

DISEÑO Y PREPARACIÓN DE MATRICES POLIMÉRICAS POROSAS PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

*Gustavo A. Abraham, Pablo C. Caracciolo, Fabián A. Buffa
y Teresita R. Cuadrado*

Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA) (UNMdP-CONICET),
Av. Juan B. Justo 4302, B7608FDQ Mar del Plata, Argentina.
E-mail: gabraham@fi.mdp.edu.ar

Resumen

La ingeniería de tejidos constituye actualmente una de las áreas de investigación multi e interdisciplinaria más atractivas. El tratamiento de diversas lesiones mediante la reparación o regeneración de tejidos funcionales y órganos ofrece una alternativa a la cirugía reconstructiva y al trasplante de órganos. Entre otros componentes fundamentales, la ingeniería de tejidos requiere biomateriales específicos, tales como andamiajes o matrices extracelulares artificiales altamente porosas, con capacidad para estimular las funciones celulares de adhesión, migración, crecimiento, diferenciación y organización de tejidos. Los factores que gobiernan las propiedades de las matrices son complejos e incluyen la composición química, arquitectura espacial, propiedades mecánicas y superficiales, degradación y composición de los componentes biológicos y el cambio de estos factores con el tiempo. Las matrices deben proporcionar inicialmente propiedades mecánicas adecuadas para sustituir la función mecánica del tejido dañado. Además, la arquitectura de la matriz tiene que permitir la fijación celular y posterior migración dentro de la matriz, transferencia de masa de metabolitos y suficiente espacio para la vascularización y remodelación de la matriz de tejido organizado. En este trabajo se presentan las claves principales del diseño y preparación de matrices poliméricas, las últimas estrategias desarrolladas y los nuevos desafíos que se plantean en este campo. Asimismo se describen y analizan diversos aspectos relacionados con los biomateriales poliméricos y las técnicas de procesamiento de matrices, enfocando el tema desde la visión de la ciencia e ingeniería de biomateriales.

Palabras clave: Andamiajes porosos, Matrices poliméricas, Procesamiento, Ingeniería de tejidos.

Abstract

Design and preparation of porous polymer scaffolds for biological tissue engineering. Nowadays, tissue engineering is one of the most attractive interdisciplinary and multidisciplinary research fields. The treatment of several lesions by repairing or regenerating functional tissues and organs offers an alternative for reconstructive surgery and organ transplantation. Among other main components, tissue engineering requires of specific biomaterials, such as highly-porous artificial extracellular matrices or scaffolds, with the ability to stimulate the cellular functions of adhesion, migration, growth, differentiation and tissue organization. The factors governing scaffold properties are complex and include chemical composition, architecture, mechanical and surface properties, degradation and composition of the biological components, and the changes in these factors with time. Scaffolds must provide sufficient initial mechanical properties to substitute the mechanical function of the diseased or damaged tissue. Moreover, the scaffold architecture has to allow cell attachment and subsequent migration into the matrix, mass transfer of metabolites, and sufficient space for development of a vascular network and remodelling of organized tissue matrix. In this work, the main key elements about the design and preparation of polymeric scaffolds, the latest developed strategies, and the new challenges in this field, are presented. Several aspects related to polymeric biomaterials and polymer-scaffold processing techniques are also described and analyzed, focussing the discussion from the biomaterials science and engineering point of view.

Key words: Scaffolds, Polymer matrices, Processing, Tissue engineering.

Aproximaciones terapéuticas actuales para el reemplazo de tejidos u órganos

Cada año se realizan millones de procedimientos quirúrgicos que requieren el uso de tejidos u órganos sustitutos para reparar o reemplazar a los que sufren alguna patología o están dañados. Entre las aproximaciones convencionales se encuentran el autoinjerto, aloinjerto, xenoinjerto y el empleo de biomateriales o dispositivos biomédicos [18].

El autoinjerto (*autografting*) involucra la extracción de tejido sano (biopsia) para transplantarlo en otra parte del mismo paciente (autoplastia). La utilización de tejidos autólogos conduce a los mejores resultados clínicos, evitando el rechazo inmunológico y el deterioro que producen los efectos laterales de la medicación inmunosupresiva. El *bypass* coronario y la estabilización de columna vertebral mediante fusión vertebral con hueso de cresta ilíaca representan dos ejemplos típicos de reconstrucción quirúrgica. Sin embargo, los tejidos de reemplazo no cumplen todas las funciones del tejido original y existen otros problemas asociados tales como complicaciones a largo plazo, costos adicionales, infección y dolor post-operatorio.

El procedimiento de extracción de tejidos u órganos de un donante fallecido o vivo para su trasplante a un paciente se denomina aloinjerto (*allografting*). El trasplante de órganos o partes de órganos permite el tratamiento de enfermedades terminales de corazón, riñón, hígado, pulmón y páncreas. Aunque la tecnología de trasplantes ha mejorado notablemente en las últimas décadas con el desarrollo de drogas anti-rechazo, el problema principal reside en la escasa disponibilidad de donantes.

Una tercera aproximación involucra el implante de tejidos de otras especies (xenoinjerto o *xenografting*) convenientemente tratados para reducir las reacciones de antigeneicidad, eventos de trombosis, calcificación, etc. Ejemplos son la utilización de pericardio bovino como válvula cardíaca, y la piel porcina liofilizada para la cobertura temporal de quemaduras hasta que sea posible la realización del autoinjerto.

La ciencia e ingeniería de biomateriales ha permitido el desarrollo de materiales y dispositivos biomédicos para reemplazar, aumentar o extender diversas funciones realizadas por los sistemas biológicos [11, 18, 38, 39, 49]. Los ejemplos son numerosos y van desde dispositivos de asistencia cardíaca hasta prótesis de cadera o implantes mamarios. Sin embargo, los materiales empleados en estas terapias están sujetos a fatiga, desgaste, fractura, corrosión, degradación, y no se remodelan con el tiempo, fenómenos que llevan

a una duración limitada del material. Asimismo, existe el riesgo de infección, toxicidad, inflamación e irritación crónica. Por último, los dispositivos actuales carecen de un comportamiento fisiológico como tejidos u órganos y algunos pueden emplearse solamente en terapias temporarias como puente hasta el trasplante.

Breve introducción a la ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos (*tissue engineering*) ha surgido en la última década del siglo pasado como una aproximación alternativa para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales para la regeneración tisular [23]. Si bien la ciencia e ingeniería de biomateriales ha introducido notables mejoras en el campo de la medicina de sustitución y enormes beneficios para los pacientes, la recuperación funcional resulta incompleta y cada sistema lleva asociada una vida útil limitada. Esta limitación produce uno de los principales problemas mundiales en el sistema de salud. La expectativa de vida se ha cuadruplicado en los últimos tres siglos y como consecuencia han surgido numerosos incidentes que las terapias actuales no pueden resolver. El problema de la falla de órganos o el reemplazo de tejidos tiende a agravarse anualmente debido a la falta de disponibilidad de los mismos y a la dificultad del control de los fenómenos de rechazo. En este contexto resulta necesario generar conocimiento básico y aplicado y desarrollar tecnologías y metodologías para sobrellevar la demanda cada vez más imperiosa de tejidos biológicos tales como huesos, cartílagos, articulaciones, nervios, piel, ligamentos, tendones, córneas, órganos bioartificiales (hígado, páncreas), etc. Los importantes avances en el campo de la biología molecular sobre el conocimiento de los mecanismos de regeneración y los nuevos logros de la biotecnología para el cultivo de tejidos a gran escala y la producción de factores de crecimiento constituyen hoy en día la fuerza impulsora para la promoción y desarrollo de la ingeniería de tejidos como un campo multi e interdisciplinario [20, 24, 28, 34]. En este sentido, la ingeniería de tejidos se define como la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que reemplacen, regeneren, restauren o mejoren a diversos tejidos funcionales. Los conceptos de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa aparecen numerosas veces en la literatura como sinónimos, comparando alcances y objetivos. Sin embargo, recientemente se ha propuesto una definición de medicina regenerativa con objetivos propios y claramente determinados, en donde la ingeniería de

tejidos se enmarca como uno de sus principales componentes, junto con la ciencia de materiales, la biología molecular y de células madre, y la genética [10].

Las estrategias de la ingeniería de tejidos generalmente se dividen en dos categorías [5]: el uso de matrices acelulares, que dependen de la habilidad natural del cuerpo para regenerar el nuevo tejido (Figura 1a), y el uso de matrices con células (Figura 1b). Las matrices acelulares pueden prepararse empleando andamiajes artificiales o mediante la remoción de componentes celulares de tejidos para producir matrices ricas en colágeno. Las células también pueden emplearse con fines terapéuticos y el tejido autólogo es la principal fuente celular y la preferida, aunque en algunos casos se recurre a tejido alogénico o heterólogo. Existen también nuevas tecnologías entre las que se incluyen células madre (de origen embrionario humano, fetal o adulto) [13], la terapia de genes, la clonación terapéutica y la extracción de tejidos y órganos de animales transgénicos [27]. Sin embargo, la clonación terapéutica y la terapia génica involucran diversos aspectos técnicos, económicos, políticos, religiosos y éticos que están en discusión y que deben resolverse antes de estar disponibles como metodologías maduras para aplicaciones clínicas.

Para el uso de matrices con células se requiere: i) la apropiada selección, aislamiento y cultivo de las células primarias (induciendo su diferenciación en fenotipos específicos); ii) la expansión mediante cultivo celular (condiciones estáticas, cultivo en biorreactores específicamente diseñados, o sin cultivo previo e implante directo por inyección de células con o sin un portador inyectable, como por ejemplo un hidrogel); iii) el diseño de una matriz soporte adecuada para la fijación de las células, incluyendo la selección de los materiales apropiados y las metodologías de procesamiento; iv) el uso de modelos animales adecuados que permitan probar *in vivo*, luego de los análisis *in vitro* y antes de los ensayos clínicos, la eficacia de las diferentes aproximaciones seguidas minimizando los ensayos con animales [15].

En el medio biológico, las células reciben constantemente estímulos mecánicos, eléctricos, químicos y estructurales que modulan el comportamiento celular para crecer y formar tejidos funcionales u órganos. Si estas señales externas no se reciben o no se procesan adecuadamente, las células no se diferencian, se desorganizan y eventualmente mueren. En la mayoría de los tipos celulares encontrados en los mamíferos la adhesión celular a un sustrato es fundamental para su supervivencia. El estímulo estructural involucra la interacción de las células con su matriz

extracelular. Esta comunicación resulta esencial para la actividad celular normal e impacta directa e indirectamente en la función y forma celular. Los estímulos están mediados por factores de crecimiento, moléculas proteicas que cumplen una acción regulatoria específica en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los tejidos.

El uso de células aisladas o la liberación controlada de factores de crecimiento y diferenciación están limitados solamente al tratamiento de defectos muy pequeños y bien contenidos, por lo que no son apropiados para la regeneración de tejidos con la escala de tamaños prácticos y forma predeterminada. El empleo de biomateriales juega un rol temporario pero crucial en el diseño ingenieril de tejidos u órganos y, desde los últimos años, se perfila como una estrategia activa que muestra constantes avances en los campos de síntesis, caracterización, propiedades, procesamiento y aplicaciones.

Los biomateriales en ingeniería de tejidos

El principal rol de los biomateriales (matrices, sustratos, andamiajes o *scaffolds*) en ingeniería de tejidos consiste en replicar las funciones biológicas y mecánicas de la matriz extracelular nativa encontrada en el organismo humano, sirviendo como matriz extracelular artificial. En esta aplicación los biomateriales cumplen una serie de funciones importantes: i) proporcionan un espacio tridimensional y una superficie adecuada para la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular, funciones celulares que permiten estructurar espacialmente poblaciones de células de tejidos concretos; ii) favorecen la liberación de factores bioactivos en los lugares deseados, tales como péptidos para adhesión celular, factores de crecimiento, y otros que participan en la regulación de la función celular; iii) proporcionan un soporte mecánico temporario contra las fuerzas a las que está sometido *in vivo*, manteniendo la integridad de la estructura tridimensional predefinida durante el desarrollo del tejido y degradando sin impedir el crecimiento del tejido. La Tabla I muestra las funciones que cumplen los biomateriales en la regeneración de tejidos y órganos.

La selección de un material apropiado es la primera y crítica consideración a realizar en ingeniería de tejidos. Dado que la biocompatibilidad es un requisito esencial, el material no debe provocar potencialmente ninguna respuesta biológica no deseada en células o tejidos detectada inmunológica o clínicamente y debe poseer una calidad química superficial que promueva la fijación y función celular. Asimismo, los productos de degradación deben ser no tóxicos y elimi-

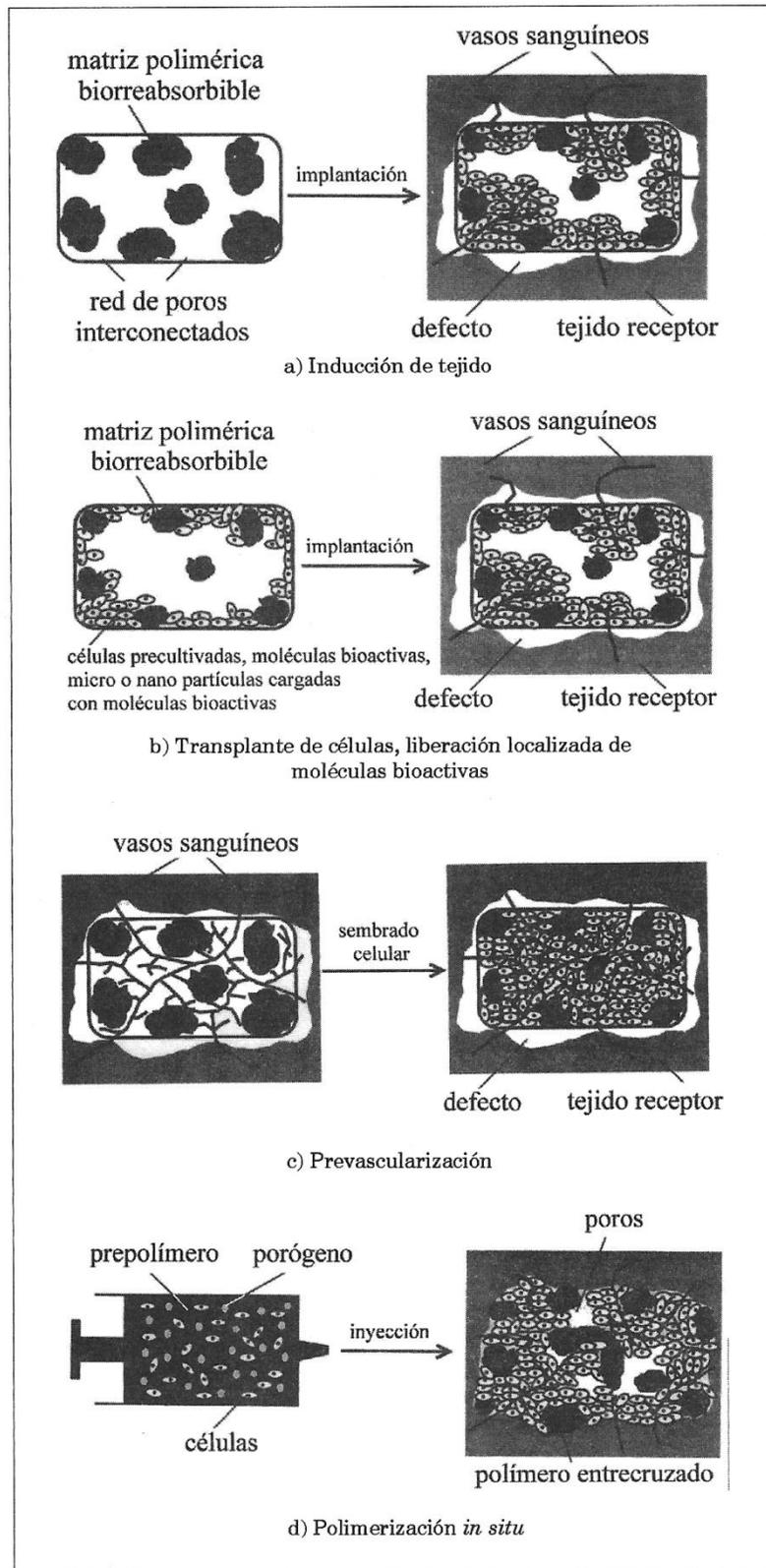


Fig. 1. Aplicaciones de los polímeros biorreabsorbibles como matrices porosas tridimensionales en ingeniería de tejidos

nados del organismo una vez que se ha regenerado el tejido buscado. Entre los materiales que reúnen estas características básicas y que pueden emplearse potencialmente en ingeniería de tejidos se incluyen polímeros naturales, sintéticos o semisintéticos, algunos cerámicos y materiales compuestos polímero/cerámico (Tabla II). La necesidad de biodegradabilidad y naturaleza frágil excluye el uso de metales y la mayoría de los cerámicos, que además poseen una procesabilidad muy limitada.

Los términos biodegradable, biorreabsorbible, bioerosionable y bioabsorbible, se emplean muchas veces en forma poco rigurosa y confusa. En numerosos trabajos publicados en la literatura se utiliza el término "biodegradable" de manera indistinta y general. Por ese motivo resulta importante efectuar una definición de términos [47]:

- **Biodegradable** (*biodegradable*): material polimérico sólido o dispositivo que se descompone debido a degradación macromolecular con dispersión *in vivo* pero sin eliminación del cuerpo (esta definición excluye la degradación ambiental, por hongos o bacterias). El sistema polimérico puede ser atacado por elementos biológicos de tal manera que la integridad del sistema se afecta generando fragmentos o subproductos de degradación. Estos fragmentos pueden moverse fuera del sitio de acción pero no necesariamente eliminarse del cuerpo.

- **Biorreabsorbible** (*bioresorbible*): material que experimenta una degradación en masa y además se reabsorbe *in vivo* mediante eliminación por rutas metabólicas: filtración de subproductos de degradación o después de la metabolización. La biorreabsorción implica la elimina-

Tabla I. Función de los biomateriales en ingeniería de tejidos

Rol del biomaterial	Función
Matriz extracelular artificial (andamiaje poroso)	Proporciona el ambiente necesario para que ocurra una apropiada regulación del comportamiento celular (adhesión, proliferación, migración y diferenciación)
Espaciador	Mantenimiento del espacio para la regeneración de tejidos y soporte mecánico temporario
Barrera	Prevención de la infiltración de tejido fibroso
Regulador de patrón	Guía de los tejidos regenerados
Depósito	Liberación sostenida de factores de crecimiento y otros principios bioactivos
Suministro de nutrientes	Suministro de nutrientes y oxígeno a las células
Inmuno-aislador	Supresión del ataque inmune del huésped

Tabla II. Tipos de biomateriales empleados en ingeniería de tejidos

Biomateriales	Ejemplos
Polímeros naturales	Colágeno, glicosaminoglicanos, gelatina, seda, ácido hialurónico, quitina, quitosano, alginato Poli (α -hidroxiácidos): poli(ácido glicólico) PGA, poli(ácido láctico) PLA, PLLA, PDLLA, y sus copolímeros PLGA Otras polilactonas: poli(ϵ -caprolactona) PCL, poli(δ -valerolactona) PVL, Polidioxanona (PDO)
Polímeros sintéticos	Poli(β -hidroxiácidos): PHB, PHV y copolímeros PHBV, Policarbonatos (PTMC), polianhidridos Poliortoésteres, polifosfoésteres, polifosfacenos Poli(éster uretanos), poli(ésteruretano ureas) Hidrogeles: poli(óxido de etileno) (PEG o PEO), polivinil alcohol (PVA), poli(hidroxietyl metacrilato) (PHEMA), poliacrilamidas, copolímeros en bloque de óxido de etileno con óxido de propileno (Pluronic) o PEO-PLA
Biocerámicos	Fosfato tricálcico (α - o β -TCP), fosfato tetracálcico (TTCP), fosfato octacálcico (OCP), hidroxiapatita no sinterizada

ción total del material extraño inicial y de los subproductos de degradación (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos laterales residuales.

- **Bioerosionable** (*bioerodible*): material que se degrada en superficie y además se reabsorbe *in vivo*. La bioerosión también implica eliminación total del material.

- **Bioabsorbible** (*bioabsorbable*): material que puede disolverse lentamente en los fluidos corporales sin ninguna escisión de la cadena polimérica o disminución del peso molecular. Un polímero bioabsorbible puede ser biorreabsorbible si las macromoléculas dispersadas se eliminan completamente.

Las macromoléculas naturales, como por ejemplo proteínas o polisacáridos, poseen la potencial ventaja del reconocimiento biológico y pueden simular más apropiadamente el medio celular nativo. Sin embargo, en el proceso de aislamiento de los biopolímeros de los tejidos biológicos se produce una alta variabilidad entre lotes, problema que constituye la principal limitación para su aplicación de manera más extensiva. Los soportes preparados a partir de polímeros naturales tales como colágeno y quitina poseen pobres propiedades mecánicas para determinadas aplicaciones, no pueden fundirse fácilmente y requieren disolventes especiales para su procesamiento.

Los polímeros sintéticos pueden producirse de manera reproducible a gran escala y con propiedades controladas (Tabla III). Los poli(α -hidroxiésteres) y copoliésteres de los ácidos láctico y glicólico, presentan algunas ventajas e interesantes propiedades. Poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polidioxanona (PDO), y los copolímeros de éstos se encuentran entre los pocos polímeros sintéticos biorreabsorbibles que poseen aprobación en EEUU (*Food and Drug Administration, FDA*). Los PLA son los biomateriales sintéticos más usados. En el caso de copolímeros, la relación de monómeros permite obtener un amplio espectro de propiedades físicas y tiempos de degradación. La PCL es un poliéster lineal alifático biocompatible que posee un extenso tiempo de degradación, del orden de dos años, propiedad atractiva para aplicaciones de largo plazo y liberación controlada de fármacos. Los copolímeros de ϵ -caprolactona con ácido láctico, dioxanona, trimetilencarbonato (TMC) y otros monómeros presentan mayor velocidad de biorreabsorción.

Estos materiales también poseen algunas limitaciones. La liberación masiva *in vivo* de subproductos de degradación y reabsorción ácidos puede inducir reacciones inflamatorias. Si la capacidad del tejido circundante para eliminar los

subproductos es baja, debido a una actividad metabólica baja o a una vascularización pobre, la composición química de estos subproductos puede producir una alteración local temporaria. Un ejemplo es el aumento de pH o de presión osmótica, observados en los implantes de PGA aplicados en cirugía ortopédica. En general los poliésteres poseen una rigidez relativamente alta, muy conveniente para aplicaciones que deben soportar cargas, pero una dificultad cuando se desea su aplicación en tejidos blandos o vasos sanguíneos. Además, ninguno de los poliésteres tradicionales posee una cadena pendiente químicamente reactiva para la fijación de fármacos, agentes de entrecruzamiento y grupos biológicamente activos. En consecuencia, los poli(α -hidroxiésteres), polímeros simples que fundaron las bases de la ingeniería de tejidos y se consideran materiales modelo, no satisfacen completamente las condiciones óptimas para su uso como soportes poliméricos de células. El comportamiento conservador de la comunidad científica ha creado dificultades para el desarrollo de nuevos materiales con mejores propiedades y específicamente diseñados para aplicaciones en ingeniería de tejidos [15].

El empleo de poliésteres en la formulación de poli(ésteruretanos) y poli(ésteruretano ureas) proporciona biorreabsorbibilidad y al mismo tiempo propiedades mecánicas adecuadas para tejidos blandos (alta elasticidad, ductilidad y tenacidad). Los esfuerzos recientes se han centrado en el desarrollo de poliuretanos empleando diisocianatos alifáticos no tóxicos y nuevos extendedores de cadena, algunos de ellos derivados de aminoácidos [2, 9, 31]. Otros polímeros sintéticos tales como polipropilénfumarato (PPF) [14], policarbonatos y poliariatos derivados de tirosina [22], polipéptidos basados en PLA, poli(L-ácido láctico-co-L-ácido aspártico) y derivados de poli(etilenglicol) (PEG) y ácido láctico, con grupos funcionales laterales, se han propuesto como nuevos biomateriales para ingeniería de tejidos. Estos materiales están por recibir la aprobación de la FDA y pronto aparecerán en el mercado [51].

Los avances en la ingeniería de materiales poliméricos ofrecen nuevas oportunidades para cirugías mínimamente invasivas, que disminuyen el trauma ocasionado al paciente mediante cirugía artroscópica y el tiempo de recuperación. Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de biomateriales biorreabsorbibles inyectables polimerizables *in situ* (Figura 1d). Este método permite rellenar cavidades defectuosas irregulares y de difícil acceso, inyectando oligómeros funcionalizados en el sitio del defecto a través de una pequeña incisión. Posteriormente la polimerización permite encapsular células y

Tabla III. Propiedades de algunos polímeros sintéticos biorreabsorbibles

Polímero	Estructura	T _g ^a (°C)	T _m ^b (°C)	E ^c (GPa)	σ ^d (MPa)	ε ^e (%)	Degr. ^f (meses)
PGA	-O-CH ₂ -CO-	35-40	225	7,0	75	~ 0	6-12
PLLA	-O-CH(CH ₃)-CO-	60-65	180	2,7	45	3	18-24
PDLLA	-O-CH(CH ₃)-CO-	55-60	-	1,9	s.d.	s.d.	12-16
PLGA	Copolímero PLLA y PGA	45-55	-	1,4-2,8	41-55	3-10	ajustable
PCL	-O-(CH ₂) ₆ -CO-	-60	60	0,4	22	>500	>24
PDO	-O-(CH ₂) ₂ -O-CH ₂ -CO-	-14	110	1,5	36	s.d.	4-6
PTMC	-O-(CH ₂) ₃ -CO-	-15	52	0,003	0,5	160	4-8
PHB	-O-CH(CH ₃)-CH ₂ -CO-	5	175	2,3	26	3	s.d.

a) Temperatura de transición vítrea; b) Temperatura de fusión; c) Módulo de Young; d) Resistencia a la rotura en tracción; e) Deformación a la rotura en tracción. f) Tiempo de degradación hasta completar la pérdida de masa, depende de la geometría. s.d.: sin datos

principios bioactivos. Algunos sistemas inyectables se pueden entrecruzar por vía química sin la necesidad de emplear fotopolimerización, técnica de uso limitado a cavidades o grietas no muy profundas. El empleo simultáneo de agentes porogénicos permite la generación de matrices porosas una vez que el material ha entrecruzado. El polipropilénfumarato (PPF) es uno de los poliésteres insaturados más estudiado como biomaterial inyectable para ingeniería de tejidos óseos [8]. La degradación del copolímero produce ácido fumárico, presente en el ciclo de Krebs y 1,2-propanodiol, sustancia presente comúnmente en formulaciones de diversos fármacos como diluyente. La presencia de insaturaciones se emplea para generar puntos de entrecruzamiento. Se han efectuado numerosos estudios con copolímeros de PPF y diversos entrecruzantes hidrofílicos, así como también en formulaciones compuestas con materiales biocerámicos tales como TCP, HA, carbonato o sulfato de calcio, para mejorar las propiedades mecánicas [46].

Se están explorando otras técnicas para aplicaciones mínimamente invasivas, tales como polímeros sensibles a estímulos (*stimuli responsive polymers*), polímeros con memoria de forma (*shape-memory polymers*) y sistemas de péptidos autoensamblados (*self-assembling peptide-based systems*) [45].

Los hidrogeles sensibles a estímulos externos, también conocidos como hidrogeles «inteligentes», son redes poliméricas que pueden sufrir una transición de fase discontinua y macroscópica entre el estado líquido y sólido cuando se someten a un pequeño cambio en una o más condiciones ambientales. El estímulo específico puede introducirse por diferentes mecanismos: magnético, eléctrico, ultrasonido, irradiación, o estímulos fisiológicos como cambios de pH,

temperatura, concentración salina o enzimática. El uso de hidrogeles evita las complicaciones asociadas con residuos de solventes tóxicos, dado que el agente de hinchamiento del hidrogel es el agua. Estas propiedades pueden mejorar la habilidad de los diseños de tejidos ingenieriles para asemejarlos a los tejidos humanos naturales y entonces efectuar un mejor funcionamiento *in vivo* e *in vitro* [12]. El empleo de polímeros termosensibles ha permitido la preparación de láminas celulares bidimensionales para reconstrucción de superficies oculares, ligamentos periodontales, parches cardíacos y cistoplastia (reconstrucción de vejiga). En esta aproximación, denominada ingeniería de láminas celulares (*cell sheet engineering*), se injerta covalentemente en una placa de petri una membrana de un hidrogel sensible a cambios de temperatura, con un espesor de aproximadamente 20 nm. El polímero que se utiliza más comúnmente es poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAm), hidrogel que exhibe temperatura crítica de solución inferior (LCST) cercana a la fisiológica (32-34 °C). El cultivo celular se realiza en la superficie del hidrogel a 37 °C, permitiendo a las células adherirse y proliferar. Cuando se reduce la temperatura por debajo de la LCST, la lámina celular formada se remueve espontáneamente. A esta temperatura el hidrogel cambia su conformación molecular drásticamente y la superficie relativamente hidrofóbica se torna hidrofílica, liberando la lámina celular sin necesidad de emplear enzimas proteolíticas (tripsina) [50]. Además de PNIPAm se han desarrollado otros materiales sintéticos sensibles a la temperatura copolimerizando monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos que alteran el balance hidrofílico-hidrofóbico y de esta manera modulan los valores de LCST.

Los hidrogeles biosensibles han ganado un notable interés no sólo en ingeniería de teji-

dos sino también en otras aplicaciones tales como diagnóstico, biosensores y liberación controlada. Estos hidrogeles responden a eventos biológicos selectivos (tales como exposición a nutrientes, factores de crecimiento, receptores, anticuerpos, enzimas o células) y desencadenan cambios en las interacciones moleculares que se expresan en respuestas macroscópicas de hinchamiento/colapso o transiciones sol-gel [43].

Los polímeros con memoria de forma tienen un potencial enorme para aplicaciones biomédicas. La idea básica consiste en la capacidad de cambiar de forma como respuesta a un determinado estímulo externo (por ejemplo temperatura, pH y luz), desde un estado comprimido en el que puede ser administrado de manera no invasiva, a un estado de mayor volumen que puede rellenar el sitio del defecto. Sin embargo, estos materiales aún no han sido aplicados en ingeniería de tejidos.

Por último, el autoensamblado molecular de proteínas y moléculas anfífilas constituye otra aproximación para efectuar la gelación *in situ* mínimamente invasiva. Esta estrategia se comenta brevemente en la sección de procesamiento.

Los biocerámicos pueden clasificarse en tres categorías: 1) cerámicos bioinertes: alúmina y zirconia; 2) cerámicos con superficie bioactiva: hidroxiapatita sinterizada (s-HA), biovidrios, vidrios de alúmina-wollastonita; 3) cerámicos biorreabsorbibles: HA no sinterizada (u-HA), α - o β -fosfato tricálcico (α - o β -TCP), fosfato tetra-cálcico (TTCP), fosfato octacálcico (OCP) [51]. Los cerámicos biorreabsorbibles exhiben biocompatibilidad y son considerados osteoconductivos, debido a que sus propiedades superficiales favorecen la adhesión, crecimiento y diferenciación de osteoblastos. Asimismo son osteoinductivos, exhibiendo la capacidad de inducir la formación de hueso, como resultado del favorecimiento de la unión y concentración de la proteína morfogenética ósea (BMP). Por este motivo los cerámicos biorreabsorbibles se emplean como material de relleno en la reparación de defectos óseos y se investigan en ingeniería de tejidos óseos. Frecuentemente los materiales cerámicos son difíciles de procesar en forma de matrices altamente porosas, son mecánicamente frágiles, y demasiado rígidos para determinadas aplicaciones. Por otra parte, los polímeros son muy dúctiles y poco rígidos. Esta diferencia en las propiedades mecánicas requeridas por los tejidos naturales que soportan cargas y los biocerámicos puede minimizarse y ajustarse empleando materiales compuestos polímero/biocerámicos biorreabsorbibles. La

elección de biocerámicos como fase de refuerzo depende de la aplicación deseada. La velocidad de biorreabsorción varía en el orden: OCP > α -TCP > β -TCP > u-HA >> s-HA y está afectada por varios factores, aumentando con el incremento del área superficial, la disminución de la cristalinidad, las imperfecciones cristalinas y el tamaño de cristal o grano, sustitución iónica, etc.

Diseño de matrices porosas para ingeniería de tejidos

Desde un punto de vista físico, las matrices o andamiajes pueden clasificarse en tres grupos: sólidos porosos celulares, textiles y sistemas inyectables. Según la terminología empleada por la ASTM [3] los sólidos porosos se clasifican también en tres grupos: interconectados (poros abiertos), no interconectados (poros cerrados) o una combinación de ambos. Ashby y Gibson [4] clasifican a los sólidos porosos en espumas y estructuras tipo "panal de abejas" (*honeycomb*), arreglos regulares bidimensionales de poros poligonales.

Las matrices porosas tridimensionales que necesitan las células para guiar su crecimiento y regenerar tejidos están hoy en día muy lejos de ser ideales. La falta de estabilidad mecánica y la falta de canales de interconexión que permitan a las células penetrar, ambos requisitos esenciales, son algunos de los numerosos factores que todavía no satisfacen las matrices actuales. Idealmente una matriz debería cumplir los siguientes requerimientos [32]:

- Ser biocompatible (requerimiento básico)
- Ser biorreabsorbible o remodelable
- Biodegradar en sincronización con el proceso de reparación o regeneración
- Poseer una porosidad adecuada, tamaño de poros apropiado e interconectividad
- Ser altamente permeable para facilitar la difusión de células y nutrientes
- Poseer estabilidad mecánica y propiedades mecánicas adecuadas
- Proporcionar una topografía y química superficial apropiada para la fijación y proliferación celular
- Favorecer la formación de matriz extracelular promoviendo las funciones celulares
- Poseer capacidad para portar principios bioactivos o factores de crecimiento

La regeneración de tejidos específicos guiada con materiales sintéticos porosos depende de la porosidad y el tamaño de poro de la matriz tridimensional. Un área superficial mayor favorece la fijación y crecimiento celular, mientras que un volumen de poro mayor permite acomodar y proporcionar una masa celular suficien-

te para la reparación de tejidos. En consecuencia, resulta necesario un alto grado de porosidad para facilitar la difusión de los nutrientes y de los productos de desecho y para lograr la vascularización de los implantes o angiogénesis (Figura 1c), requisito esencial para la regeneración de órganos altamente metabólicos como son el hígado y el páncreas. La relación área superficial/volumen de los materiales porosos depende de la densidad y el diámetro promedio de poro. El diámetro de las células en suspensión indica el tamaño de poro mínimo, que varía dependiendo del tipo de célula en particular. Diversos experimentos han demostrado que existe un tamaño de poro óptimo para la regeneración de tejidos: 5 μm para neovascularización, 5-15 μm para crecimiento de fibroblastos, aproximadamente 20 μm para crecimiento de hepatocitos, 20-125 μm para regeneración de piel, 40-100 μm para crecimiento de osteoides, 100-350 μm para regeneración de hueso, 150-300 μm para regeneración de fibrocartilago, etc. [51]. Las células responden a estímulos mecánicos (mecanotransducción) y en el caso de células residentes en una matriz los esfuerzos que experimentan dependen de las propiedades mecánicas de la matriz y del entorno que rodea a las células. Las propiedades mecánicas de la matriz están íntimamente relacionadas con su densidad. Por ejemplo, si se requiere un módulo de elasticidad en compresión suficientemente alto para estimular la diferenciación celular se debe incrementar la densidad de la matriz disminuyendo su porosidad.

Otra consideración importante es la continuidad de los poros dentro de una matriz sintética. Si los poros no están interconectados el transporte de materiales y migración celular se inhibe debido a una inadecuada recepción de nutrientes, aún si la porosidad de la matriz es alta. Las células del suministro sanguíneo mayores de 200 μm son metabólicamente inactivas o mueren si el suministro de oxígeno es bajo. Por este motivo, el cartilago, tejido que tiene una baja actividad metabólica, es uno de los pocos tejidos que se ha desarrollado en estructuras de gran tamaño. Además del tamaño de poro y la porosidad, la forma y tortuosidad de los poros pueden afectar el crecimiento de tejidos. La matriz debe actuar como un sustrato que mantenga las funciones diferenciadas sin impedir la proliferación. El cambio en el tamaño efectivo de poro con el tiempo de degradación *in vivo* es otro aspecto a tener en cuenta. En las matrices biorreabsorbibles, como es el caso de PLA y PGA, el tamaño de poro aumenta y la continuidad en la estructura porosa ya no es un obstáculo. Por otra parte, si las matrices no se degradan, el tamaño

efectivo de poro se verá reducido por la invasión de tejido fibroso en los poros y la adsorción de proteínas no específicas en la superficie del material. La velocidad de degradación debe acompañar la velocidad de tejido neoformado. En consecuencia, la cinética de degradación constituye también un factor crítico en el diseño de matrices biorreabsorbibles [51].

Procesamiento de matrices poliméricas porosas

El número de publicaciones científicas relacionadas con matrices para ingeniería de tejidos se ha incrementado notablemente en la última década, hecho que revela un alto y sostenido interés en el diseño y preparación de matrices porosas [19]. Teniendo en cuenta los requisitos indispensables que debe reunir una matriz extracelular artificial, la tecnología de procesamiento para su producción debe poseer un control importante de las propiedades macro y microestructurales. El comportamiento viscoso de los polímeros por encima de su temperatura de transición vítrea o temperatura de fusión y su solubilidad en diferentes solventes orgánicos, determina la aplicación de una amplia variedad de técnicas para preparar matrices poliméricas porosas [21, 29, 42, 51]. No existe una forma universal de crear matrices para regenerar todos los tejidos. La elección de la técnica más apropiada resulta entonces crítica y depende de cada material polimérico y la aplicación específica.

Procesado de fibras:

Mallas de fibras no tejidas (*non-woven fiber felts or mesh*): el empleo de fibras de polímeros biorreabsorbibles (PGA, PLA y otros polímeros semicristalinos) como matrices ha resultado efectivo para la regeneración de cartilago, tendón, uretra, intestino, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas y otros tejidos. Las mallas de fibras consisten en fibras individuales aglomeradas según un diseño tridimensional con poros de tamaño variable y altamente interconectados. La ventaja de estas mallas es su gran área superficial para la fijación de células y rápida difusión de nutrientes para la supervivencia y crecimiento celular. Las mallas de fibras también pueden procesarse mediante técnicas tradicionales del área textil, a partir de fibras obtenidas por extrusión, entrelazamiento y tratamientos térmicos para mejorar la estabilidad tridimensional y menor rugosidad superficial. Sin embargo, la falta de estabilidad estructural necesaria para su empleo *in vivo* y la dificultad para controlar precisamente el tamaño de poro y la porosidad constituyen importantes desventajas que condujeron

al desarrollo de la técnica de fibras unidas o interconectadas.

Fibras unidas (*fiber bonding*): en este procedimiento las fibras pueden interconectarse formando redes. Las fibras se alinean en la forma deseada y se embeben en una solución de PLLA/cloruro de metileno. Después de la evaporación del disolvente, el compuesto PLLA-PGA se calienta por encima de la temperatura de fusión del PGA. Luego de enfriar, el PLLA se elimina por disolución dejando a las fibras unidas físicamente en sus puntos de entrecruzamiento. Obviamente, esta técnica no es la más apropiada para un control más exacto de la porosidad. La elección del disolvente, inmiscibilidad de los dos polímeros y sus temperaturas de fusión relativas también limita la aplicación general de esta técnica a otros polímeros. Además, la exposición a elevadas temperaturas puede transformar las fibras de PGA en dominios esféricos, y los residuos de disolvente pueden ser peligrosos para las células y los órganos.

Técnicas de disolución de partículas:

Evaporación de solvente y disolución de partículas (*solvent casting-particulate leaching*): este método consiste en la dispersión de partículas minerales de tamaño conocido (cloruro, tartrato o citrato de sodio) o partículas orgánicas (parafina, sacarosa) en una solución polimérica. Esta dispersión se deposita sobre un molde y se liofiliza para evaporar el disolvente. Posteriormente las partículas se remueven por disolución selectiva para producir una matriz polimérica porosa. Empleando esta técnica se pueden obtener porosidad controlada de hasta 93% y diámetro de poro medio de hasta 500 μm . Una desventaja de este método es que sólo se puede emplear para membranas delgadas y piezas tridimensionales con paredes muy finas (de hasta 3 mm), debido a que de otra manera no es posible la remoción de las partículas solubles del interior de la matriz polimérica. Con esta técnica la forma del poro y la interconectividad no pueden controlarse. Además el proceso de eliminación del disolvente residual puede llevar varias semanas. Para obtener estructuras tridimensionales con formas anatómicas se emplea la técnica de laminación de membranas (*membrane lamination*), superponiendo capa por capa membranas formadas mediante evaporación de solvente y disolución de partículas (por ejemplo membranas de PLLA y PLGA). Las membranas con la forma y dimensiones adecuadas se unen entre sí empleando cloroformo en las superficies de contacto. Sin embargo, esta técnica no puede aplicarse a membranas de PGA debido a que éste es solamente soluble en solven-

tes altamente tóxicos. Por medio de la superposición de elementos estructurales definidos, tales como poros, fibras o membranas en orden estocástico, fractal o periódico se pueden obtener superestructuras tridimensionales con organización espacial anisotrópica, aunque resulta difícil controlar el tamaño de poro deseado y la estructura de poros interconectados.

Extracción de hidrocarburos porógenos (*hydrocarbon templating*): es una combinación de dos procesos de espumado diferentes, la eliminación de una fase y la precipitación de un polímero. Se emplea como agente porogénico un hidrocarburo particulado derivado de ceras no soluble en agua, que permite la formación de poros precipitando la fase polimérica. A diferencia de la eliminación de cristales de sal, en este proceso el porógeno se elimina por extracción con un solvente orgánico, por lo que no se tiene limitación de espesor y existe un mejor control de la estructura de poro, porosidad y otras características de la espuma.

Técnicas de separación de fases

Separación de fases inducida térmicamente (*thermally-induced phase separation, TIPS*): bajo determinadas condiciones, un sistema multicomponente homogéneo se torna termodinámicamente inestable y tiende a separarse en fases para disminuir la energía libre del sistema. La separación de fases líquido-líquido de una solución polimérica con temperatura crítica de disolución superior (UCST) se induce disminuyendo la temperatura. El sistema se separa en dos fases, una fase rica en polímero y otra pobre, formando una estructura bicontinua. La fase rica en polímero solidifica después de la eliminación del solvente, por ejemplo mediante sublimación, y se obtiene la matriz porosa. De esta manera, se emplean soluciones de PGA o PLA en dioxano y agua para preparar las matrices porosas. Una ventaja importante de esta técnica es la posibilidad de incorporar moléculas bioactivas a las matrices sin disminuir la actividad de las moléculas por medio térmico o químico. Un pequeño cambio en los parámetros del proceso: (tipo de polímero, concentración de la solución polimérica, relación disolvente/no disolvente y principalmente el programa térmico), puede afectar significativamente la morfología del soporte poroso resultante.

La separación sólido-líquido (formación de fase sólida en una fase líquida) puede realizarse mediante cristalización del solvente en una solución polimérica. Luego de la eliminación de los cristales de solvente, mediante sublimación o intercambio de solvente, se producen poros en el espacio originalmente ocupado por los cristales de

solvente. Esta técnica, conocida como liofilización (*freeze-drying*), permite obtener matrices con porosidad de hasta 90% y tamaño medio de poro en el rango de 15 a 35 μm . Para introducir poros de mayor tamaño se emplean técnicas combinadas con disolución de partículas (*freeze-drying - particulate leaching*).

Inversión de fases y remoción de partículas (*phase inversion - particulate leaching*): esta técnica se emplea para obtener soportes con un alto grado de macroporosidad interconectada que mimetiza la estructura del hueso trabecular. El proceso involucra la dispersión de un agente porogénico (normalmente cristales de glucosa) en una solución de PLGA en dimetilsulfóxido. La mezcla se congela en un molde y luego se agrega un no solvente del PLGA (por ejemplo agua). Este no solvente produce la separación de fases del PLGA y su solidificación. El agua también solvata al porógeno produciendo su eliminación por disolución. Como en otros casos, los parámetros críticos pueden modificarse para obtener diferentes estructuras.

Separación de fases inducida por polimerización (*polymerization-induced phase separation*): el monómero se comporta como un disolvente de la cadena radical propagante hasta que la cadena polimérica resulta insoluble en agua pero soluble en el monómero remanente. La separación de fases de estas gotas de monómero/polímero forma esferas que gelan generando un soporte con interconexión al azar. El monómero puede modificarse para incluir proteínas o secuencias peptídicas que favorecen la adhesión celular. Los hidrogeles fabricados por medio de este proceso incluyen el poli(hidroxipropil metacrilato) en acetona y poli(2-hidroxietil metacrilato) en agua.

Otras técnicas alternativas

Moldeo en fundido (*melt molding*): en este procedimiento se coloca en un molde de teflón una mezcla de polvo fino de PLGA y microesferas de gelatina y se calienta por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero. Luego se disuelve la gelatina con agua destilada dejando una matriz de PLGA porosa. En este caso, el tamaño de poro está directamente controlado por el diámetro de las microesferas, y los cambios de porosidad dependen de la relación polímero/gelatina. Esta técnica puede aplicarse a los poliésteres semicristalinos PLLA o PGA, pero se requiere mayor temperatura para alcanzar la fusión. La utilización de altas temperaturas impide la incorporación de fármacos y la gelatina se torna insoluble en agua. La combinación con la técnica de evaporación de solvente y disolución de

partículas constituye una variación interesante. En primer lugar se obtienen composites de sal y PLGA por evaporación de solvente, se corta la membrana obtenida en piezas de menos de 5 mm de longitud y luego se moldean por compresión en la forma tridimensional deseada. Finalmente se disuelve la sal dejando lugar a la espuma polimérica. De esta manera se obtiene una distribución de poros más uniforme que la obtenida por evaporación de solvente y disolución de partículas, logrando matrices de mayor espesor.

Agregación de micropartículas (*micro-particle aggregation*): consiste en la agregación de micropartículas poliméricas por métodos físicos o químicos. La porosidad obtenida en este tipo de matrices puede controlarse fácilmente por el diámetro de las microesferas, las que crean intersticios cuando las partículas se agregan. Estas matrices pueden servir como portadores de agentes bioactivos reteniendo en los intersticios, por ejemplo, factores de crecimiento que pueden liberarse en forma gradual en condiciones fisiológicas. Esta aproximación es innovativa y proporciona una funcionalidad importante, aunque se obtiene una baja porosidad. El empleo de macropartículas genera una porosidad mayor, y la incorporación de una fase bioactiva de refuerzo, en general de hidroxiapatita, mejora las propiedades mecánicas favoreciendo la osteoconducción y osteoinducción.

Espumado de compuesto polímero-cerámico (*polymer-ceramic composite foam*): esta técnica permite preparar matrices con una resistencia a la compresión superior a la de los materiales no reforzados con la misma porosidad, por lo que resultan de interés para aplicaciones en regeneración de tejidos óseos. Se incluyen fibras cortas o partículas de hidroxiapatita y un agente porogénico (microesferas de gelatina o cristales de sal) en una solución de, por ejemplo, PLGA y cloruro de metileno. Después de la evaporación del disolvente, la eliminación del porógeno permite la obtención de espumas compuestas de celda abierta con PLGA reforzado con fibras de HA.

Espumado por gas a alta presión (*high-pressure gas foaming*): se exponen discos de PLGA a una alta presión de dióxido de carbono (5,5 MPa, 25 °C) para permitir la saturación de gas en el polímero. La reducción de la presión de gas a la presión ambiente produce la nucleación y expansión del dióxido de carbono disuelto, generando macroporos. Este proceso genera una superficie no porosa y una estructura mayormente formada por poros cerrados, morfología que no resulta conveniente para el sembrado celular. Por lo tanto debe combinarse con la técnica de

eliminación de partículas para generar los poros abiertos.

Técnicas de diseño de arquitecturas tridimensionales

Tecnologías de procesamiento mediante modelado rápido (*rapid prototyping, RP* o *solid free-form, SFF*): permiten la fabricación de matrices con un control muy preciso de la micro y macroestructura, produciendo piezas tridimensionales de geometría compleja a partir de multicapas y empleando programas de diseño asistido por computadora (CAD/CAM) [52]. De esta manera, se puede controlar la morfología, geometría y forma total de la matriz, permitiendo la creación de andamiajes que se ajustan a los sitios con defectos anatómicos a partir de la imagen obtenida mediante tomografía computada del paciente.

Entre las técnicas reunidas en este grupo se encuentran: laminación (*sheet lamination, laminate objet manufacturing, LOM*), impresión tridimensional (*adhesion bonding, 3DP*), sinterizado por láser (*laser sintering*), fotopolimerización (*photopolymerization*), deposición de gotas (*droplet deposition, fused-deposition modelling, FDM*), cada una de las cuales posee sus ventajas y desventajas [29, 52]. Aunque estas tecnologías tienen limitaciones en cuanto a la selección de materiales, costo, potencial degradación térmica de polímeros y resolución de canales por unidad de volumen, entre otros, el avance en el desarrollo de nuevas tecnologías ofrece un potencial importante en el campo de la ingeniería de tejidos, donde se requiere una matriz a medida y precisamente controlada.

Matrices nanoestructuradas y matrices bioactivas

Una de las nuevas áreas de diseño de matrices extracelulares artificiales para ingeniería de tejidos se enfoca en el diseño de materiales nanoestructurados. Esta aproximación surge de la imitación de características de las matrices extracelulares naturales, en donde moléculas biológicamente funcionales, células y componentes de la matriz extracelular interactúan a nivel nanométrico. El colágeno, por ejemplo, representa la proteína más abundante del organismo de los mamíferos (casi un 30% del total de proteínas), y es el principal componente de la matriz extracelular natural y del tejido conectivo. Las características, propiedades y funciones del tejido dependen de la forma en la que las nanofibras de colágeno están presentes [1]. El desarrollo de matrices nanofibras, nanocompuestas y bioactivas constituye una aproximación biomimética que se encuentra actualmente en plena evolución.

Matrices nanofibras (*nanofibrous scaffolds*): Las nanofibras resultan de notable interés debido a la generación de una estructura altamente porosa de gran relación área/volumen. Las matrices constituidas por nanofibras pueden fabricarse con geometrías que permitan rellenar defectos anatómicos y su arquitectura puede diseñarse para obtener las propiedades mecánicas necesarias para soportar el crecimiento, proliferación, diferenciación y movilidad celular. Así mismo, pueden contener factores de crecimiento, drogas, principios activos y genes para estimular la regeneración de tejidos. Una propiedad inherente de las nanofibras es su alta capacidad de imitar la matriz extracelular de los tejidos y órganos, un complejo compuesto formado por proteínas fibrosas, proteínas solubles y otras moléculas bioactivas que permiten la adhesión y el crecimiento celular. Sin embargo, los estudios de las interacciones célula-nanofibra, la elucidación y el entendimiento completo de la influencia de las nanofibras en las rutas bioquímicas y los mecanismos de las señales que regulan el comportamiento celular requieren de mayor investigación.

Las técnicas mecánicas convencionales de producción de fibras permiten obtener fibras con diámetros en el orden del micrómetro. Si bien estos tamaños se utilizan en muchas aplicaciones, existen nuevas aplicaciones que requieren fibras con diámetros de decenas a cientos de nanómetros. Las nanofibras se emplean en numerosas aplicaciones nanotecnológicas entre las que se incluyen defensa y seguridad, biomateriales, ingeniería ambiental y biotecnología, almacenamiento de energía, almacenamiento o transporte de gases y fluidos, nanoelectrónica, etc. [36]

Uno de los métodos de procesamiento que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras es el electrohilado (*electrospinning*) [16, 25, 36, 40, 41]. Si bien el proceso se conoce desde 1934, hubo muy poco interés en su uso para la obtención de fibras hasta mediados de la década del noventa. Desde entonces, se han electrohilado muchos polímeros sintéticos y naturales para obtener fibras de unos pocos nanómetros hasta algunos micrones. Las fibras resultantes son uniformes y continuas y no requieren de una purificación extensiva como es el caso de los whiskers submicrométricos, las nanovarillas inorgánicas y los nanotubos de carbono. En este proceso, un fluido (solución polimérica, polímero fundido o solución con precursor cerámico) se extruye a través de una boquilla capilar para formar una pequeña gota en presencia de un campo eléctrico producido por una fuente de alto voltaje (~ 30 kV). A un voltaje crítico, la fuerza repulsiva supera la tensión superficial de la solución

formando un jet líquido cargado eléctricamente que se acelera hacia una región de menor potencial donde se encuentra un colector conectado a tierra. A medida que el solvente se evapora, el jet se estrecha produciendo fibras ultrafinas y continuas que generan una matriz tridimensional altamente porosa. La técnica tiene la habilidad única de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, bajo costo, relativamente alta velocidad de producción y simplicidad en el diseño del equipamiento. La selección adecuada de los parámetros del proceso permite controlar no sólo el diámetro de las fibras sino también su morfología interna. Estas características hacen del *electrospinning* un proceso de vanguardia, versátil y altamente atractivo para la preparación de membranas hiladas no tejidas de polímeros naturales o sintéticos, cerámicos o compuestos, con morfología y funcionalidad controlada, de creciente interés para la investigación académica y la industria.

Las aplicaciones potenciales de las nanofibras en el campo biomédico son enormes y prometedoras: además de matrices para regeneración de tejidos y órganos (injertos vasculares, nervios, piel, cartílago, huesos, músculos cardíacos, córneas, expansión y diferenciación de células madres), se encuentran vectores para liberación de principios activos, dispositivos biomédicos biodegradables implantables, instrumentación y diagnóstico médico, aplicaciones dentales y cosméticas [7, 26, 33, 35].

Las matrices diseñadas con nanofibras biorreabsorbibles y nanotubos de carbono (CNT) están siendo investigadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos [6, 37]. Los CNT se emplean en cantidades muy pequeñas y, aunque no son biodegradables, podrían eliminarse rápidamente del organismo vivo. Si bien la motivación inicial para el empleo de nanopartículas es la capacidad de proveer un refuerzo mecánico, la conductividad eléctrica de las mismas puede ser una herramienta muy útil para mejorar la funcionalidad de los materiales. Existen evidencias de que los CNT pueden estimular el crecimiento celular, acelerando y dirigiendo el crecimiento de células [53, 54]. Los CNT pueden también funcionalizarse para permitir la liberación de principios bioactivos (enzimas, proteínas, etc).

Autoensamblado molecular (*molecular self-assembly*): constituye otro campo de investigación emergente, especialmente cuando se trata de estructuras biológicas de tamaño nanométrico o texturizado. El autoensamblado se define como la organización autónoma de componentes en patrones o estructuras sin intervención externa. Esta estrategia también se emplea en el de-

sarrollo de materiales nanofibrosos con potencial aplicación como matrices para ingeniería de tejidos [29]. El autoensamblado está generalmente mediado por fuerzas secundarias tales como interacciones iónicas (electrostáticas), puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. Los hidrogeles basados en proteínas proporcionan, además de su capacidad de gelación *in situ*, las condiciones necesarias para la proliferación celular y formación de tejidos. Para emular la estructura triple helicoidal del colágeno se han sintetizado diversos péptidos anfífilos, así como para formar nanofibras supramoleculares de 5-8 nm de diámetro y más de 1 μm de longitud.

Separación de fases (*phase separation*): el proceso de separación de fases de una solución polimérica también puede considerarse como un proceso de autoensamblado. En lugar de ensamblar moléculas pequeñas se agregan macromoléculas para formar una nueva fase. Se ha desarrollado una técnica de separación de fases que permite preparar matrices nanofibrosas de PLLA con nanofibras de 50-500 nm de diámetro, similar al que tienen las fibras de colágeno [32]. Para mejorar la estructura tridimensional se han empleado técnicas que introducen una red de macroporos prediseñados (por ejemplo de fibras de porógenos solubles en agua) en la matriz nanofibrosa de PLLA procesada por separación de fases inducida térmicamente.

Nanocompuestos porosos (*porous nanocomposite scaffolds*): los materiales compuestos polímero biorreabsorbible/biocerámico se han desarrollado para aplicaciones de ingeniería de tejidos mineralizados. La estrategia seguida para mimetizar la microestructura de los cristales inorgánicos presentes en la estructura ósea se basa en la utilización de matrices altamente porosas nanocompuestas de nanohidroxiapatita y macromoléculas sintéticas o naturales [48]. Mediante esta vía se han mejorado no sólo las propiedades mecánicas sino también la adsorción de proteínas y la adhesión y función celular.

Andamiajes bioactivos (*bioactive scaffolds*): la matriz ideal para la regeneración de tejidos debería interactuar positivamente con las células y la función celular. Las técnicas de modificación superficial o en masa de polímeros se emplean a menudo con este objetivo. La modificación en masa normalmente involucra la copolimerización o la fijación de grupos funcionales en las cadenas poliméricas antes de la preparación de la matriz porosa, y frecuentemente cambia las propiedades mecánicas y de procesamiento de los polímeros. La modificación superficial puede llevarse a cabo después de la fabricación del andamiaje, mediante tratamientos con plasma o plasma

seguido de modificación química. Estas técnicas son más efectivas en superficies de membranas bidimensionales o en piezas tridimensionales de poco espesor. En una matriz porosa tridimensional y compleja, la superficie no es solamente la superficie exterior sino también las superficies internas. Para modificar la composición química de las superficies internas se emplea fluido fisiológico simulado. Este proceso biomimético permite introducir *in situ* y de manera efectiva una apatita similar a la del hueso nativo de tamaño nanométrico en las superficies de los poros internos. Sin embargo, se necesitan desarrollar más técnicas de modificación de superficies tridimensionales.

Finalmente, con el objeto de proporcionar una mayor funcionalidad biológica, se incluyen moléculas bioactivas y genes, integrados desde la etapa de diseño de las matrices porosas. Los esfuerzos actuales se centran en el desarrollo de matrices bioactivas, con arquitectura tridimensional nanofibrosa, superficie biomimética y capacidad para liberar de manera controlada factores de crecimiento celular.

Nuevos desafíos en el diseño y preparación de andamiajes

La ciencia e ingeniería de biomateriales ha evolucionado significativamente desde su nacimiento hace poco más de 25 años. Sin embargo, estamos en las primeras etapas de una nueva era de investigación en biomateriales, donde se emplean estrategias biomiméticas para el diseño racional de biomateriales interactivos y funcionales. Entre estos, se incluyen materiales biorreabsorbibles, no degradables y materiales inteligentes usados en aplicaciones de liberación controlada de principios activos e ingeniería de tejidos, así como en la modificación de superficies para implantes y tratamiento de heridas. La investigación y desarrollo en este campo experimenta en los últimos años un crecimiento exponencial que origina nuevos y complejos desafíos a resolver, entre los que se encuentran:

- El desarrollo de biomateriales completamente biorreabsorbibles que mejoren los materiales base de la industria de dispositivos biomédicos y proporcionen una funcionalidad específica imitando a los materiales de las estructuras naturales.

- La optimización del diseño y la preparación de matrices. La implementación de técnicas de procesamiento que proporcionen arquitecturas porosas tridimensionales con textura nanométrica, control de la micro y macroestructura, y matrices funcionales adecuadas a cada aplicación específica.

- El desarrollo de metodologías de incorporación y liberación de factores de crecimiento y

otros factores de inducción tisular que estimulen o mejoren la regeneración de tejidos y órganos.

- El mejoramiento de respuesta celular mediante la creación de matrices con gradientes espaciales de células y de factores de crecimiento y matrices con capacidad de vascularización.

- Una mayor comprensión de los parámetros de control de la interacción material-células para conseguir las condiciones óptimas para la fijación, crecimiento, diferenciación y organización celular que permitan generar tejidos funcionales y mejorar la seguridad y eficacia de los dispositivos biomédicos.

- Finalmente, la urgente necesidad de integrar la ciencia básica e ingeniería de materiales con los avances extremadamente rápidos de la biología celular y la biología de células madre en el diseño de nuevos materiales portadores de señales sofisticadas, constituye el desafío más relevante que tiene hoy en día la ingeniería de tejidos. En esta dirección ya existen a nivel mundial acciones estratégicas concretas e intensas para incrementar la interdisciplinariedad de los programas de investigación, entrenamiento y educación [17, 44].

Referencias

- [1] Abraham G.A., Cauich-Rodriguez J.V., Peniche C. and Gallardo A., en: *Biomateriales*, Cap. 6. R. Sastre, S. de Aza and J. San Roman (Editores). Faenza Editrice Iberica S.L., Faenza, Italia, 2004.
- [2] Abraham G.A., Marcos-Fernández A. and San Román J., *J. Biomed. Mater. Res.* 76A, 729 (2006).
- [3] American Standard for Testing and Methods, ASTM D883-99. Standard Terminology relating to Plastics, 1999.
- [4] Ashby M.F. and Gibson L.J., *Cellular solids: Structure and Properties*, 2nd. Edit. University Press, Cambridge, UK, 1997.
- [5] Atala A., *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 83 (2007).
- [6] Ayutsede J., Gandhi M., Sukigara S., Ye H., Hsu Ch-M., Gogotsi Y. and Ki F., *Biomacromolecules* 7, 208 (2006).
- [7] Bhattarai S.R., Bhattarai N., Yi H.K., Hwang P.H., Cha D.I. and Kim H.T., *Biomaterials* 25, 2595 (2004).
- [8] Burg K.J.L., Porter S. and Kellam J.F., *Biomaterials* 21, 2347 (2000).
- [9] Caracciolo P.C., de Queiroz A.A.A., Higa O.Z., Buffa F. and Abraham G.A., *Acta Biomaterialia* 4, 976 (2008).
- [10] Daar A.S. and Greenwood H.L., *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 179 (2007).

- [11] Dimitriu S., *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker, 1994.
- [12] Elvira C., Abraham G.A., Gallardo A. and San Román J., en *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Cap. 26, R.L. Reis and J. San Román, (Editores). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.
- [13] Evans N.D., Gentleman E. and Polak J.M., *Materialstoday* 9, 26 (2006).
- [14] Fisher J.P., Holland T.A., Dean D., Engel P.S. and Mikos A.G., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 12, 673 (2001).
- [15] Gomes, M.E. and Reis R.L., *Macromol. Biosci.* 4, 737 (2004).
- [16] Greiner A. and Wendorff J.H., *Angew. Chem. Int.* 46, 5670 (2007).
- [17] Griffith L., en *WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research*. Cap. 2. K.B. Hellmann and F.G. Heineken (Editores), International Technology Research Institute, Maryland, USA, 2002.
- [18] Hoerstrup S.P., Lu L., Lysaght M.J., Mikos A.G., Rein D., Schoen F.J., Temenoff J.S. Tessmar J.K., and Vacanti J.P., en *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, Cap. 8, B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, and J.E. Lemons (Editores) 2nd. Edit., Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 2004.
- [19] Hutmacher D.W. en *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Cap. 6, R.L. Reis and J. San Román, (Editores). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.
- [20] Ikada Y., *Connective Tissue* 31, 213 (1999).
- [21] Karp J.M., Dalton P.D. and Shoichet M.S., *MRS Bulletin* 28, 301 (2003).
- [22] Kohn J. *Med. Device Develop.*, 35 (2006).
- [23] Langer R. and Vacanti J.P., *Science* 260, 920 (1993).
- [24] Lanza R.P., Langer R. and Vacanti J., *Principles of Tissue Engineering*, 2nd. Edit. Academic Press, San Diego CA, USA, 2000.
- [25] Li D. and Xia Y., *Adv. Mater.* 16, 1151 (2004).
- [26] Liao S., Li B., Ma Z., Wei H., Chan C. and Ramakrishna S. *Biomed. Mater.* 1, R45 (2006).
- [27] Lysaght M.J. and Hazlehurst A.L., *Tissue Eng.* 9, 555 (2003).
- [28] Lysaght M.J. and Reyes J., *Tissue Eng.* 7, 485 (2001).
- [29] Ma P.X. and Elisseeff J., *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.
- [30] Ma P.X. and Zhang R., *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 60 (1999).
- [31] Marcos-Fernández A., Abraham G.A., Valentín J.L. and San Román J., *Polymer* 47, 785 (2006).
- [32] Mauri Agrawal C., en: *Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration*. NATO-ASI Science series. Series II 86, 113. R.L. Reis and D. Cohn (Editores). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2002.
- [33] Murugan R. and Ramakrishna S., *Tissue Eng.* 12, 435 (2006).
- [34] Nerem R.M., *Tissue Eng.* 12, 1143 (2006).
- [35] Pham Q.P., Sharma U. and Mikos A.G., *Tissue Eng.* 12, 1197 (2006).
- [36] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W-E., Yong T., Ma Z. and Ramaseshan R., *Materialstoday* 9, 40 (2006).
- [37] Rao S.S., *Electrospun PLLA/SWNT nanocomposite fibril for cartilage regeneration*. Ph.D. Thesis, Drexel University, USA, 2004.
- [38] Sastre R., de Aza S. and San Roman J., *Biomateriales*, Faenza Editrice Iberica S.L., Faenza Italia, 2004.
- [39] Sharma C.P. and Szycher M., *Blood Compatible Materials and Devices, Perspectives Towards the 21st. Century*. Technomic Publ. Inc., Pennsylvania, USA, 1991.
- [40] Tan S., Huang X. and Wu B., *Polym. Int.* 56, 1330 (2007).
- [41] Teo W.E. and Ramakrishna S., *Nanotechnology* 17, R89 (2006).
- [42] Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J. and Mikos A.G., en: *Principles of Tissue Engineering*, Cap. 21, 2nd. Edit. R.P. Lanza, R. Langer and J. Vacanti (Editores), Academic Press, USA, 2000.
- [43] Ulijn R.V., Bibi N., Jayawarna V., Thornton P.D., Todd S.J., Mart R.J., Smith A.M. and Gough J.E., *Materialstoday* 10, 40 (2007).
- [44] Vacanti C.A., *Tissue Eng.* 12, 1137 (2006).
- [45] Varghese S. and Elisseeff J.H., *Adv. Polym. Sci.* 203, 95 (2006).
- [46] Vázquez B., Abraham G.A., Elvira C. and San Román J., en *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Cap. 4, R.L. Reis and J. San Román, (Editores). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.
- [47] Vert M., Li M.S., Spenlehauer G. and Guerin P., *J. Mater. Sci.* 3, 432 (1992).
- [48] Wei G., and Ma P.X., *Biomaterials* 25, 4749 (2004)
- [49] Williams D.F., *Reconstructing the Body*, Vol.I: Implants in surgery, and Vol.II:

- Biomaterials and Tissue Engineering for the 21st. Century. Liverpool University Press, United Kingdom, 2000.
- [50] Yamato M. and Okano T., *Materialstoday* 5, 42 (2004).
- [51] Yang S., Leong K-F., Du Z. and Chua Ch-K., *Tissue Eng.* 7, 679 (2001).
- [52] Yang S., Leong K-F., Du Z. and Chua Ch-K., *Tissue Eng.* 8, 1 (2002).
- [53] Zanello L.P., Zhao B., Hu H. and Haddon R.C., *Nano Lett* 6, 562 (2006).
- [54] Zhang D., Yi C., Zhang J., Chen Y., Yao X. and Yang M., *Nanotechnology* 18, 1 (2007).

Manuscrito recibido el 13 de febrero de 2008.

Aceptado el 9 de mayo de 2008.