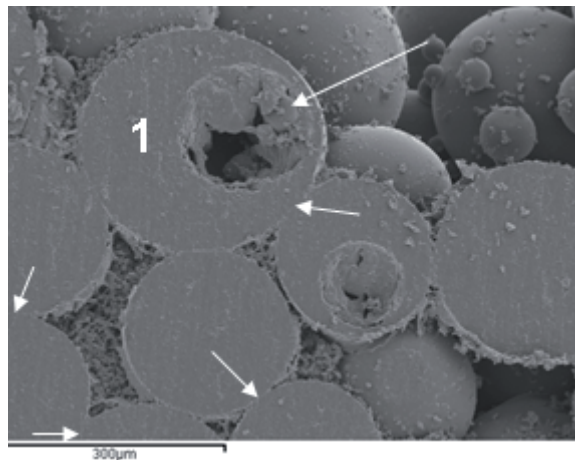


Figura 4.3: Micrografía SEM del *template* de PEMA en el que se muestra mediante flechas blancas algunos cuellos de interconexión entre las microesferas. El número 1 corresponde a una microesfera hueca rellena al menos con una microesfera que también está sinterizada con la microesfera que la contiene (microesfera 1). Barra de escala 300 μm .

La temperatura y presión que se aplicó, no mostraron una deformación significativa de las microesferas tal y como puede observarse en las **figuras 4.2-4.4**.

En la **figura 4.4** se muestra una visión más general del *template* después del tratamiento descrito en el apartado 4.2.2.1. De nuevo, observamos en la parte derecha e inferior izquierda de la imagen (las zonas pulidas del *template*) los distintos tipos de microesferas utilizadas, y en el resto de la imagen (zona no pulida), el *template* tal y como se utiliza para realizar la infiltración de quitosano, gelatina y agarosa.

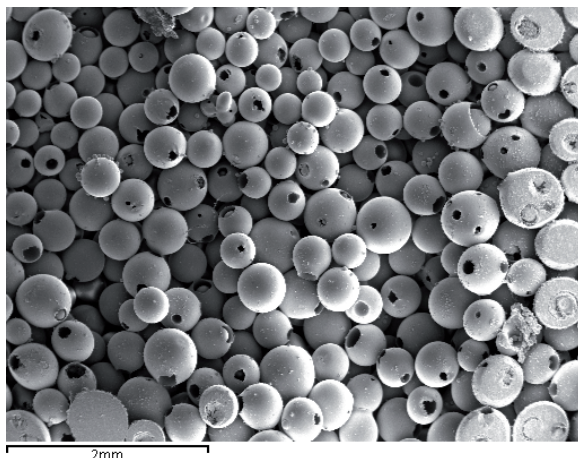


Figura 4.4: Micrografía SEM del *template* de PEMA en la que se muestran los distintos tipos de microesferas utilizadas. Barra de escala 2 mm.

Los *templates* obtenidos fueron lo suficientemente robustos para utilizarlos directamente debido a la formación de cuellos de interconexión firmes. Antes del programa de sinterización, las microesferas se sometieron a una vibración manual para que la densidad de empaquetamiento pudiese aumentar (Shi y Zhang, 2008).

El proceso descrito anteriormente dio lugar a un *template* con poros interconectados (**Figuras 4.2 a 4.4**) que puede permitir que las soluciones poliméricas penetren en éstos. Como resultado, cuando el *template* es eliminado, después de seguir los procedimientos descritos en los apartados 4.2.2.2, 4.2.2.3 y 4.2.2.4 para el quitosano, gelatina y agarosa respectivamente, el *scaffold* obtenido es la estructura inversa del *template* con una estructura interconectada de poros abiertos. Una consecuencia de la morfología del *template* obtenido es que obtenemos *scaffolds* con una morfología de poro esférica con interconexiones controladas que resultan de los cuellos de interconexión entre microesferas producidas por el proceso de sinterización térmica.

Por otra parte, las soluciones concentradas de polímeros forman líquidos viscosos, lo que puede dificultar la penetración de la disolución polimérica a través de todo el *template* dando lugar a una capa superficial de polímero. Girar el *template* puede ayudar a obtener una mejor infiltración de la muestra.

Además, la viscosidad del quitosano en soluciones de ácido acético disminuye significativamente al aumentar la temperatura (El-hefian et al. 2010). Por tanto, secar el *template* junto con la disolución polimérica de quitosano a 60°C podría mejorar la calidad de la infiltración ya que podría aumentar la

cantidad de polímero introducido en el *template*. La **figura 4.5** muestra una vista de la sección transversal del *scaffold* preparado con la disolución de quitosano más viscosa utilizada (2.9% en peso), donde se puede observar que al menos hasta aproximadamente 2 mm la infiltración con las condiciones establecidas es homogénea. Esta imagen también muestra su superficie exterior en la parte izquierda, donde de nuevo, se observa una infiltración homogénea.

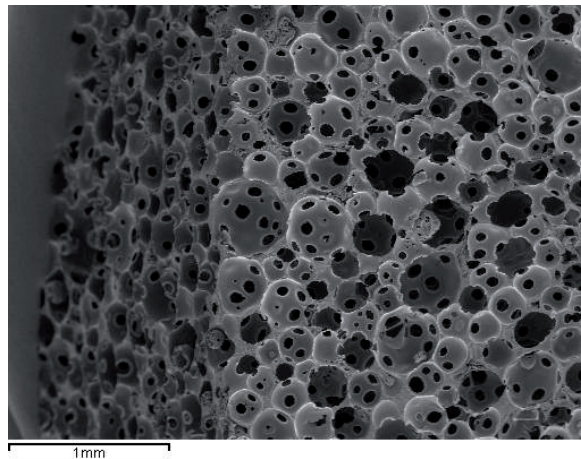


Figura 4.5: Micrografía SEM de la sección transversal del *scaffold* de quitosano al 2.9 % en peso. La superficie exterior de la muestra se puede ver a la izquierda de la imagen. Barra de escala 1 mm.

Las mezclas agua-gelatina tienen la propiedad de experimentar transiciones de fase sol-gel termo-reversibles (Briefer y Cohen, 1927; Traoré et al. 2000). La temperatura en que las soluciones de gelatina están en la fase sol depende de su concentración. Según Bohidar y Jena (1993) y Parker y Povey (2012), una concentración de gelatina del 25% en peso se encuentra en la fase sol a temperaturas por encima de aproximadamente 33°C. Por otro lado, la viscosidad aparente de las soluciones de gelatina disminuye con el aumento de la temperatura (Briefer y Cohen, 1927). Por tanto, la infiltración de la gelatina en el *template* en caliente (50°C) puede ayudar a que la disolución penetre más uniformemente en el *template*.

Por otra parte, Shōji (1919), estudió la influencia de distintos tiempos de calentamiento en la fase sol de una disolución de gelatina en la velocidad de gelación. Los resultados revelaron que cuanto mayor es el tiempo de precalentamiento de la fase sol, menor es la velocidad de gelación inicial. Por otra parte, según Manning (1924), si la fase sol es calentada durante un tiempo a temperaturas altas antes de colocarla en un termostato a 35°C, la rápida caída de la viscosidad se elimina. De hecho, en un estudio en el que calentó una

disolución de gelatina a 50°C durante 1 h, los resultados mostraron que la viscosidad de la gelatina, al reducir la temperatura a 35°C, permaneció prácticamente constante durante aproximadamente 3 o 4 h. Por tanto, calentar la disolución de gelatina durante 2 h a 50°C al mismo tiempo que se infiltra puede aumentar el tiempo de gelación y de esta forma mejorar la calidad de la infiltración.

La etapa de secado en un horno a 50°C además de eliminar el agua también podría mejorar la calidad de infiltración, ya que según Briefer y Cohen (1927) la viscosidad de la gelatina se puede restaurar cuando se vuelve a calentar la fase gel. De esta forma, al calentar de nuevo a 50°C, la viscosidad de la disolución puede disminuir y por tanto se facilitaría que penetrara más cantidad de gelatina en el *template*.

La agarosa, al igual que la gelatina, forma geles termo-reversibles cuando se disuelven en agua (Fernández et al. 2007). La disolución completa de los geles de agarosa se produce a temperaturas mayores de 90°C (Millán et al. 2002) y la temperatura de gelación varía en función de la concentración de agarosa (Fernández et al. 2007). De hecho, estos autores estudiaron el efecto de la concentración de agarosa sobre la temperatura y los tiempos de gelación. Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de agarosa la temperatura de gelación aumentaba y los tiempos de gelación disminuían (Fernández et al. 2007). Por otra parte, Millán et al. (2002), estudiaron la evolución de la viscosidad con la temperatura para diferentes concentraciones de agarosa. Los resultados mostraron por una parte, que la viscosidad de la agarosa aumenta tanto al aumentar la concentración como al disminuir la temperatura de las disoluciones de agarosa previamente calentadas a temperaturas mayores de 85°C. Por tanto, la infiltración de la agarosa en el *template* en caliente (95°C) puede ayudar a que la disolución penetre más uniformemente en el *template*.

La utilización de etanol para eliminar el *template* es una ventaja, ya que el etanol se utiliza para la esterilización de tejidos (Pruss et al. 2001; Haimi et al. 2008). Además, el lavado con una solución etanólica puede promover la deposición de quitosano y de ese modo estabilizar el *scaffold* (Hsieh et al. 2007) así como neutralizar los restos de ácido acético glacial (Jiankang et al. 2007). Por otro lado, la utilización de microesferas huecas puede tener ventajas añadidas tales como facilitar la eliminación del porógeno debido a la menor cantidad de material porogénico que tiene que ser eliminado.

4.3.2 Morfología de los scaffolds de quitosano

El quitosano se ha elegido para este estudio por sus favorables propiedades químicas y biológicas. Está aprobado para aplicaciones alimentarias en Japón,

Italia y Finlandia y además ha sido aprobado por la FDA para su uso en apósitos para heridas. De hecho, un producto comercialmente disponible de quitosano es el vendaje HemCon® de HemCon Medical Technologies Inc. en USA. El quitosano se ha propuesto como biomaterial en diversas aplicaciones de la ingeniería de tejidos tales como hueso, cartílago, nervio e hígado (Dash et al. 2011).

A partir de las micrografías mostradas en las **figuras 4.5 a 4.10** se puede ver claramente que se pueden obtener satisfactoriamente *scaffolds* de quitosano mediante el procedimiento descrito en la parte experimental (4.2.2.1 y 4.2.2.2).

Se obtuvieron *scaffolds* con diferentes geometrías cortando el *template* de PEMA junto con el quitosano antes de la lixiviación del PEMA. Las muestras fueron lo suficientemente robustas como para mantener su morfología durante el corte. La **figura 4.6** muestra algunas de las diferentes geometrías que se pueden obtener.

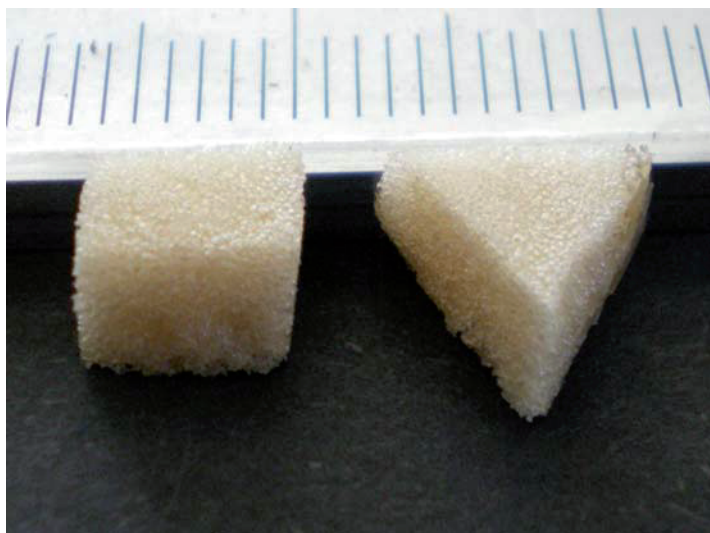


Figura 4.6: Fotografía digital de los *scaffolds* de quitosano con diferentes formas geométricas obtenidos mediante la modificación del método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas.

Los *scaffolds* de quitosano al 0.8, 1.5 y 2.9% en peso muestran una microestructura similar, a juzgar por las micrografías SEM examinadas (**Figuras 4.7 y 4.8**). La **figura 4.7** muestra las micrografías asociadas con la superficie exterior (**Figura 4.7a**), la sección transversal y la superficie exterior (**Figura 4.7b**) y la sección transversal cerca de la superficie exterior (**Figura 4.7c**) de

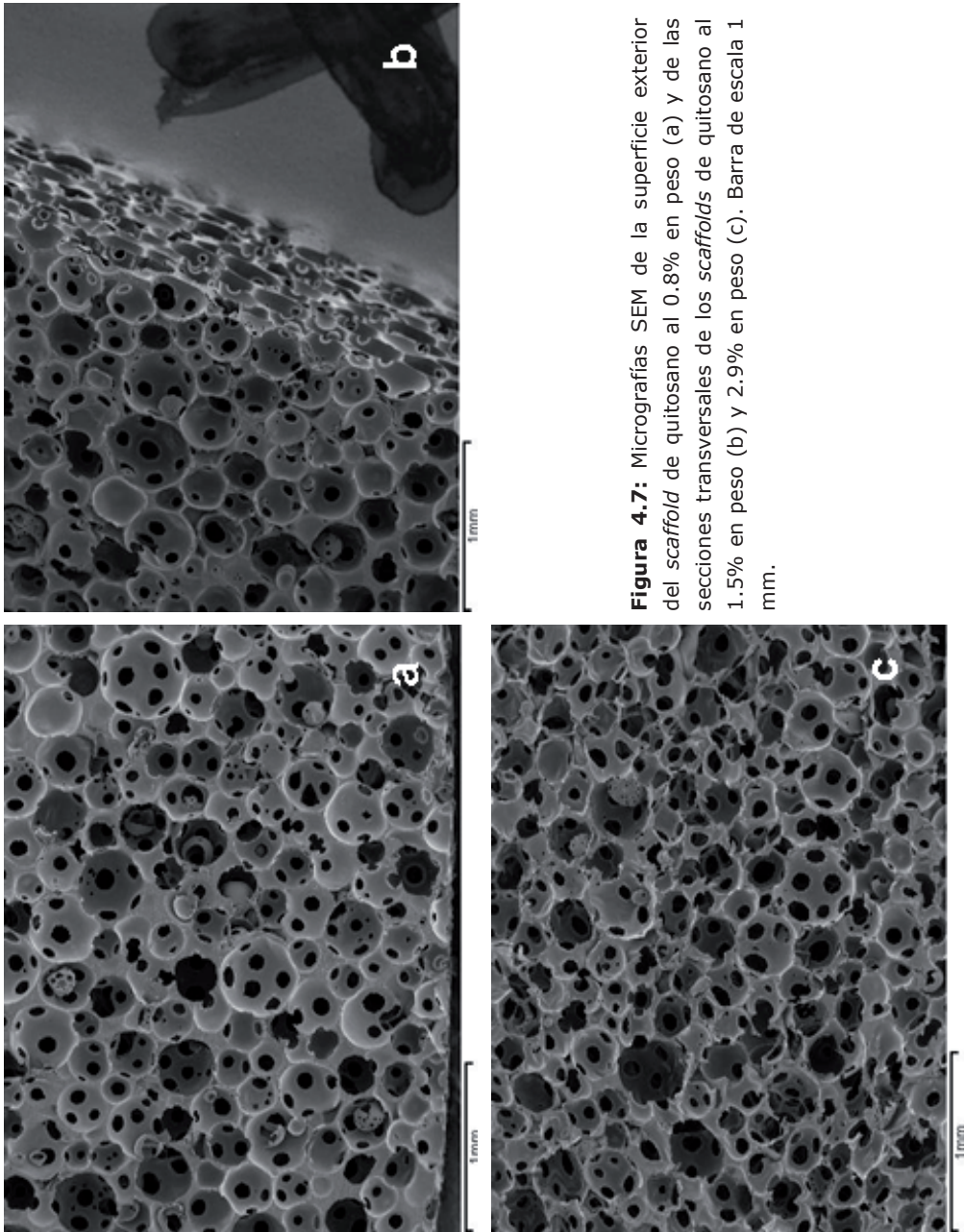


Figura 4.7: Micrografías SEM de la superficie exterior del scaffold de quitosano al 0.8% en peso (a) y de las secciones transversales de los scaffolds de quitosano al 1.5% en peso (b) y 2.9% en peso (c). Barra de escala 1 mm.

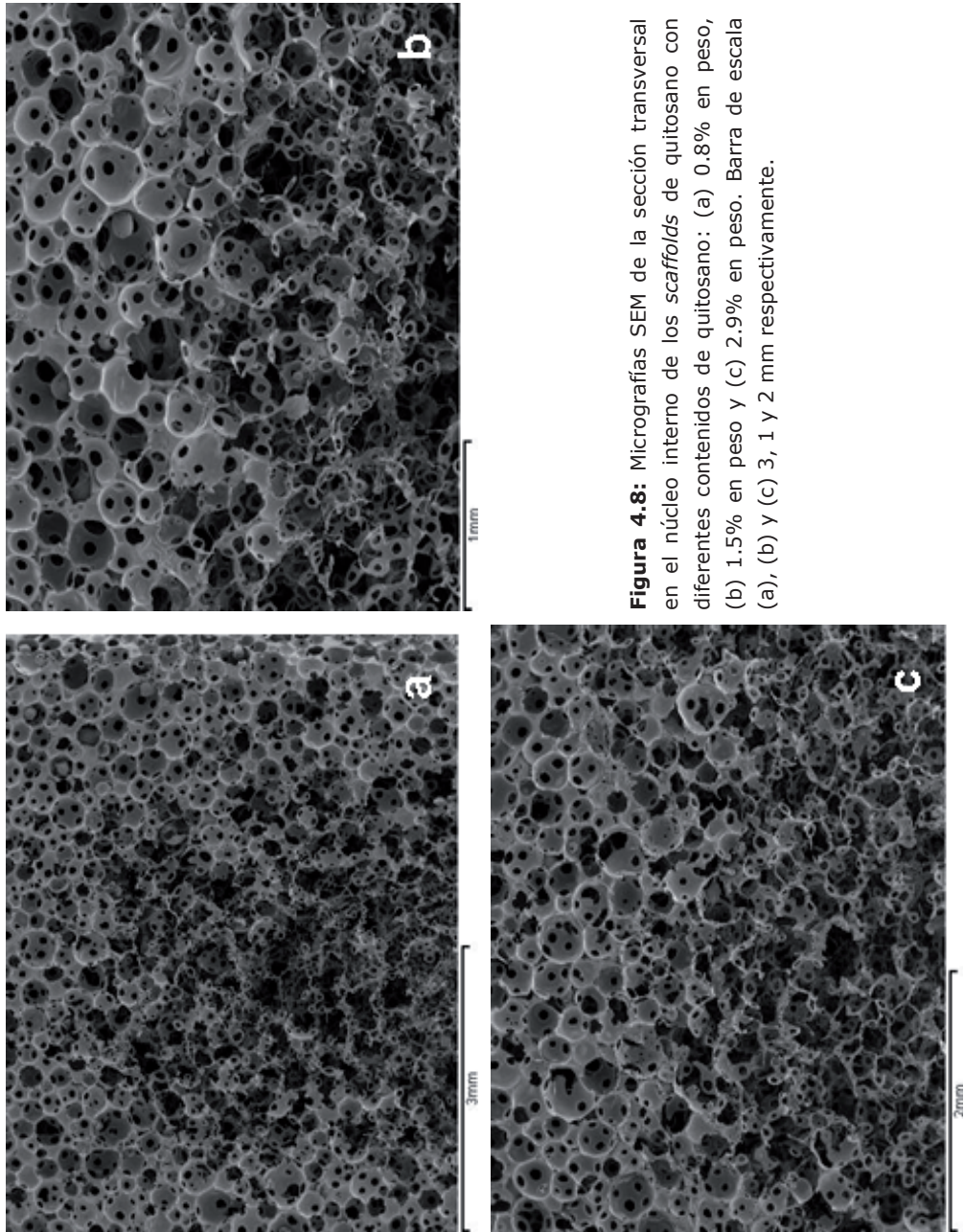


Figura 4.8: Micrografías SEM de la sección transversal en el núcleo interno de los *scaffolds* de quitosano con diferentes contenidos de quitosano: (a) 0.8% en peso, (b) 1.5% en peso y (c) 2.9% en peso. Barra de escala (a), (b) y (c) 3, 1 y 2 mm respectivamente.

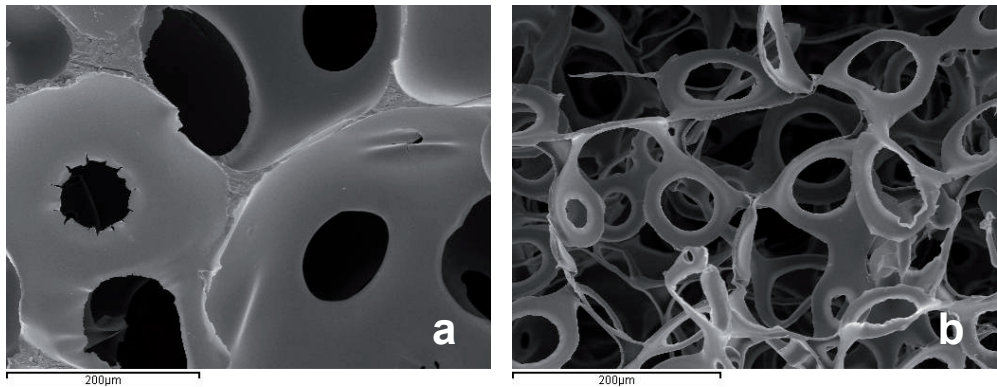


Figura 4.9: Detalle de la morfología de los poros y de las gargantas de interconexión en la región exterior (a) y en el núcleo interno (b) del *scaffold* de quitosano al 0.8% en peso. Barra de escala 200 μm .

los *scaffolds* de quitosano al 0.8, 1.5 y 2.9% en peso respectivamente. Estas figuras también muestran que los *scaffolds* poseen una microestructura abierta y bien interconectada con una morfología de poros esféricos determinada por las microesferas de PEMA. La distribución del tamaño de poros es muy amplia, desde aproximadamente 180 a 560 μm y el diámetro medio de poro es aproximadamente el mismo en todos los *scaffolds* independientemente de la concentración de quitosano (**Tabla 4.1**). Es interesante señalar que el diámetro medio de poro obtenido es menor que el diámetro de las microesferas de PEMA utilizadas como material porogénico. Esto podría ser debido a las secciones de los poros medidos, donde el corte no ha sido necesariamente en el plano central de todos los poros, mientras que las medidas de las microesferas de PEMA son más fiables, ya que toda la superficie externa de las microesferas se puede ver. Además, los poros obtenidos son más grandes que los que se obtienen por el método convencional de liofilización (*freeze-drying*) (50-220 μm) (Park et al. 2002; Ho et al. 2004; Jiankang et al. 2007; Davidenko et al. 2010; Kane y Roeder, 2011) debido a que las microesferas de PEMA son más grandes que los cristales de hielo producidos durante la liofilización (Lee et al. 2004). Por otra parte, en las **figuras 4.5, 4.7 y 4.9a** también se puede observar que los poros están conectados por gargantas redondas con una distribución de tamaño también amplia desde aproximadamente 15 a 160 μm y el diámetro medio de garganta de interconexión es prácticamente el mismo en todos los *scaffolds* independientemente de la concentración de quitosano (**Tabla 4.1**). Además, los *scaffolds* presentan un alto grado de interconectividad donde varias gargantas de interconexión se pueden ver en cada poro. Se han encontrado hasta 9 gargantas de interconexión en una cavidad (**Figura 4.7a**). Sin embargo, el

número de gargantas de interconexión en una cavidad puede variar ya que el número de gargantas de interconexión medidas no son de todo el poro sino de una sección de éste. Además de las gargantas de interconexión obtenidas en los puntos de contacto de las esferas empaquetadas debido al programa de sinterización descrito anteriormente, pequeños poros generados durante la evaporación del disolvente pueden contribuir a formar más gargantas de interconexión (Zhang et al. 2006).

En cambio, una sección transversal tomada en la región central de los *scaffolds* revela dos regiones principales con diferente estructura de poro, así como un gradiente de la microestructura definido a lo largo de la dirección longitudinal y transversal (**Figura 4.8a**). Se puede observar que la morfología de los poros del *scaffold* cambia notablemente desde sus superficies externas hacia su núcleo interior. En las regiones superiores/inferiores y laterales del *scaffold* se obtuvo una capa densa con una morfología de poro esférica bien definida, con gargantas de interconexión redondeadas y con paredes de poro gruesas. Por el contrario, en el núcleo interno de la muestra la forma esférica de las microsferas de PEMA no se conserva. La **figura 4.9** muestra con un mayor aumento la morfología de los poros en la región exterior (**Figura 4.9a**) y en el núcleo interior (**Figura. 4.9b**) del *scaffold* de quitosano al 0.8% en peso. Se puede ver claramente que el grado de interconectividad en el núcleo interior es mayor. También se encontró que entre la región interior central y la región exterior, la disolución polimérica cubrió completamente las microsferas de PEMA sinterizadas; sin embargo, el espacio hueco entre ellas no se llenó dando lugar a paredes de poro más delgadas tal y como puede verse en una micrografía SEM representativa de la sección transversal del *scaffold* de quitosano al 2.9% en peso situada entre la región exterior y la región interior del *scaffold* (**Figura 4.10**). Estos resultados sugieren que se produce un cambio gradual en la morfología del poro y de la pared del poro en función de la distancia desde las regiones exteriores del *scaffold*. Este gradiente en la microestructura del *scaffold* puede ser el resultado de que la disolución polimérica sólo cubrió parte de las microsferas de PEMA localizadas en la región central interior del *template* y gradualmente las cubrió más formando un recubrimiento más continuo hacia las regiones exteriores del *template* hasta llenar el espacio vacío entre ellas en las regiones más exteriores formando una densa capa; probablemente debido a la alta viscosidad de las soluciones poliméricas utilizadas para la preparación de los *scaffolds* que dio lugar a una diferente densificación del material a través del *scaffold* y también porque la disolución de quitosano se vertió gota a gota sobre el *template* paralelepípedo hasta que la placa Petri, que es más grande que el *template* paralelepípedo, se llenó con la disolución de quitosano permitiendo la difusión del polímero por las caras laterales. Estos resultados se pueden utilizar para diseñar *scaffolds* con un gradiente de porosidad en su estructura.

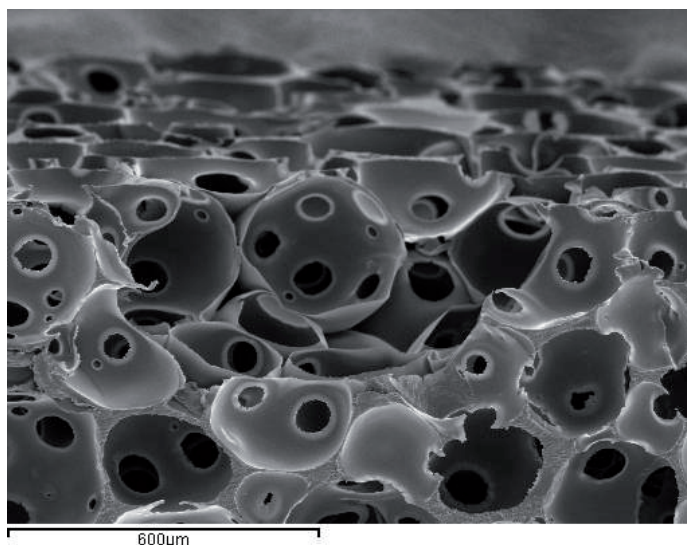


Figura 4.10: Micrografía SEM representativa de la sección transversal del *scaffold* de quitosano al 2.9% en peso mostrando el gradiente de densificación. Barra de escala 600 μm .

Un comportamiento similar se observó cuando los *scaffolds* se prepararon con soluciones poliméricas de quitosano al 1.5 y 2.9% en peso.

Por otra parte, no se observaron restos de porógeno, ni delaminación, ni agrietamiento a partir de la inspección visual de las micrografías SEM.

Finalmente, se obtuvieron *microscaffolds* de quitosano con estructuras de poro interconectadas dentro de algunos de los poros del *scaffold* de quitosano tal y como se ilustra en las **figuras 4.5** y **4.7** mediante la utilización de microesferas huecas de PEMA que están rellenas de microesferas más pequeñas de PEMA como material porogénico. Estas figuras también muestran que los *microscaffolds* están unidos a los poros del *scaffold*. Un mayor aumento de las micrografías SEM de algunos *microscaffolds* revela *microscaffolds* con una estructura abierta y bien interconectada (**Figura 4.11**). Se encontraron dos morfologías principales de poro: *microscaffolds* con múltiples tamaños de poro esféricos caracterizados por poros esféricos contenidos dentro de otros (**Figura 4.11a** y **4.11b**) y *microscaffolds* con un poro esférico aislado con múltiples gargantas de interconexión (**Figuras 4.11c** y **4.11d**). En las dos morfologías los poros son grandes y con un alto grado de interconexión. Estos *microscaffolds* pueden haber resultado del hecho de que más de una microesfera estuviese dentro de una microesfera más grande y/o que una microesfera estuviese dentro de otra, que a su vez, estuviera dentro de otra. Además, vale la pena

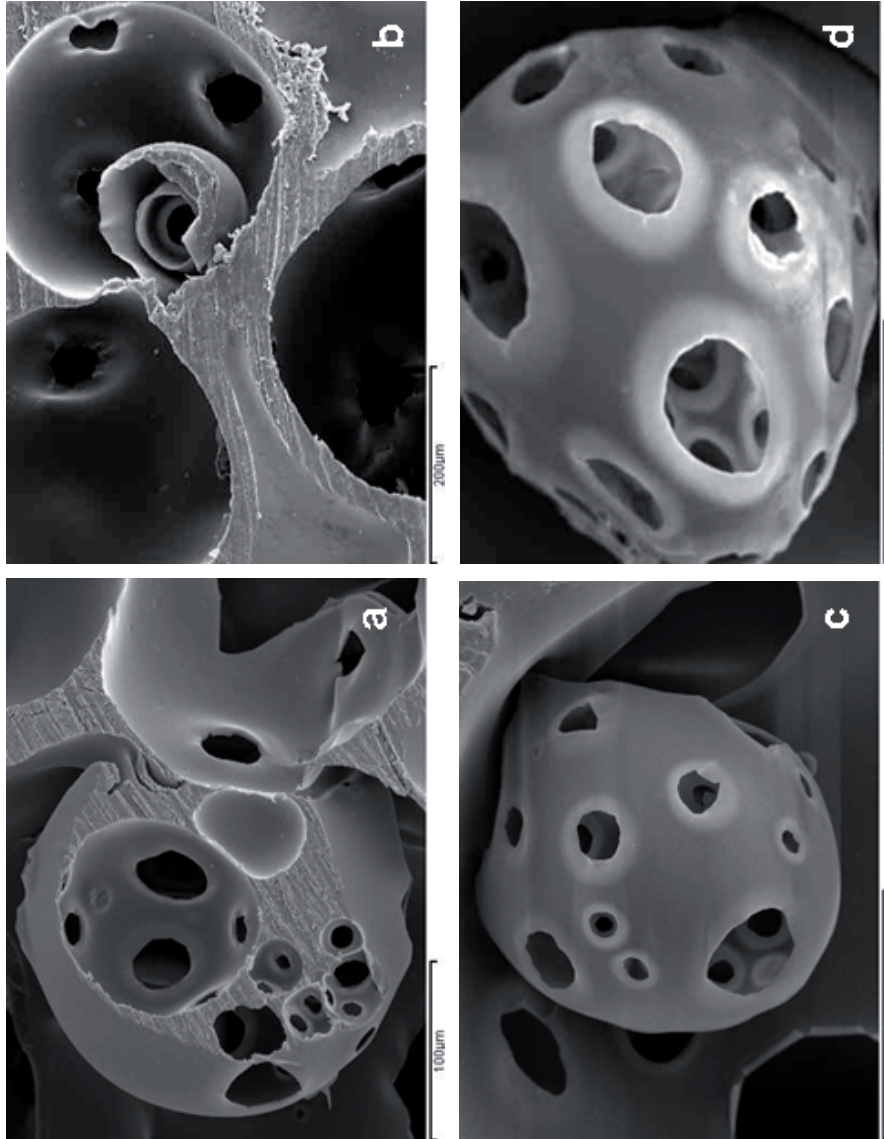


Figura 4.1.1: Micrografías SEM de los *microscaffolds* de quitosano al 0.8% en peso (a), 1.5% en peso (b), 2.9 % en peso (c) y 0.8% en peso (d). Barra de escala (a), (b), (c) y (d) 100, 200, 80 y 60 µm respectivamente.

destacar que la disolución polimérica no llenó completamente el espacio vacío de las microesferas huecas sino que recubrió las microesferas como puede verse claramente en la **figura 4.11**. Estos *microscaffolds* se encontraron en todas las soluciones poliméricas utilizadas (**Figuras 4.5, 4.7, 4.8 y 4.11**).

Por tanto, los poros de los *scaffolds* de quitosano se formaron por las microesferas de PEMA más grandes mientras que los *microscaffolds* dentro de los poros se formaron por las microesferas que están dentro de las microesferas más grandes. No se observaron ni restos de porógeno ni poros cerrados a partir de las micrografías SEM examinadas. Esto puede explicarse por el hecho de que todas las microesferas están unidas formando un ensamblaje tridimensional.

Estos resultados sugieren que pueden obtenerse *microscaffolds* con poros esféricos bien interconectados utilizando microesferas rellenas y soluciones poliméricas con altas concentraciones. La utilización de microesferas rellenas como material porogénico permitió la sustitución de porógenos macizos, que se utilizan en el método convencional de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas, por porógenos rellenos que permiten obtener una nueva estructura.

La microestructura de un *scaffold* juega un papel importante en la proliferación, migración y función celular, que son factores clave en la ingeniería de tejidos (Hsieh et al. 2007). Teniendo en cuenta que la interconectividad de los poros y el tamaño de estas interconexiones, que están relacionadas con la permeabilidad del *scaffold*, afectan el intercambio de oxígeno, nutrientes, productos metabólicos de desecho y a la señalización molecular que son esenciales para la migración y proliferación celular (Ho y Hutmacher, 2006), los *scaffolds* de quitosano obtenidos pueden tener aplicaciones en la ingeniería de tejidos, probablemente en el cultivo de tejidos con gradiente de propiedades tales como hueso, piel o cartílago.

Por otro lado, algunos investigadores han mostrado que la viabilidad celular aumenta linealmente con el área superficial específica del *scaffold* (O'Brien et al. 2005); el aumento de área superficial en el *microscaffold* debería, de forma similar, aumentar la densidad de células viables. Por tanto, este nuevo tipo de *scaffold* de quitosano, en el que *microscaffolds* pueden obtenerse dentro de los poros del *scaffold*, podría servir como una herramienta para estudios básicos de las interacciones entre las células o tejidos y el *scaffold* con el fin de desarrollar *scaffolds* óptimos para la ingeniería de tejidos.

4.3.3 Morfología de los scaffolds de gelatina

La gelatina se ha elegido para este estudio tanto por sus propiedades favorables (citadas en el apartado 4.1) como porque está aprobada por la FDA

para diversos usos en medicina (Shi et al. 2011). De hecho, hay diferentes soportes para el suministro controlado de medicamentos basados en gelatina que están disponibles comercialmente y que se están aplicando en la ingeniería de tejidos. Los más utilizados son Gelfoam® de Pfizer que se utiliza como agente hemostático; Gelfim® de Pfizer que se utiliza como implante en neurocirugía así como en cirugía torácica y ocular; Surgifoam® de Ethican Inc. también se utiliza como hemostático y CultiSpher-G® y CultiSpher-S® de Percell Biolytica AB que se utilizan como microsoportes para cultivo celular (Malafaya et al. 2007). Además, la gelatina se utiliza en la industria alimentaria como agente clarificante, estabilizador y material de recubrimiento de protección (Rohanizadeh et al. 2008). La gelatina se ha propuesto como biomaterial en diversas aplicaciones de la ingeniería de tejidos tales como hueso, cartílago y piel (Malafaya et al. 2007; Lien et al. 2009).

Mediante el procedimiento descrito en la parte experimental (4.2.2.1 y 4.2.2.3) es posible obtener *scaffolds* de gelatina satisfactoriamente tal y como se puede ver en las imágenes mostradas en las **figuras 4.12 a 4.15**.

Al igual que los *scaffolds* de quitosano, se obtuvieron *scaffolds* de gelatina con diferentes geometrías cortando el *template* de PEMA junto con la gelatina antes de la lixiviación del PEMA. Las muestras fueron lo suficientemente robustas como para mantener su morfología durante el corte. La **figura 4.12** muestra algunas de las diferentes geometrías que se pueden obtener.

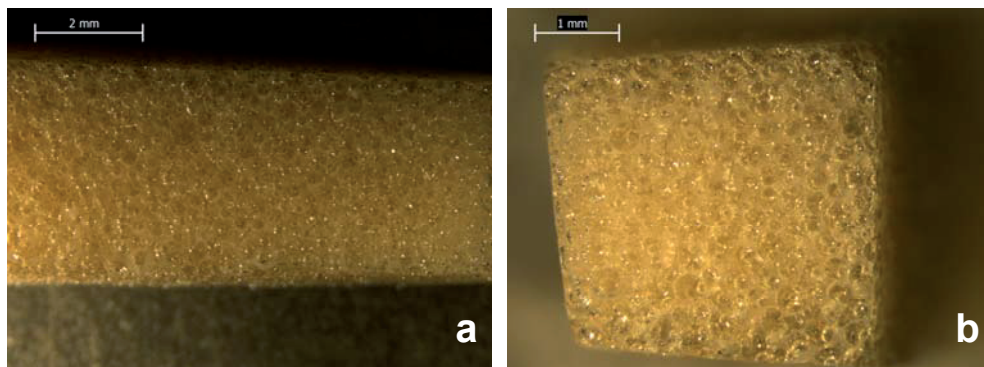


Figura 4.12: Imágenes estereoscópicas de los *scaffolds* de gelatina al 25% en peso obtenidos mediante la modificación del método de colado de sólidos en combinación con el lixiviado de partículas con diferentes formas geométricas, paralelepípeda (a) y cúbica (b). Barra de escala (a) y (b) 2 y 1 mm respectivamente.

Los *scaffolds* de gelatina poseen una microestructura abierta y bien interconectada con una morfología de poros esféricos determinada por las

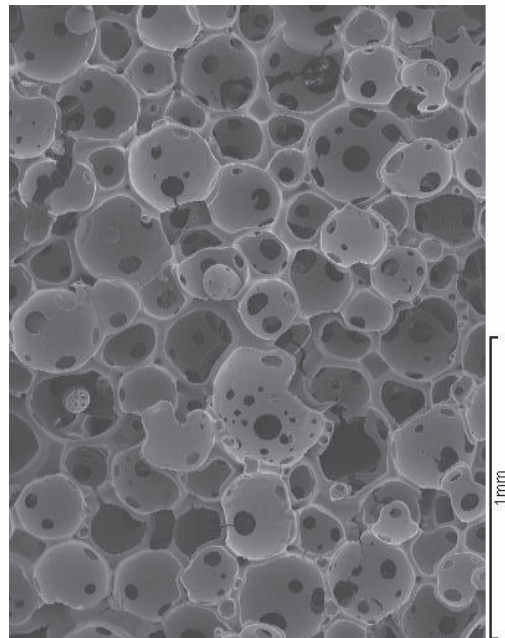
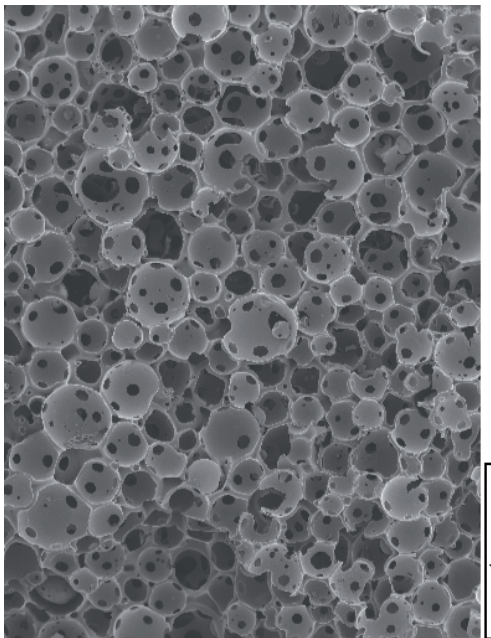
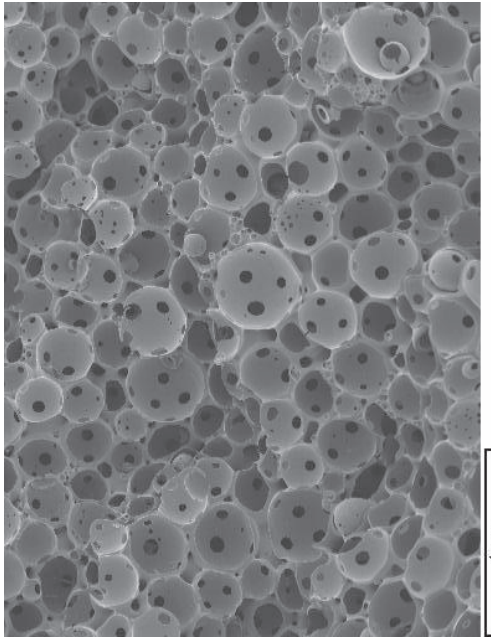


Figura 4.13: Micrografías SEM de los scaffolds de gelatina al 25% en peso en las que se muestra la estructura interna. Barra de escala 1 mm.

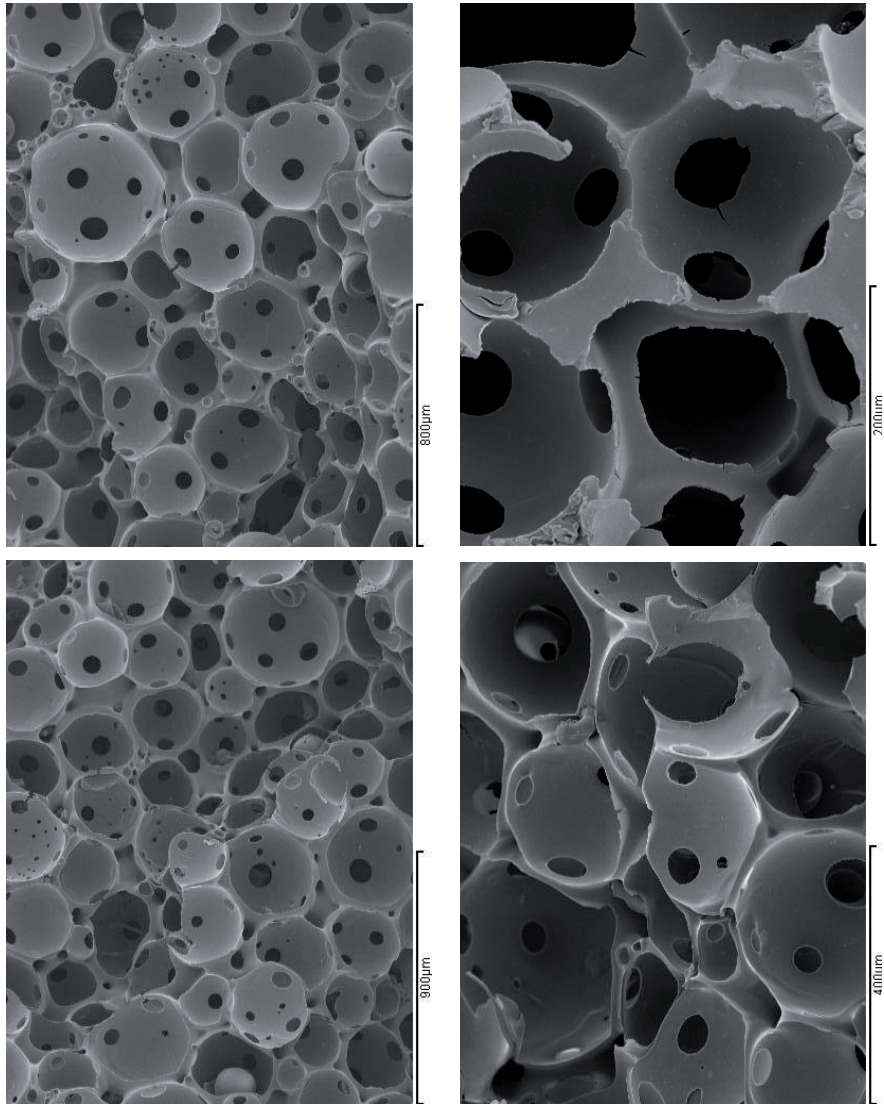


Figura 4.14: Micrografías SEM en las que se muestra en detalle la morfología esférica de los poros y las gargantas de interconexión del *scaffold* de gelatina al 25% en peso. Barra de escala de izquierda a derecha y de arriba abajo, 900, 800, 400 y 200 µm.

microesferas de PEMA. La distribución del tamaño de poros es muy amplia, desde aproximadamente 140 a 470 μm y el diámetro medio de poro es $315 \pm 70 \mu\text{m}$. Es interesante señalar que el diámetro medio de poro obtenido es menor, al igual que en los *scaffolds* de quitosano, que el diámetro de las microesferas de PEMA utilizadas como material porogénico. Esto podría ser debido a las secciones de los poros medidos, donde el corte no ha sido necesariamente en el plano central de todos los poros, mientras que las medidas de las microesferas de PEMA son más fiables ya que toda la superficie externa de las microesferas se puede ver. Además, al igual que en los *scaffolds* de quitosano, los poros obtenidos son más grandes que los que se obtienen por el método convencional de liofilización (*freeze-drying*) (50-220 μm) (Park et al. 2002; Ho et al. 2004; Jiankang et al. 2007; Davidenko et al. 2010; Wu et al. 2010; Kane y Roeder, 2011) tal y como se explicó en el apartado 4.3.2. Por otra parte, en la **figura 4.14** también se puede observar que los poros están conectados por gargantas redondas con una distribución de tamaño también amplia desde aproximadamente 16 a 152 μm y el diámetro medio de garganta de interconexión es $80 \pm 25 \mu\text{m}$. Además, los *scaffolds* presentan un alto grado de interconectividad donde varias gargantas de interconexión se pueden ver en cada poro. Se han encontrado hasta 14 gargantas de interconexión en una cavidad (**Figura 4.14**). Al igual que en los *scaffolds* de quitosano, el número de gargantas de interconexión en una cavidad puede variar ya que el número de gargantas de interconexión medidas no son de todo el poro sino de una sección de éste. Además de las gargantas de interconexión obtenidas en los puntos de contacto de las esferas empaquetadas debido al programa de sinterización descrito anteriormente, pequeños poros generados durante la evaporación del disolvente pueden contribuir a formar más gargantas de interconexión (Zhang et al. 2006).

Sin embargo, a diferencia de los *scaffolds* de quitosano, la sección transversal de los *scaffolds* de gelatina no presenta una estructura gradiente. Esto se puede ver en la **figura 4.15** donde se muestra la superficie exterior y la región interior del *scaffold* de gelatina en la parte derecha e izquierda de la imagen respectivamente. En la misma figura, también podemos observar que la morfología de los poros de la región interior es similar a la de los poros de la superficie exterior. La diferencia en los polímeros y los tiempos y temperaturas de procesamiento puede resultar en un comportamiento reológico diferente de la disolución polimérica dando lugar a diferentes resultados. Aunque la disolución de gelatina utilizada es bastante concentrada (25% en peso), al igual que las de quitosano, y cabría esperar obtener gradientes de porosidad debido a su alta viscosidad, es posible que una combinación de factores tales como: que la viscosidad de la gelatina a 50°C sea menor que las de quitosano a temperatura ambiente y por tanto la fluidez de la disolución de gelatina sea mayor y dé como resultado una mayor cantidad de gelatina en la región interior del *scaffold*; la

infiltración de la gelatina en caliente (50°C) en lugar de a temperatura ambiente pueda ayudar a que la disolución penetre más uniformemente en el *template*, ya que ésta se encontraría en la fase sol durante todo el proceso de infiltración y es de esperar que su viscosidad no experimente cambios considerables; calentar la disolución de gelatina durante 2 h puede aumentar el tiempo de gelación y de esta forma mejorar la calidad de la infiltración, tal y como se explicó en el apartado 4.3.1, y finalmente el secado de la gelatina a 50°C después de dejarla secar a temperatura ambiente puede restaurar de nuevo su viscosidad y de esta forma al disminuir la viscosidad se facilitaría que penetrase más cantidad de gelatina en el *template*, dando lugar a un producto más homogéneo.

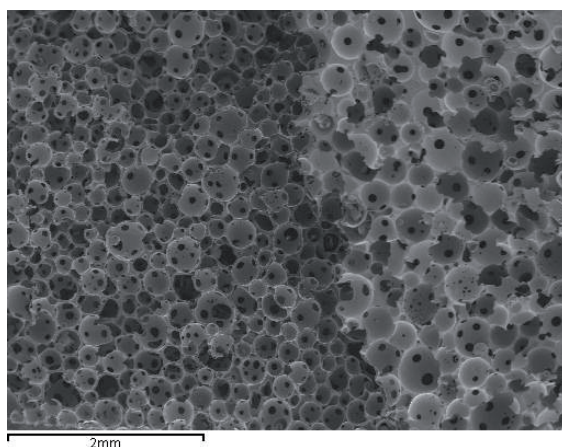


Figura 4.15: Micrografía SEM de la región exterior (derecha) e interior (izquierda) del *scaffold* de gelatina al 25% en peso. Barra de escala 2 mm.

Al igual que en los *scaffolds* de quitosano, no se observaron restos de porógeno, ni delaminación, ni agrietamiento a partir de la inspección visual de las micrografías SEM.

Finalmente, también se obtuvieron *microscaffolds* de gelatina con estructuras de poro interconectadas dentro de algunos de los poros del *scaffold* de gelatina tal y como se ilustra en la **figura 4.13** mediante la utilización de microesferas huecas de PEMA que están rellenas de microesferas más pequeñas de PEMA como material porogénico. Estas figuras también muestran que los *microscaffolds* están unidos a los poros del *scaffold*. Un mayor aumento de las micrografías SEM revela *microscaffolds* con una estructura abierta y bien interconectada (**Figura 4.16**). Se encontraron dos morfologías principales de poro: *microscaffolds* con múltiples poros esféricos (**Figura 4.16a**) y *microscaffolds* con un poro esférico aislado caracterizados por contener una garganta de interconexión (**Figura 4.16b**) y múltiples gargantas de interconexión (**Figuras 4.16c**). En las dos morfologías, los poros son grandes y

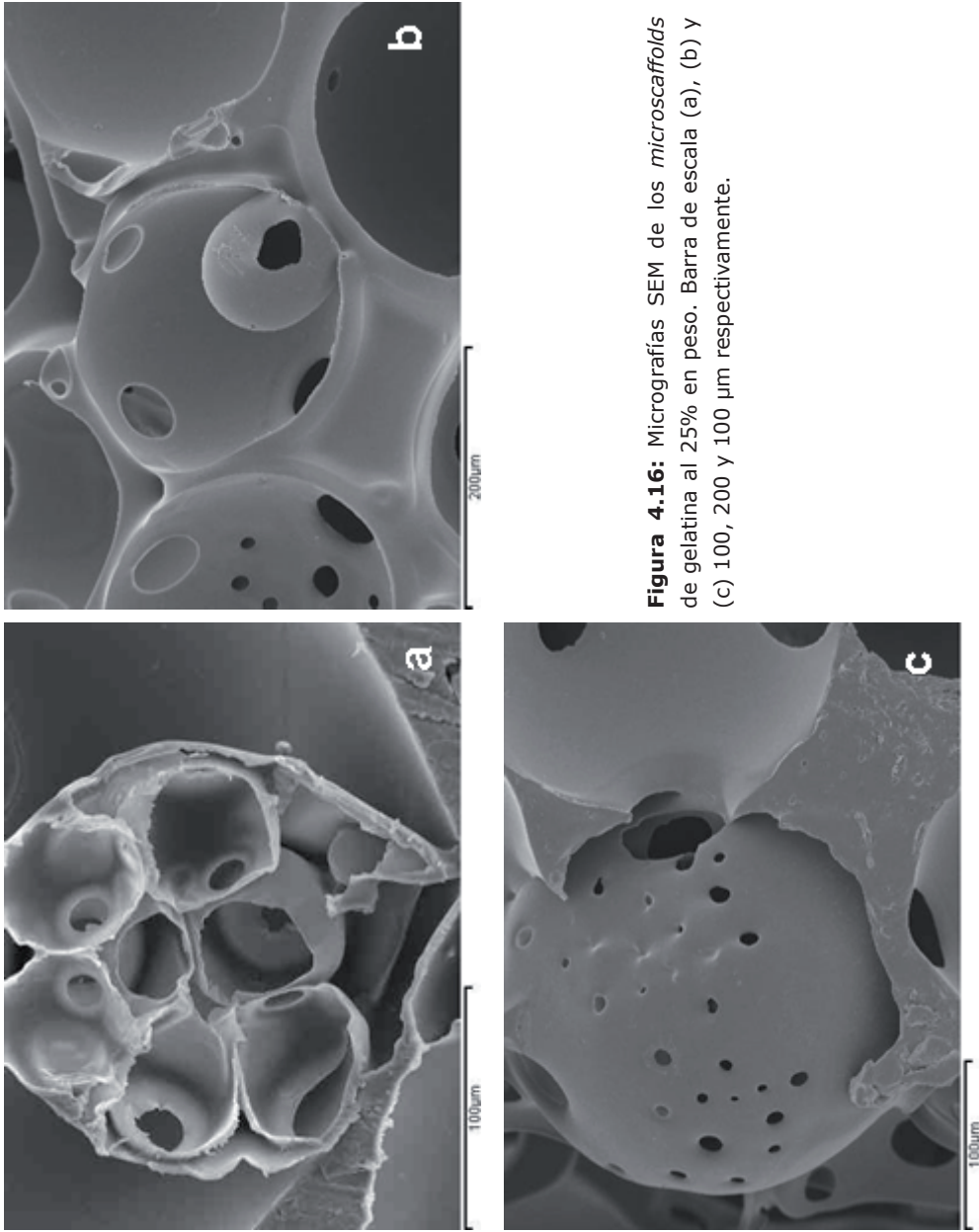


Figura 4.16: Micrografías SEM de los *microcaffolds* de gelatina al 25% en peso. Barra de escala (a), (b) y (c) 100, 200 y 100 µm respectivamente.

con un alto grado de interconexión. Estos *microscaffolds* pueden haber resultado del hecho de que más de una microesfera estuviese dentro de una microesfera más grande y/o que una microesfera estuviese dentro de otra, que a su vez, estuviera dentro de otra. Además, vale la pena destacar que la disolución polimérica no rellenó el espacio vacío de las microesferas huecas sino que recubrió las microesferas como puede verse claramente en la **figura 4.16**.

4.3.4 Morfología de los *scaffolds* de agarosa

La agarosa se ha utilizado en este estudio ya que es un hidrogel biocompatible, biodegradable y tiene propiedades macromoleculares similares a la ECM (Sánchez-Salcedo et al. 2008). Además, la agarosa se utiliza en la industria de la alimentación, productos cosméticos, etc (Marinho-Soriano y Bourret, 2003). La agarosa se ha propuesto como biomaterial para cartílago (Mouw et al. 2005) y médula espinal (Stokols y Tuszynski, 2004).

Se puede observar a partir de las micrografías mostradas en las **figuras 4.17, 4.18 y 4.20** que es posible obtener *scaffolds* de agarosa satisfactoriamente mediante el procedimiento descrito en la parte experimental (4.2.2.1 y 4.2.2.4).

Al igual que los *scaffolds* de quitosano y de gelatina, los *scaffolds* de agarosa poseen una microestructura abierta y bien interconectada con una morfología de poros esféricos determinada por las microesferas de PEMA. La distribución del tamaño de poros es muy amplia, desde aproximadamente 130 a 480 μm y el diámetro medio del poro es $320 \pm 85 \mu\text{m}$. Al igual que en los *scaffolds* de quitosano y gelatina, el diámetro medio de poro obtenido es menor, que el diámetro de las microesferas de PEMA utilizadas como material progenitor. Esto podría ser debido a las secciones de los poros medidos, donde el corte no ha sido necesariamente en el plano central de todos los poros, mientras que las medidas de las microesferas de PEMA son más fiables ya que toda la superficie externa de las microesferas se puede ver. Además, al igual que en los *scaffolds* de quitosano y gelatina, los poros obtenidos son más grandes que los que se obtienen por el método convencional de liofilización (*freeze-drying*) (50-220 μm) (Park et al. 2002; Ho et al. 2004; Jiankang et al. 2007; Davidenko et al. 2010; Wu et al. 2010; Kane y Roeder, 2011) tal y como se explicó en el apartado 4.3.2. Por otra parte, en la **figura 4.18** también se puede observar que los poros están conectados por gargantas redondas con una distribución de tamaño también amplia desde aproximadamente 32 a 156 μm y el diámetro medio de garganta de interconexión es $85 \pm 30 \mu\text{m}$. Sin embargo, en los *scaffolds* de agarosa, aunque presentan una buena interconectividad, no se han encontrado tantas gargantas de interconexión en una cavidad como en los *scaffolds* de quitosano y gelatina, probablemente debido a que temperatura

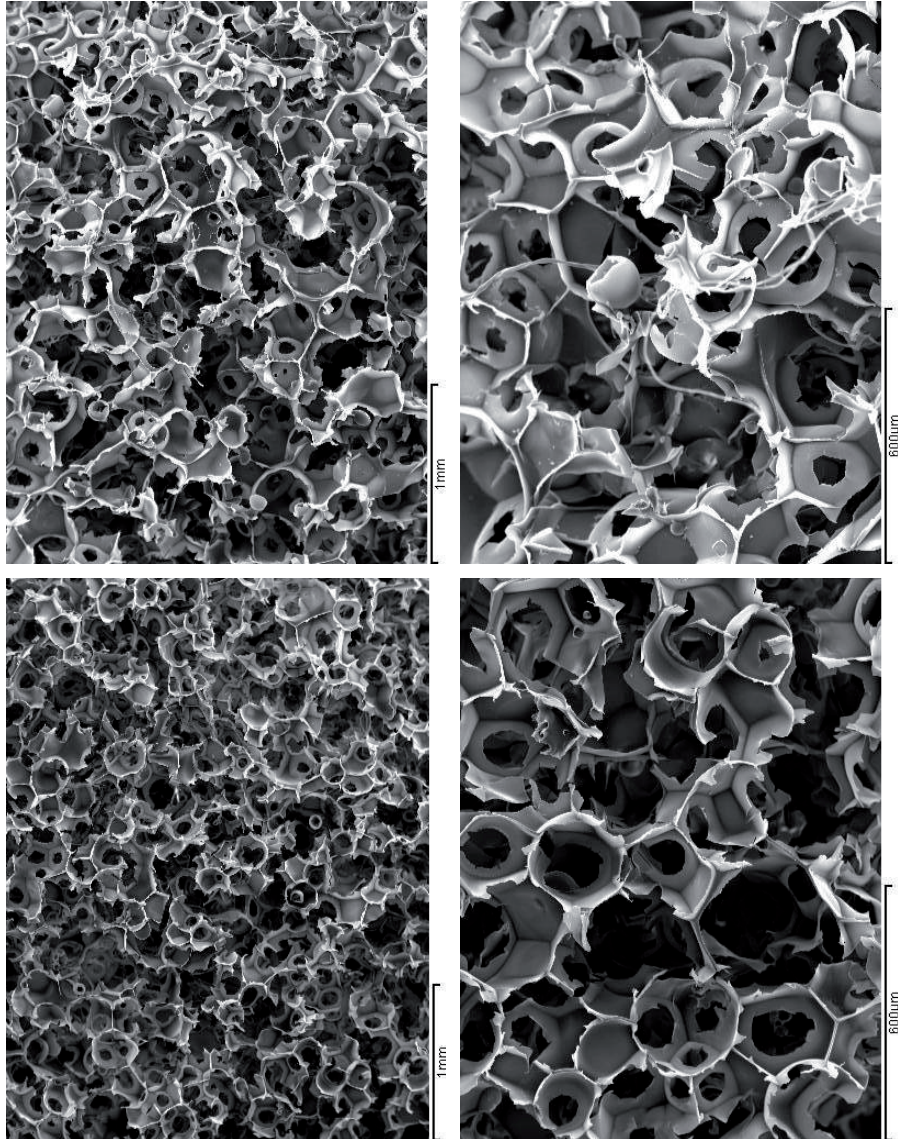


Figura 4.17: Micrografías SEM de los scaffolds de agarosa al 2.9% en peso. Barra de escala de izquierda a derecha y de arriba abajo 1 y 1 mm y 600 y 600 μm respectivamente.

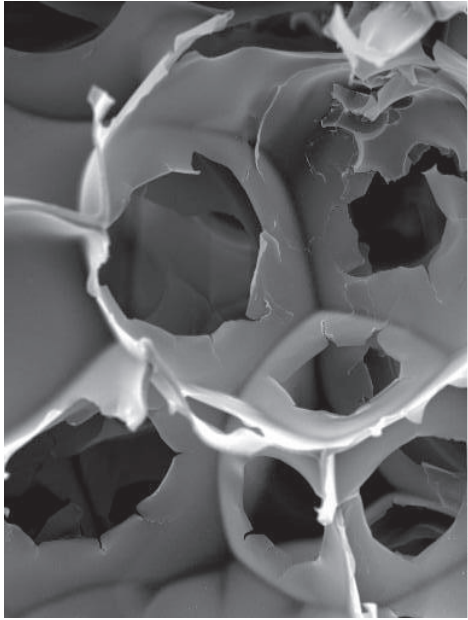
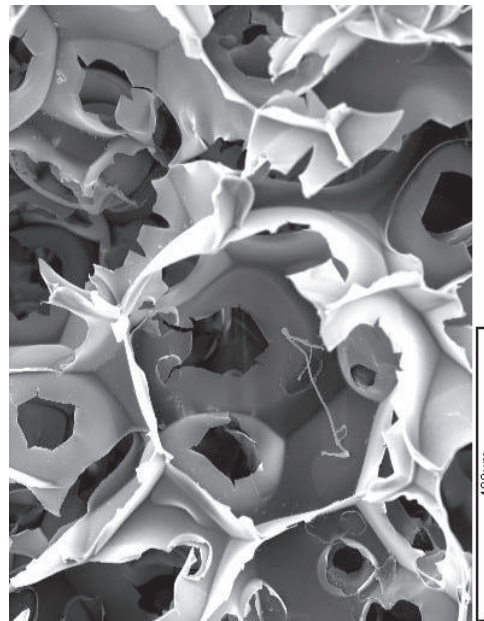
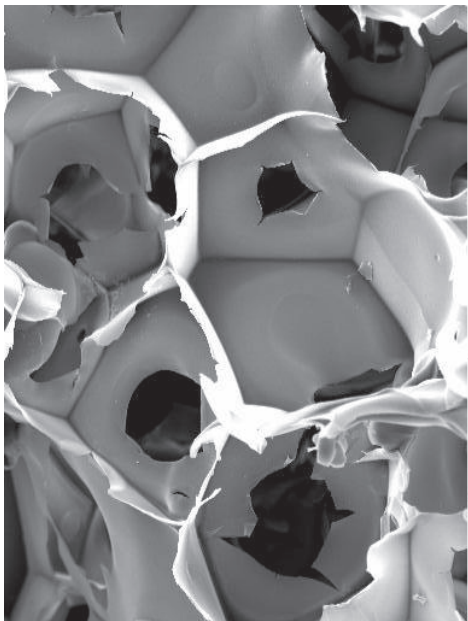


Figura 4.18: Micrografías SEM en las que se muestra en detalle la morfología esférica de los poros y las gargantas de interconexión del *scaffold* de agarosa al 2.9% en peso. Barra de escala de izquierda a derecha y de arriba abajo 300, 100 y 400 μm respectivamente.



de infiltración de la agarosa en el *template* es bastante elevada (95°C), en comparación con las temperaturas de infiltración del quitosano y gelatina (60 y 50°C respectivamente), lo que puede resultar en la evaporación del disolvente durante el proceso de infiltración en el *template* y no posteriormente. De esta forma, en los *scaffolds* de quitosano y de gelatina, las gargantas de interconexión en una cavidad estarían formadas por los cuellos de interconexión generados durante el proceso de sinterización de las microesferas de PEMA y por la evaporación del disolvente, a diferencia de los *scaffolds* de agarosa en los que las gargantas de interconexión en una cavidad estarían formadas mayoritariamente por los cuellos de interconexión generados durante el proceso de sinterización de las microesferas de PEMA y no por la evaporación del disolvente.

Al igual que los *scaffolds* de gelatina, la sección transversal de los *scaffolds* de agarosa no presenta una estructura gradiente (**Figura 4.17**). Aunque las disoluciones concentradas de agarosa tienen viscosidades elevadas y tiempos de gelación cortos, a temperaturas mayores de aproximadamente 90°C la agarosa está disuelta tal y como se ha comentado anteriormente. Por tanto infiltrar a temperaturas en las que la agarosa esté disuelta puede ayudar por una parte a que su viscosidad sea menor y por otra parte a que no se alcance la temperatura de gelación y de esta forma facilitar que la disolución pueda penetrar más uniformemente en el *template*.

Finalmente, también se obtuvieron *microscaffolds* de agarosa con estructuras de poro interconectadas dentro de algunos de los poros del *scaffold* de agarosa con una estructura abierta y bien interconectada. En la **figura 4.19** se puede observar un *microscaffold* con múltiples poros esféricos. Además, al igual que en los *scaffolds* de quitosano y gelatina vale la pena destacar que la disolución polimérica no relleno el espacio vacío de las microesferas huecas sino que recubrió las microesferas como puede verse claramente en la **figura 4.19**.

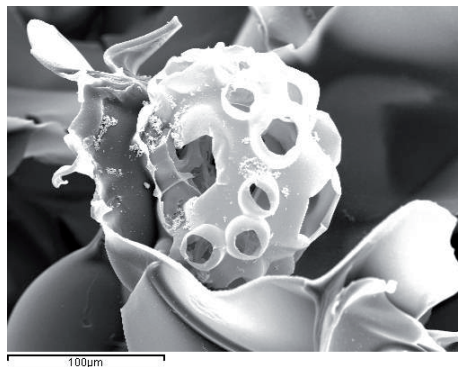


Figura 4.19: Micrografía SEM del *microscaffold* de agarosa al 2.9% en peso. Barra de escala 100 μm .

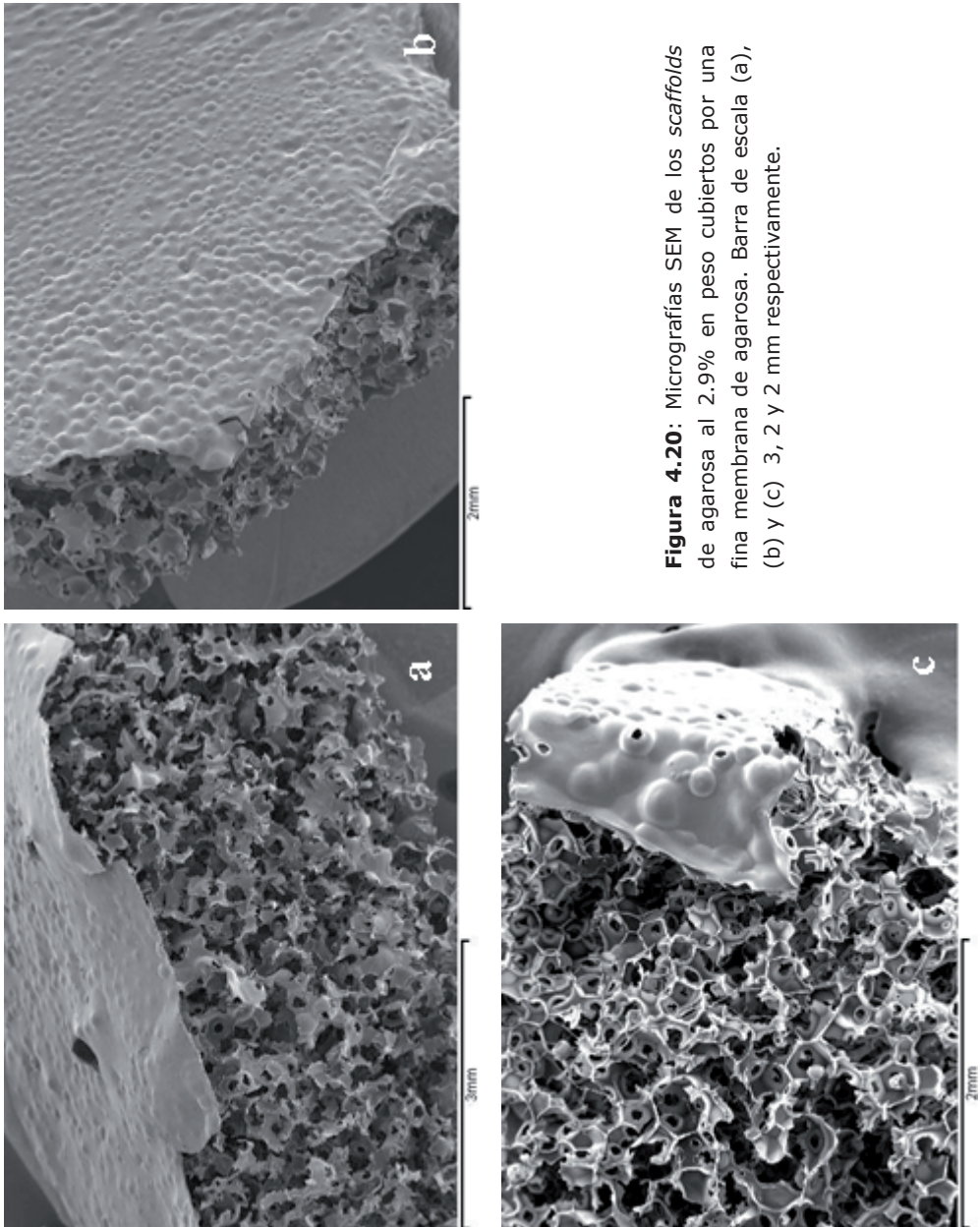


Figura 4.20: Micrografías SEM de los *scaffolds* de agarosa al 2.9% en peso cubiertos por una fina membrana de agarosa. Barra de escala (a), (b) y (c) 3, 2 y 2 mm respectivamente.

Alternativamente, se pueden obtener *scaffolds* de agarosa en los que la cara exterior (**Figuras 4.20 a y 4.20 b**) o parte de las caras exteriores (**Figura 4.20 c**) este cubierta por una fina membrana de agarosa. Para ello, se sigue con el mismo procedimiento descrito en la parte experimental (4.2.2.1 y 4.2.2.4) a diferencia de que no se desbasta la parte que deseemos conservar con membrana. El grosor de la membrana, en las condiciones de este trabajo, ha sido de aproximadamente 30 μm . Probablemente, esta membrana puede mejorar las propiedades mecánicas del *scaffold* sin dificultar el transporte de masa a través del *scaffold* ya que según Sánchez-Salcedo et al. (2008), la agarosa permite una difusión suficiente y un transporte de oxígeno, nutrientes esenciales y productos de desecho a través de su red.

4.3.5 Porosidad de los scaffolds

La porosidad de los *scaffolds* se determinó tal y como se describió anteriormente, ecuación 4.1, con valores de ρ_s y $\rho_{\text{quitosano}}$, ρ_{gelatina} y ρ_{agarosa} determinados mediante las ecuaciones 4.2 y 4.3 respectivamente.

La porosidad total de los *scaffolds* de quitosano producidos a partir de diferentes concentraciones de quitosano se muestra en la **tabla 4.1**. A partir de los resultados obtenidos se puede ver que la porosidad apenas varía. Al aumentar la concentración de quitosano la porosidad del *scaffold* aumenta desde $91.8 \pm 1.3\%$ hasta el $93.3 \pm 1.0\%$ para los *scaffolds* con un concentración de quitosano al 0.8 y 2.9% en peso respectivamente. Por lo tanto, el intervalo de concentraciones de quitosano utilizadas tiene muy poca influencia en la porosidad de los *scaffolds* de quitosano.

Sin embargo, estos resultados son diferentes de los que se encuentran utilizando PDLLA y sal como polímero y porógeno respectivamente y con un método que consiste en fundir sal. En la bibliografía, la porosidad del *scaffold* disminuye con el aumento de la concentración de polímero (Tan et al. 2011). La diferencia en los polímeros, la temperatura de procesado y el tamaño de partícula puede resultar en un comportamiento reológico diferente de la disolución polimérica dando lugar a resultados opuestos. Esto, podría ser debido a las altas concentraciones de quitosano que se han utilizado, que obstaculizan la infiltración uniforme de la disolución de quitosano en el *template* debido a su alta viscosidad (Vaquette et al. 2008). El aumento de la porosidad de los *scaffolds* de quitosano podría atribuirse al aumento de la viscosidad. Dado que la adición de quitosano aumenta la viscosidad de la disolución (El-hefian y Yahaya, 2010), se podría esperar que a mayor viscosidad, menos fluidez de la disolución de quitosano lo que da lugar a menos polímero en los huecos formados del núcleo interior del *template* de PEMA como puede verse en la **figura 4.8**. En

cualquier caso, en las condiciones ensayadas esta influencia ha sido muy pequeña.

Como resultado, los *scaffolds* de quitosano obtenidos muestran un gradiente de porosidad, como se revela mediante el examen de las micrografías SEM. En la sección transversal de los *scaffolds* preparados a partir de las diferentes concentraciones de quitosano (**Figura 4.8**) se pueden observar las dos regiones principales que se obtienen. Una región, donde la disolución polimérica penetra primero, que muestra una estructura más densa en la región exterior del *scaffold*, y la otra región, donde se introdujo una cantidad más pequeña de polímero probablemente debido a la alta viscosidad de la disolución de quitosano, que gradualmente es más porosa hacia el núcleo interno del *scaffold*. La **figura 4.8** también ilustra la distribución de la porosidad con respecto a su posición espacial a través de los *scaffolds*. El gradiente no parece afectar a la interconexión entre los poros de una región y los poros de la región vecina en la interfase de las dos regiones. Esto es una evaluación cualitativa del cambio de la porosidad basado en observaciones visuales.

C. de quitosano (% en peso)	0.8	1.5	2.9
D. m. p. (μm)	340 ± 70	320 ± 80	320 ± 80
D. m. g. i. (μm)	80 ± 30	80 ± 25	85 ± 20
Porosidad (%)	91.8 ± 1.3	92.0 ± 1.7	93.3 ± 1.0

Tabla 4.1: Medidas de los tamaños de poro, de los tamaños de las gargantas de interconexión y la porosidad de los distintos *scaffolds* de quitosano obtenidos, donde C. es la concentración, D. m. p es el diámetro medio de los poros y D. m. g. i es el diámetro medio de las gargantas de interconexión.

La porosidad total de los *scaffolds* de gelatina y agarosa se muestra en la **tabla 4.2**.

	Gelatina (25% en peso)	Agarosa (2.9% en peso)
Porosidad (%)	73 ± 4	72 ± 3

Tabla 4.2: Medidas de la porosidad de los distintos *scaffolds* de gelatina y agarosa obtenidos.

Además, la porosidad total de los *scaffolds* de gelatina y agarosa es prácticamente la misma tal y como se muestra en la **tabla 4.2**. A partir de los resultados obtenidos se puede ver que la porosidad de los *scaffolds* de gelatina y

agarosa es menor que la de los *scaffolds* de quitosano, aproximadamente en un 20%. La diferencia en la temperatura de procesado, tiempos de infiltración, tiempos de gelación, polímeros y concentraciones puede resultar en un comportamiento reológico diferente de las soluciones poliméricas dando lugar a resultados distintos. La disminución de la porosidad de los *scaffolds* de gelatina y agarosa podría atribuirse a una disminución de la viscosidad con respecto a la del quitosano en las condiciones de infiltración. Lo que permitiría una mayor fluidez de las soluciones de gelatina y agarosa facilitando de esta forma que una mayor cantidad de polímero pueda penetrar en la región interior del *template*. Como resultado, los *scaffolds* de gelatina y agarosa obtenidos no muestran un gradiente de porosidad, como se revela mediante el examen de las micrografías SEM (**Figuras 4.13, 4.15, 4.17 y 4.20**).

Los datos indican que la porosidad de los *scaffolds* obtenida es lo suficientemente alta para su utilización en la ingeniería de tejidos (Ho et al. 2004; Salgado et al. 2002).

4.4 Conclusiones

- Se ha desarrollado un método nuevo, sencillo y económico para la obtención de un novedoso diseño de *scaffold* poroso 3D que implica la utilización de microesferas huecas que están rellenas con microesferas más pequeñas como material porogénico. Esta nueva tecnología de fabricación desarrollada en este trabajo además de ser eficaz, reproducible y versátil, permite obtener *microscaffolds* dentro de los poros de los *scaffolds* con una interconectividad completa.

- Se han obtenido *scaffolds* con diferentes formas geométricas.

- Esta técnica de fabricación también puede ser una buena herramienta para la producción de *scaffolds* con gradiente de porosidad.

- Se han obtenido *scaffolds* de quitosano con gradiente de porosidad en la dirección longitudinal y transversal utilizando altas concentraciones de quitosano.

- Los *scaffolds* tridimensionales de quitosano, gelatina y agarosa obtenidos mediante el nuevo procedimiento, tienen una distribución del tamaño de poro amplia desde aproximadamente 180 a 560 μm , 140 a 470 μm y 130 a 480 μm respectivamente y están conectados entre si a través de una estructura continua.

- Los *scaffolds* obtenidos son estables mecánicamente y sin restos de porógeno.

- La porosidad de los *scaffolds* de quitosano obtenidos a partir de soluciones al 0.8, 1.5 y 2.9% en peso varía en un intervalo muy pequeño.

- La porosidad de los *scaffolds* de gelatina y agarosa es menor que la porosidad de los *scaffolds* de quitosano, en las condiciones estudiadas.

- Se han obtenido *scaffolds* de quitosano, gelatina y agarosa con *microscaffolds* dentro de algunos poros del *scaffold*. Los *microscaffolds* tienen una estructura de poro bien interconectada y abierta. Se encontraron cinco morfologías principales de poro: *microscaffolds* con múltiples tamaños de poro esféricos caracterizados por poros esféricos que contienen otros poros esféricos (**Figuras 4.11a y 4.11b**), *microscaffolds* con un poro esférico aislado con múltiples gargantas de interconexión (**Figuras 4.11c, 4.11d y 4.16c**), *microscaffolds* con múltiples poros esféricos internos (**Figura 4.16a**), *microscaffolds* con un poro esférico aislado caracterizados por contener una garganta de interconexión (**Figura 4.16b**) y *microscaffolds* con múltiples poros esféricos externos (**Figura 4.19**).

- Se han obtenido *scaffolds* de agarosa en los que la cara exterior (**Figuras 4.20a y 4.20b**) o parte de las caras exteriores (**Figura 4.20c**) está cubierta por una fina membrana de agarosa.

- Los resultados demuestran la viabilidad de este método para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación de una gran variedad de estructuras y proporcionar nuevas estructuras para su estudio en la ingeniería de tejidos, concretamente los *scaffolds* de quitosano con gradiente de porosidad pueden ser útiles para la regeneración de tejidos nativos que poseen gradientes a través de su volumen espacial como sucede en el hueso, la piel o el cartílago y los *scaffolds* con *microscaffolds* en los poros del *scaffold* tal vez podrían servir como una herramienta para estudios básicos de las interacciones entre las células o tejidos y el *scaffold* con el fin de desarrollar *scaffolds* óptimos para la ingeniería de tejidos.

4.5 Recomendaciones

Hasta el momento, se han obtenido *scaffolds* de quitosano, gelatina y agarosa con una nueva estructura que consiste en *microscaffolds* dentro de algunos de los poros de los *scaffolds* y *scaffolds* de quitosano con gradientes de porosidad con distintas concentraciones. Se proponen algunas líneas que permitirían completar y continuar este estudio.

- Cultivos celulares y de tejidos: los *scaffolds* obtenidos en este trabajo muestran dos nuevas arquitecturas espaciales porosas 3D. Algunas investigaciones han demostrado que la respuesta celular es muy diferente para

distintas formas arquitectónicas (Sobral et al. 2011). Así, sería interesante, evaluar la influencia de estas nuevas arquitecturas espaciales en el desarrollo de cultivos celulares en los *scaffolds* obtenidos.

- Estudiar las propiedades mecánicas de todas las estructuras obtenidas y en función de los resultados obtenidos, evaluar si es necesario reforzar la matriz polimérica, ya sea mediante la adición de entrecruzador y/o la formación de IPNs (Lee et al. 1999) y/o añadiendo materiales de refuerzo como cerámicas (Migliaresi y Alexander, 2004) para mejorar las propiedades mecánicas.

- Estudiar la evolución de los cambios en la morfología de los *scaffolds*, pérdida de peso, porosidad y propiedades mecánicas durante el periodo de degradación de los *scaffolds* obtenidos.

- Estudiar la relación, concentración-viscosidad y como ésta influye en la obtención de *scaffolds* con gradientes de porosidad.

4.6 Bibliografía

- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 19-34.
- Bohidar, H. B., Jena, S. S. (1993). Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatine. *J. Chem. Phys.* **98**, 8970-8977.
- Briefer, M., Cohen, J. M. (1927). A study of gelatine viscosity and related problems. *Ind. Eng. Chem.* **19**, 252-257.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 981-1014.
- Davidenko, N., Campbell, J. J., Thian, E. S., Watson, C. J., Cameron, R. E. (2010). Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomater.* **6**, 3957-3968.
- Draghi, L., Resta, S., Pirozzolo, M. G., Tanzi, M. C. (2005). Microspheres leaching for scaffold porosity control. *J. Mat. Sc. Mat. Med.* **16**, 1093-1097.
- El-hefian, E. A., Elgannoudi, E. S., Mainal, A., Yahaya, A. H. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal Studies. *Turk. J. Chem.* **34**, 47-56.
- El-hefian E. A., Yahaya, A. H. (2010). Rheological study of chitosan and its blends: An overview. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* **4**, 210-220.
- Fatin-Rouge, N., Starchev, K., Buffle, J. (2004). Size effects on diffusion processes within agarose gels. *Biophys. J.* **86**, 2710-2719.
- Fernández, E., López, D., Mijangos, C., Duskova-Smrckova, M., Ilavsky M., Dusek, K. (2007). Rheological and thermal properties of agarose aqueous solutions and hydrogels. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **46**, 322-328.
- Haimi, S., Vienonen, A., Hirn, M., Pelto, M., Virtanen, V., Suuronen, R. (2008). The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanical properties of cortical bone. *Biologicals* **36**, 99-104.
- Harley, B. A., Hastings, A. Z., Yannas, I. V., Sannino, A. (2006). Fabricating tubular scaffolds with a radial pore size gradient by a spinning technique. *Biomaterials* **27**, 866-874.

- Ho, M-H., Kuo, P-Y., Hsieh, H-J., Hsien, T-Y., Hou, L-T., Lau, J-Y., Wang, D-M. (2004). Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials* **25**, 129-138.
- Ho, S. Y., Hutmacher, D. W. (2006). A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* **27**, 1362-1376.
- Hornsby, P. R., Maxwell, A. S. (1992). Mechanism of sintering between polypropylene beads. *Journal of Materials Science* **27**, 2525-2533.
- Hsieh, C-Y., Tsai, S-P., Ho, M-H., Wang, D-M., Liu, C-E., Hsieh, C-H., Tseng, H-C., Hsieh, H-J. (2007). Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. *Carbohydr. Polym.* **67**, 124-132.
- Huang, S., Fu, X. (2010). Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J. Controlled Release* **142**, 149-159.
- Hutmacher, D. W., Ng, K. W., Kaps, C., Sittinger, M., Kläreing, S. (2003). Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier. *Biomaterials* **24**, 4445-4458.
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* **3**, 589-601.
- Jeong, C. G., Zhang, H., Hollister, S. J. (2011). Three-dimensional poly(1,8-octanediol-co-citrate) scaffold pore shape and permeability effects on subcutaneous in vivo chondrogenesis using primary chondrocytes. *Acta Biomater.* **7**, 505-514.
- Jiankang, H., Dichen, L., Yaxiong, L., Bo, Y., Binghen, L., Qin, L. (2007). Fabrication and characterization of chitosan/gelatine porous scaffolds with predefined internal microstructures. *Polymer* **48**, 4578-4588.
- Kane, R. J., Roeder, R. K. (2011). Effects of hydroxapatite reinforcement on the architecture and mechanical properties of freeze-dried collagen scaffold. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **7**, 41-49.
- Karageorgiou, V., Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474-5491.
- Lee, J. J., Lee, S-G., Park, J. C., Yang, Y. I., Kim, J. K. (2007). Investigation on biodegradable PLGA scaffold with various pore size structure for skin tissue engineering. *Curr. Appl. Phys.* **7**, e37-e40.
- Lee, J. W., Kim, S. Y., Kim, S. S., Lee, Y. M., Lee, K. H., Kim, S. J. (1999). Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 113-120.

Lee, S. B., Jeon, H. W., Lee, Y. W., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., Nam, Y. S., Ahn, H. C. (2003). Bio-artificial skin composed of gelatine and (1→3), (1→6)- β -glucan. *Biomaterials* **24**, 2503-2511.

Lee, S. B., Kim, Y. H., Chong, M. S., Lee, Y. M. (2004). Preparation and characteristics of hybrid scaffolds composed of β -chitin and collagen. *Biomaterials* **25**, 2309-2017.

Leong, K. F., Cheah, C. M., Chua, C. K. (2003). Solid Free Form fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* **24**, 2363-2378.

Leong, K. F., Chua, C. K., Sudarmadji, N., Yeong, W.Y. (2008). Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **1**, 140-152.

Lien, S-M., Ko, L-Y., Huang, T-J. (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatine scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **5**, 670-679.

Lim, L-T., Auras, R., Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly(lactic acid). *Prog. Polym. Sci.* **33**, 820-852.

Liu, C., Xia, Z., Czemuska, J. T. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **85**, 1051-1064.

Ma, J., Wang, H., He, B., Chen, J. (2001). A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* **22**, 331-336.

Ma, P. X., Choi, J-W. (2001). Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* **7**, 23-33.

Malafaya, P. B., Silva, G. A., Reis, R. L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **59**, 207-233.

Manning, A. B. (1924). Investigations on gelatine. Part V. The properties of a gelatine purified by flocculation in an electric field. *Biochem. J.* **18**, 1085-1094.

Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S., Boesel, L. F., Oliveira, J. M., Santos, T. C., Marques, A. P., Neves, N. M., Reis, R. L. (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J. R. Soc. Interface* **4**, 999-1030.

- Marinho-Soriano, E., Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* **90**, 329-333.
- Meschede, A., Scharf, T., Krebs, H-U., Samwer, K. (2008). Mechanical spectroscopy of laser deposited polymers. *Appl. Phys. A* **93**, 559-603.
- Migliaresi, C., Alexander, H. (2004). Composites. Introduction. En "Biomaterials science: an introduction to materials in medicine". 2ª ed. (Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E eds.), pp. 181-196. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Millán, A. J., Moreno, R., Nieto, M. I. (2002). Thermogelling polysaccharides for aqueous gelcasting— part I: a comparative study of gelling additives. *J. Eur. Ceram. Soc.* **22**, 2209-2215.
- Montebault, A., Viton, C., Domard, A. (2005). Physico-chemical studies of gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials* **26**, 933-43.
- Mouw, J. K., Case, ND., Guldberg, R. E., Plaas, A. H. K., Levenston, M. E. (2005). Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *OsteoArthritis and Cartilage* **13**, 828-836.
- Nair, L. S., Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762-798.
- Nam, S. Y., Lee, Y. M. (1999). Pervaporation of ethylene glycol-water mixtures. I. Pervaporation performance of surface crosslinked chitosan membranes. *J. Membr. Sci.* **153**, 155-162.
- O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., Gibson, L. J. (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **26**, 433-441.
- Oh, S. H., Park, K., Kim, J. M, Lee, J. H. (2007). In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* **28**, 1664-1671.
- Park, S-N., Park, J-C., Kim, H. O., Song, M. J., Suh, H. (2002). Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* **23**, 1205-1212.
- Parker, N. G., Povey, M. J. W. (2012). Ultrasonic study of the gelation of gelatine: Phase diagram, hysteresis and kinetics. *Food Hydrocolloids* **26**, 99-107.
- Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H., Jayakumar, R. (2010). Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* **80**, 687-694.

Pruss, A., Baumann, B., Seibold, M., Kao, M., Tintelnot, K., Versen, R., Radtke, H., Dörner, T., Pauli, B., Göbel, U. B. (2001). Validation of the sterilization procedure of allogenic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals* **29**, 59-66.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 603-632.

Rohanizadeh, R., Swain, M. V., Mason, R. S. (2008). Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **19**, 1173-1182.

Sakurai, K., Maegawa, T., Takahashi, T. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* **41**, 7051-7056.

Salgado, A. J., Gomes, M. E., Chou, A., Coutinho, O. P., Reis, R. L., Hutmacher, D. W. (2002). Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. *Mater. Sci. Eng., C* **20**, 27-33.

Sánchez-Salcedo, S., Nieto, A., Vallet-Regí, M. (2008). Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chem. Eng. J.* **137**, 62-71.

Sarasam, A. R, Krishnaswamy, R. K, Madihally, S. V. (2006). Blending chitosan with polycaprolactone: Effects on physicochemical and antibacterial properties. *Biomacromolecules* **7**, 1131-1138.

Sartorius. (1999). Part 1. Density. En "Manual of Weighing Applications". URL:http://www.sartorius-mechatronics.com/uploads/tx_sartoriusmechpdf/BRO-DensityDeterminationManual-e.pdf.

Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., Cheng, T. (2005). Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research* **133**, 185-192.

Shi, M., Kretlow, J. D., Spicer, P. P., Tabata, Y., Demian, N., Wong, M. E., Kasper, F. K., Mikos, A. G. (2011). Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate/gelatine/antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering. *J. Controlled Release* **152**, 196-205.

Shi, Y., Zhang, Y. (2008). Simulation of random packing of spherical particles with different size distributions. *Appl. Phys. A* **92**, 621-626.

Shōji, R. (1919). Studies on coagulation. I. On the velocity of gelation and hydrolysis of gelatine sol. *Biochem. J.* **13**, 227-238.

Sobral, J. M., Caridade, S. G., Sousa, R. A., Mano, J. F., Reis, R. L. (2011). Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of

scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomater.* **7**, 1009-1018.

Song, R., Xué, R., He, L-H., Liu, Y., Xiao, Q-L. (2008). The structure and properties of chitosan/polyethylene glycol/silica ternary hybrid organic-inorganic films. *Chin. J. Polym. Sci.* **26**, 621-630.

Stokols, S., Tuszynski, M. H. (2004). The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* **25**, 5839-5846.

Tan, Q., Li, S., Ren, J., Chen, C. (2011). Fabrication of porous scaffolds with a controllable microstructure and mechanical properties by porogen fusion technique. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 890-904.

Thein-Han, W. W., Saikhun, J., Pholpramoo, C., Misra, R. D. K., Kitiyanant, Y. (2009). Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. *Acta Biomater.* **5**, 3453-3466.

Traoré, A., Foucat, Loïc., Renou, J-P. (2000). ¹H NMR studies: dynamics of water in gelatine. *Eur. Biophys. J.* **29**, 159-164.

Vaquette, C., Frochot, C., Rahouadj, R., Wang, X. (2008). An innovative method to obtain porous PLLA scaffolds with highly spherical and interconnected pores. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **86**, 9-17.

Wu, X., Liu, Y., Li, X., Wen, P., Zhang, Y., Long, Y., Wang, X., Guo, Y., Xing, F., Gao, J. (2010). Preparation of aligned porous gelatine scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomater.* **6**, 1167-1177.

Yeong, W-Y., Chua, C-K., Leong, K-F, Chandrasekaran, M. (2000). Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* **21**, 643-652.

Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., Teoh, S. H. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 1169-1185.

Zhang, J., Zhang, H., Wu, L., Ding, J. (2006). Fabrication of three dimensional polymeric scaffolds with spherical pores. *J. Mater. Sci.* **41**, 1725-1731.

5 CONCLUSIONES GENERALES

5 Conclusiones generales

Este trabajo es un estudio del desarrollo de nuevos métodos de síntesis de *scaffolds* 3D para la ingeniería de tejidos así como la formación de nuevas estructuras y su caracterización. Los distintos métodos de obtención de *scaffolds* 3D porosos se han descrito en capítulos diferentes donde se pueden ver las conclusiones particulares para cada método. Se presentan las distintas conclusiones generales por capítulos.

Capítulo 2

Se ha desarrollado un método de producción de *scaffolds* 3D que permite obtenerlos con formas y distribuciones de poro altamente regulares con una interconectividad controlada. Los *scaffolds* desarrollados con esta metodología poseen una arquitectura que consiste en canales cilíndricos ortogonales, que están alineados paralelamente e interconectados. Este método es sencillo, económico y versátil pudiéndose variar la porosidad, la morfología de los poros, el tamaño de las interconexiones, la estructura macromolecular (redes e IPN's), la hidrofiliidad del material y el grosor del *scaffold*. El comportamiento mecánico del *scaffold* de PMMA conserva las propiedades mecánicas comparado con el material en bloque con la misma composición a diferencia del módulo de almacenamiento (E') que es menor debido a la disminución del área efectiva de la sección transversal debido a la porosidad.

Los resultados demuestran la viabilidad de este método para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación controlada de una gran variedad de estructuras y proporciona nuevas estructuras con propiedades adecuadas para su estudio en la ingeniería de tejidos así como para membranas y filtros.

Capítulo 3

Se han desarrollado métodos de producción de *scaffolds* 3D que permiten obtenerlos con una morfología de poro en forma de canales tubulares paralelos abiertos con arquitecturas laminares y cilíndricas y superficies internas de canal de poro rugosas. Estos métodos son sencillos, económicos y versátiles pudiéndose modificar el tamaño de poro, porosidad, la estructura macromolecular (redes e IPN's) y la hidrofiliidad del material. En general, la absorción de agua aumenta al aumentar el porcentaje en masa de PHEMA en la IPN, ya que el PHEMA es más hidrofílico que el PEA. Sin embargo, la porosidad

del *scaffold* así como la morfología de la IPN (full vs homo IPN) también pueden influir en el *swelling*.

Uno de estos métodos permite obtener *scaffolds* con formas y distribuciones de poro regulares con una interconectividad controlada. Los *scaffolds* desarrollados con esta metodología poseen una arquitectura que consiste en canales alineados paralelamente e interconectados. Este método resulta útil cuando se pretendan obtener estructuras porosas regulares y con conectividad controlada y no se pueda aplicar la sinterización mediante temperatura al material porogénico porque se descompone antes de sinterizarse.

Los resultados demuestran la viabilidad de estos métodos para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación controlada de una gran variedad de estructuras y proporcionar nuevas estructuras con propiedades adecuadas para su estudio en la ingeniería de tejidos, concretamente estos *scaffolds* pueden ser útiles para la regeneración de tejidos naturales que están organizados en arquitecturas fibrilares o tubulares como tendones, nervios, ligamentos, médula espinal, articulaciones de los cartílagos, músculos, vasos y dientes, además de dispositivos extracorpóreos, (por ejemplo, riñón artificial), sustratos para reacciones químicas y biológicas, sistemas de liberación controlada, así como para membranas y filtros.

Capítulo 4

Se ha desarrollado un método de producción de *scaffolds* 3D que permite obtener *microscaffolds* dentro de los poros de los *macroscaffolds* con una interconectividad controlada. Los *scaffolds* desarrollados con esta metodología poseen una arquitectura que consiste en poros esféricos e interconectados con *microscaffolds* con una morfología de poro esférica e interconectada. Este método es sencillo, económico y versátil pudiéndose variar el tamaño de los poros e interconexiones, la geometría de la estructura resultante, los materiales que constituyen el *scaffold* así como sus concentraciones.

Finalmente, se han desarrollado estructuras con porosidad gradiente (*scaffolds* de quitosano). La porosidad de los *scaffolds* de quitosano es significativamente diferente si la comparamos con los *scaffolds* de gelatina y agarosa. Los datos sugieren que la estructura gradiente obtenida para el quitosano influye en la porosidad total.

Los resultados demuestran la viabilidad de este método para obtener *scaffolds*, abrir una línea nueva para la formación de una gran variedad de estructuras y proporcionar nuevas estructuras para su estudio en la ingeniería de tejidos, concretamente los *scaffolds* de quitosano con gradiente de porosidad pueden ser útiles para la regeneración de tejidos nativos que poseen gradientes a través de su volumen espacial como sucede en el hueso, la piel o el cartílago y

los *scaffolds* con *microscaffolds* en los macroporos del *macroscaffold* tal vez podrían servir como una herramienta para estudios básicos de las interacciones entre las células o tejidos y el *scaffold* con el fin de desarrollar *scaffolds* óptimos para la ingeniería de tejidos.

6 APÉNDICES

6.1 Seguridad

Se han consultado las fichas de seguridad de las sustancias utilizadas para la realización de este trabajo. Esta información, de forma condensada, se muestra en la **tabla 6.1**.

Producto	Número CAS	NFPA Salud	NFPA Inflam.	NFPA Reactiv.	T _f (°C)	TLV (ppm)
Ácido acético glacial	64-19-7	3	2	0	39	10
Acido nítrico	7697-37-2	4	0	0	nd	2
Agarosa	9012-36-6	1	1	0	nd	nd
AIBN	78-67-1	3	3	3	97	nd
DMF	68-12-2	2	2	0	58	10
EA	140-88-5	3	3	2	8	15
EGDMA	97-90-5	2	1	0	101.5	nd
Etanol absoluto para análisis	64-17-5	0	3	0	13	1000
Gelatina	9000-70-8	1	1	0	nd	nd
HEA	818-61-1	3	1	2	99	nd
HEMA	868-77-9	2	1	1	97	nd
MMA	80-62-6	2	3	2	10	50
n-octano	111-65-9	0	3	0	13	300

Quitosano	9012-76-4	0	1	0	nd	nd
-----------	-----------	---	---	---	----	----

Tabla 6.1: Información de seguridad de las sustancias utilizadas. Donde NFPA, Inflam., Reactiv., T_f , TLV y nd representan: Asociación Nacional para la Protección contra Incendios, inflamabilidad, reactividad, Flash point, valor límite umbral y no disponible respectivamente.

6.2 Símbolos

A	Área de la tela.
-co-	Copolímero.
D_p	Profundidad de penetración.
E'	Módulo de almacenamiento.
h	Longitud del monofilamento.
-i-	IPN.
m_a	Masa del material en bloque en aire.
m_{al}	Masa del material en bloque en agua destilada.
m_e	Masa del <i>scaffold</i> hidratado en estado de equilibrio.
m_h	Masa del <i>scaffold</i> hidratado.
m_l	Masa del <i>scaffold</i> seco en agua destilada.
m_{lr}	Masa del líquido de relleno.
mm	Milímetro.
m_o	Masa del material en bloque en n-octano.
m_{PAN}	Masa del porógeno (PAN).
m_s	Masa del <i>scaffold</i> seco.
m_{sl}	Masa de la muestra seca antes de eliminar el porógeno en agua destilada.
m_{sp}	Masa de la muestra seca antes de eliminar el porógeno en aire.
n	Número de monofilamentos por área.
R	Radio del cilindro.
r	Radio del monofilamento.
s	Espesor de una lámina de tela.
T	Temperatura.
$\tan \delta$	Factor de pérdidas mecánicas.
T_f	Flash point.
T_g	Temperatura de transición vítrea.
V_a	Volumen aparente del <i>scaffold</i> .
V_F	Volumen de los monofilamentos.
V_p	Volumen ocupado por los poros.
V_{PAN}	Volumen ocupado por el porógeno (PAN).



V_s	Volumen real del <i>scaffold</i> .
V_t	Volumen total de la muestra.
V_T	Volumen total de la tela.
Π	Porosidad.
ρ_{aire}	Densidad del aire.
ρ_l	Densidad del líquido.
ρ_{lr}	Densidad del líquido de relleno.
ρ_m	Densidad del material en bloque.
$\rho_{n-octano}$	Densidad del n-octano.
ρ_{PAN}	Densidad del PAN.
ρ_s	Densidad aparente del <i>scaffold</i> .
ρ_{sp}	Densidad aparente de la muestra seca antes de eliminar el porógeno.

6.3 Acrónimos

2D	Dos dimensiones.
3D	Tridimensional.
3D-P	Impresión tridimensional (<i>three-Dimensional Printing</i>).
AIBN	2,2'-Azobisisobutironitrilo (<i>Azobisisobutyronitrile</i>).
CAD	Diseño asistido por ordenador (<i>Computer-Assisted Design</i>).
CT	Tomografía computerizada (<i>Computed Tomography</i>).
DMF	N,N-Dimetilformamida.
DPAP	2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>).
EA	Acrilato de etilo.
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular Matrix</i>).
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato (<i>Ethylene Glycol Dimethylacrylate</i>).
ESEM	Microscopio electrónico de barrido ambiental (<i>Environmental Scanning Electron Microscope</i>).
EWC	Contenido de agua en equilibrio (<i>Equilibrium Water Content</i>).
FDM	Modelado por deposición en fundido (<i>Fused Deposition Modelling</i>).
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos (<i>Food and Drug Administration</i>).
HDPE	Polietileno de alta densidad (<i>High-Density Polyethylene</i>).
HEA	Acrilato de 2-hidroxietilo.
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo.
IPN	Red de interpenetración (<i>Interpenetrating Polymer Network</i>).
MMA	Metacrilato de metilo
MRI	Imagen por resonancia magnética (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>).

NFPA	Asociación Nacional para la Protección contra Incendios (<i>National Fire Protection Association</i>).
NIH	Institutos Nacionales de Salud (<i>National Institutes of Health</i>).
PAN	Poliacrilonitrilo.
PCL	Policaprolactona.
PDMS	Polidimetilsiloxano.
PE	Poliétileno.
PEA	Poliétilacrilato.
PEG	Poliétilenglicol.
PEMA	Poliétilmetacrilato.
PEO	Poli(oxietileno) (<i>Polyethylene Oxide</i>).
PET	Poliétilenteraftalato.
PGA	Ácido Poliglicólico (<i>Polyglycolic Acid</i>).
PHAs	Polihidroxiálcanoatos.
PHB	Polihidroxi butirato.
PHBV	Polihidroxi butiratovalerato.
PHEA	Polihidroxi etilacrilato.
PHEMA	Polihidroxi etilmetilacrilato.
PLA	Ácido poliláctico (<i>Polylactic Acid</i>).
PLG	Ácido poliglicólico (<i>Poliglycolic Acid</i>).
PLGA	Poli (-co-glicólico, ácido láctico) (<i>Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i>).
PLLA	Ácido poli-L-láctico (<i>Poly-L-Lactide Acid</i>).
PMMA	Polimetilmetacrilato.
PS	Poliestireno.
PTFE	Politetrafluoroetileno.
PVA	Alcohol polivinílico (<i>Polyvinyl Alcohol</i>).
RP	Prototipado rápido (<i>Rapid Prototyping</i>).
SEM	Microscopio electrónico de barrido (<i>Scanning Electron Microscope</i>).
SFF	Métodos de forma libre (<i>Solid Free Form</i>).
SLS	Sinterización láser selectiva (<i>Selective Laser Sintering</i>).
SNC	Sistema nervioso central.
SNP	Sistema nervioso periférico.
THFMA	Metacrilato tetrahidrofurfurílico (<i>Tetrahydrofurfuryl Methacrylate</i>).
TLV	Valor límite umbral (<i>Threshold limit value</i>).
UDE	Unión dentina-esmalte.

6.4 DEA

**Evaluación para la obtención del
Diploma de Estudios Avanzados
-DEA-**

Programa: "Ingeniería Térmica y Propiedades Térmicas de la Materia"
 -Departamento de Termodinámica Aplicada-

Laura Santos Esteve

Valencia, Febrero de 2004

Contenido:

- Curriculum Vitae
- Etapa de Docencia
- Trabajo de Investigación
- Futuros Desarrollos

Curriculum Vitae

- **Licenciada en Ciencias Químicas – Química Orgánica –**
(Universidad de Valencia)
- **Actividades desarrolladas en la UPV:**
 - Tres becas de especialización de 2º ciclo
 - Técnico Superior de Laboratorio.
 - Poster: "Structures and preparation techniques for polymer scaffolds"
17th European conference on Biomaterials, Barcelona (2002).
 - Poster: "Synthetic polymer scaffolds with controlled pore geometry"
Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterials.
Algarve, Portugal (2003).
- **Experiencia profesional (fuera de la UPV):**
Técnico de laboratorio en:
 - Siderúrgica del Mediterraneo SA
 - PPG Ibérica SA

Etapa de Docencia

Asignaturas:

- Fundamentos en ciencia de polímeros
- Física de polímeros
- Biomateriales
- Hidrogeles poliméricos
- Degradación y envejecimiento químico de los polímeros



Trabajo de Investigación
 - NUEVAS ARQUITECTURAS FABRICADAS
 CON POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES
 PARA APLICACIONES MÉDICAS -

ÍNDICE

- INTRODUCCIÓN
 - INGENIERÍA DE TEJIDOS
 - DISEÑO DE SCAFFOLDS
 - MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SCAFFOLDS
- OBJETIVOS
- MATERIALES
- MÉTODOS EXPERIMENTALES
 - PROCESADO DE MATERIALES POROSOS
 - TÉCNICAS EXPERIMENTALES
- RESULTADOS
 - MICROSCOPIA (SEM)
 - MEDIDAS MECÁNICAS (DMTA)
 - DENSIMETRÍAS
- CONCLUSIONES
- POSIBLES APLICACIONES

INGENIERÍA DE TEJIDOS (1/3)

• DEFINICIÓN:

- Disciplina basada en conocimientos de biología, ingeniería, ciencia de materiales, principios médicos y técnicas quirúrgicas; mediante la cual se pretende la creación de un tejido natural con la capacidad de restablecer la función de un órgano o tejido perdido, que el organismo no ha podido regenerar en condiciones fisiológicas.

Con ello, se aspira a poder dar solución a las limitaciones actuales: baja cantidad de donantes, rechazos.

INGENIERÍA DE TEJIDOS (2/3)

The diagram illustrates the workflow of tissue engineering. It starts with 'Cell Isolation' from a 'Donor Tissue'. This leads to 'Cell Culture' and 'Differentiation'. The next step is 'Scaffold Fabrication', which involves 'Material Selection' and 'Fabrication Methods'. The final stage is 'Implantation' into a 'Recipient Tissue', leading to 'Integration' and 'Regeneration'.

INGENIERÍA DE TEJIDOS (3/3)

This figure displays a variety of scaffold architectures, including porous sponges, fibrous networks, and layered structures. Each architecture is associated with a specific fabrication method, such as 'Sol-gel', 'Electrospinning', '3D printing', and 'Phase separation'.

DISEÑO DE SCAFFOLDS

Idealmente un scaffold debe tener las siguientes características:

- Tener propiedades superficiales que promuevan la adhesión, proliferación y diferenciación celular
- Ser biocompatible.
- Tener propiedades mecánicas suficientes para soportar cualquier tensión *in vivo*.
- Ser altamente poroso con una gran relación área/volumen.
- Poseer una red de poros interconectados tanto para el crecimiento celular como para el transporte de nutrientes y productos de desecho.
- Ser fácilmente procesable en 3D.



MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SCAFFOLDS (1/3)

Se han desarrollado diferentes técnicas para el diseño y fabricación de scaffolds 3D para la ingeniería de tejidos. Estas técnicas incluyen:

Phase separation

Se pueden obtener estructuras porosas fácilmente ajustando parámetros cinéticos y termodinámicos. Sin embargo, debido a la complejidad de las variables implicadas en el proceso en esta técnica la estructura porosa no es controlada fácilmente. Además es difícil obtener grandes poros y pueden exhibir falta de interconexión.

Gas foaming

Tiene la ventaja del procesado a temperatura ambiente, pero produce una capa externa no porosa; y una mezcla de poros abiertos y cerrados en el centro del scaffold, dejando incompleta la interconectividad.

MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SCAFFOLDS (2/3)**Fiber bonding**

Proporcionan una gran superficie para la adhesión de células así como de una rápida difusión de nutrientes, que favorece el crecimiento y supervivencia celular. Sin embargo a estos scaffolds les falta la estabilidad estructural necesaria. Además la técnica no se presta a un fácil e independiente control de la porosidad y tamaño de poro.

Photolithography

Permite obtener disposiciones estructurales con gran precisión, aunque puede no llegar a ser requerida. Además, el alto coste de los equipos necesarios limitan su aplicabilidad.

MÉTODOS DE FABRICACION DE SCAFFOLDS (3/3)**Solid Free Form (SFF)**

Proporciona un excelente control sobre la forma externa, geometría e interconectividad interna de los poros, pero ofrece una resolución limitada a escala micrométrica. Además el tamaño mínimo de los poros globales es de 100 μm . Asimismo, requiere una complicada corrección del diseño del scaffold debido a la contracción anisótropa durante la fabricación, así como equipamientos algo costosos.

Solvent casting in combination with particulate leaching

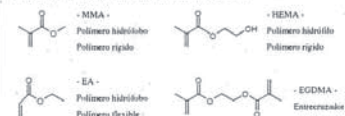
Este método es barato pero aún tiene que superar algunas desventajas para encontrar aplicaciones en ingeniería, principalmente el problema de restos de porógeno, formas de poro irregulares y una insuficiente interconectividad entre otros.

OBJETIVOS

- Desarrollar un nuevo método para fabricar scaffolds porosos 3D para la ingeniería de tejidos que supere las dificultades de los métodos antes mencionados.
- Obtener poros de forma similar a los anteriores, en 2D; para evaluar la influencia de la arquitectura espacial en el desarrollo de cultivos celulares en estos scaffolds.

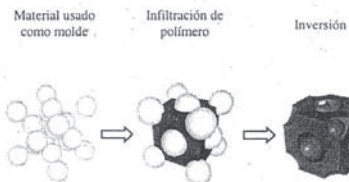
MATERIALES

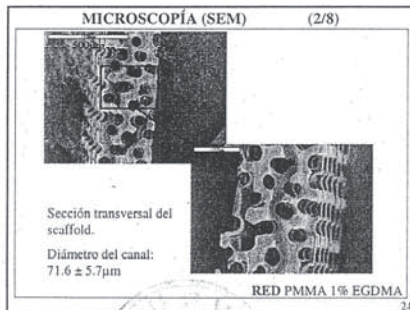
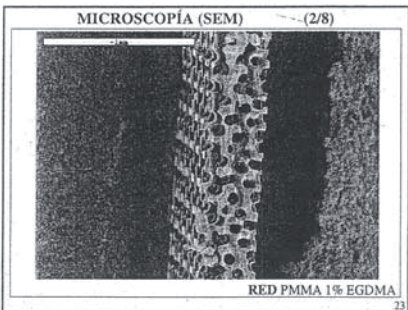
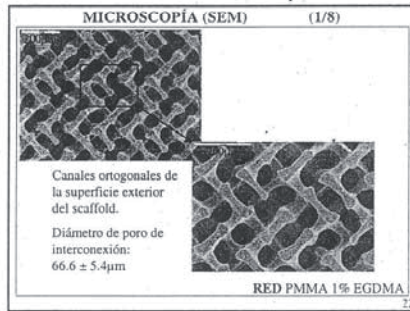
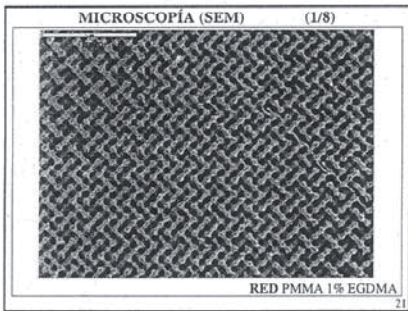
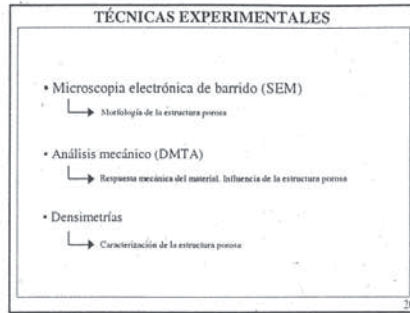
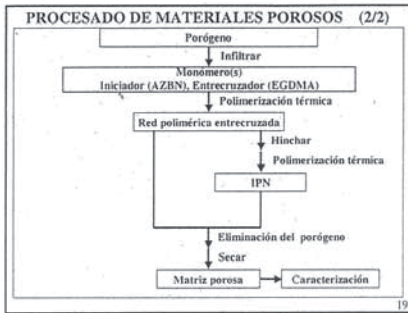
Monómeros : MMA, EA, HEMA, EGDMA



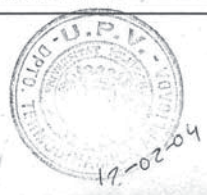
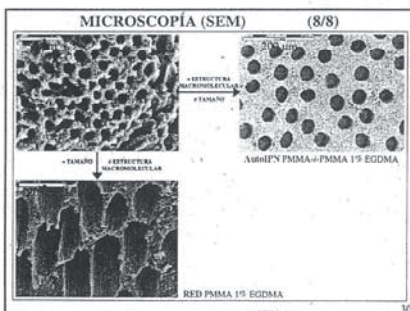
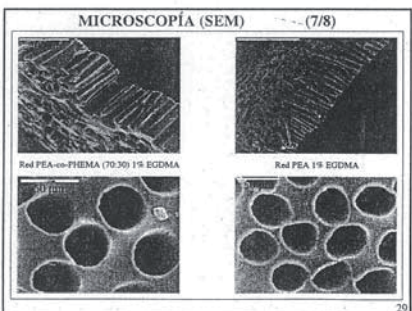
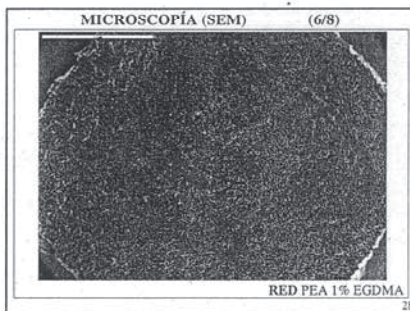
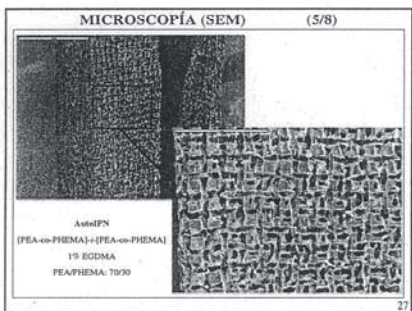
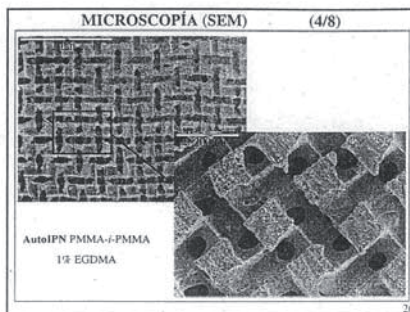
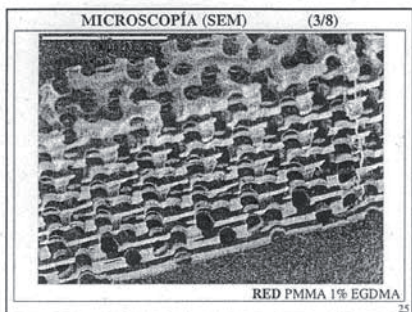
Polímeros: REDES, IPN, AutoIPN, copolímeros

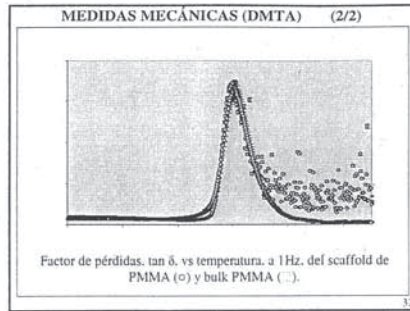
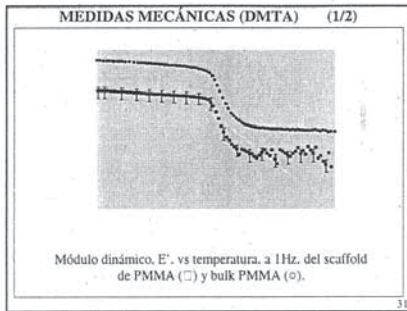
↳ HIDROGELES

PROCESADO DE MATERIALES POROSOS (1/2)



12-02-04





- DENSIMETRÍAS**
- Se han llevado a cabo sobre el scaffold 3D de PMMA.
 - Las medidas de porosidad se han determinado a partir de los valores de densidad aparente de los scaffolds.
 - La porosidad resultante, para esta arquitectura es del 80%.
- 33

- CONCLUSIONES (1/2)**
- Ha sido desarrollado un nuevo método sencillo y barato de producir scaffolds con arquitecturas 3D.
 - Este método permite obtener formas y ordenamientos de poro altamente regulares con una interconexión completa, que da lugar a estructuras estables mecánicamente sin residuos de porógeno.
 - Estos scaffolds son la estructura inversa de un template. Como resultado, se obtienen canales cilíndricos ortogonales, los cuales están paralelamente alineados e interconectados.
- 34

- CONCLUSIONES (2/2)**
- Se pueden obtener diferentes grados de porosidad y de tamaño de canales.
 - Las estructuras son estables durante el lixiviado del porógeno.
 - Estas estructuras se pueden producir en diferentes combinaciones de materiales, ajustando así la relación de comportamiento hidrófilo/hidrófobo en el scaffold.
- 35

- POSIBLES APLICACIONES**
- Soporte físico para cultivo celular
 - Regeneración de nervios
 - Cultivo de condrocitos
 - Anillo soporte para prótesis de córnea
 - Membranas y filtros
- 36



Futuros Desarrollos





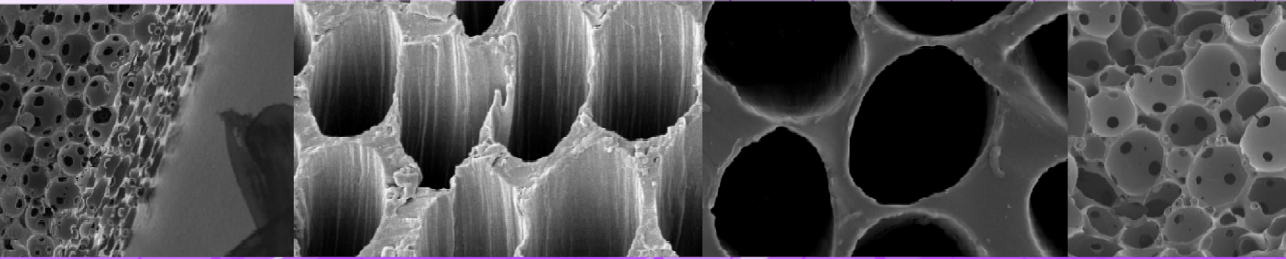
D. ÀNGEL BERNA PRATS, CATEDRÀTICO DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CERTIFICA: que la memoria titulada "Síntesis y caracterización de *scaffolds* poliméricos para la ingeniería de tejidos", que para aspirar al grado de Doctora en Ingeniería Química presenta D^a Laura Santos Esteve, se ha realizado bajo mi dirección. Asimismo, considera que el trabajo cumple las condiciones adecuadas para su aceptación como Tesis Doctoral, por lo que

AUTORIZA: a la interesada a su presentación en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos, presento la referida memoria, firmando el presente certificado en Valencia a de de .

Fdo. D. Àngel Berna Prats



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA (O₂)

