



UNMDP - Facultad de Ingeniería,  
Departamento de Ingeniería en Materiales  
Instituto de Biomateriales, Friedrich-  
Alexander Universität Erlangen-Nürnberg



# **MICRO/NANOESTRUCTURAS BIORREASORBIBLES OBTENIDAS POR IMPRESIÓN TRIDIMENSIONAL Y ELECTROHILADO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**Proyecto final para optar al grado de Ingeniera en Materiales**

**Autor: Sofía Melucci**

**DNI: 40.568.661**

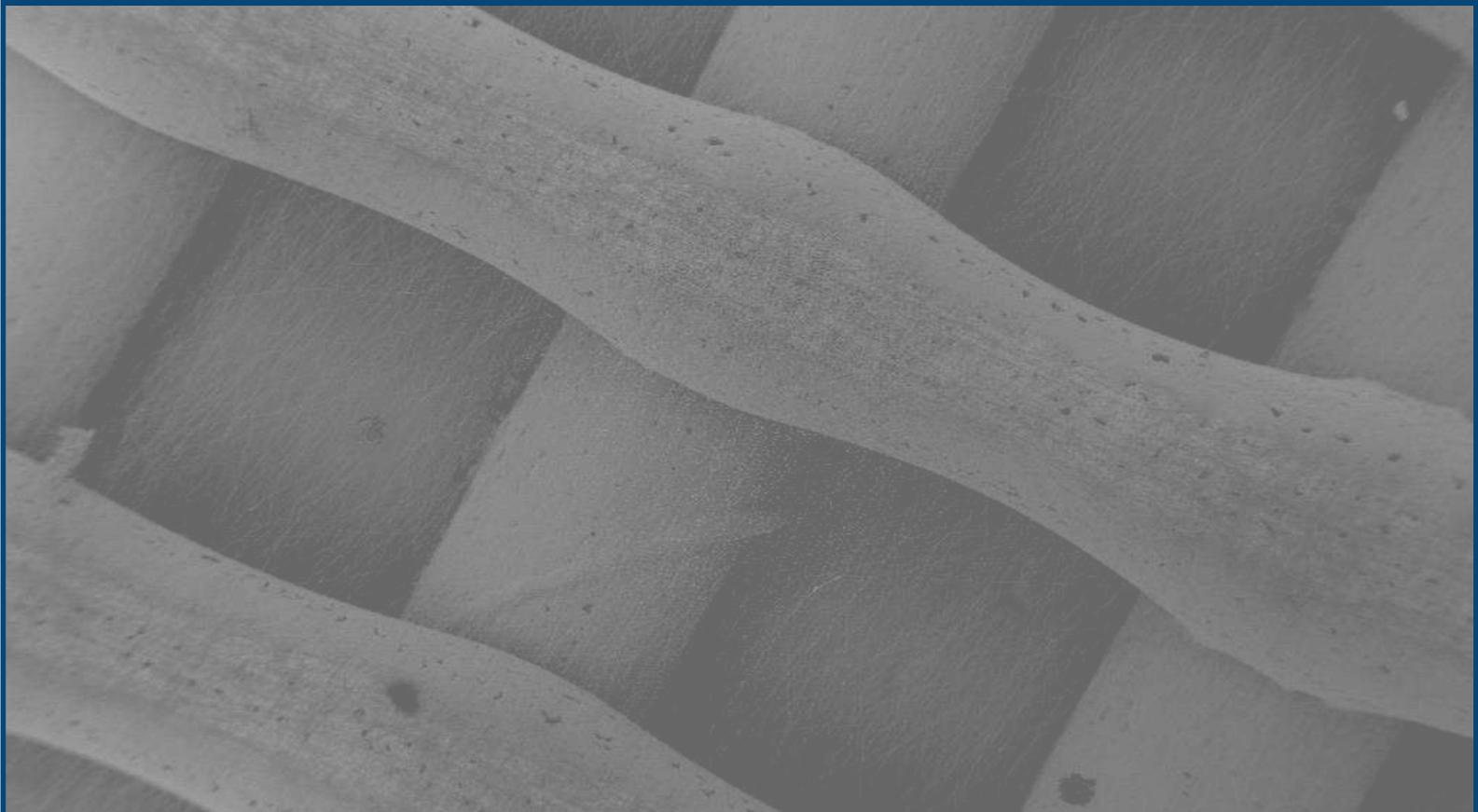
**Nro. de legajo: 11822**

**E-Mail: [sofiammelucci@gmail.com](mailto:sofiammelucci@gmail.com)**

**Directores: Dr. Gustavo A. Abraham y Dr. Aldo R. Boccaccini**

**Colaboradora: Irem Ünalán**

**Mar del Plata, 30 de septiembre de 2022**





RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNMDP - Facultad de Ingeniería,  
Departamento de Ingeniería en Materiales  
Instituto de Biomateriales, Friedrich-  
Alexander Universität Erlangen-Nürnberg



# **MICRO/NANOESTRUCTURAS BIORREASORBIBLES OBTENIDAS POR IMPRESIÓN TRIDIMENSIONAL Y ELECTROHILADO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**Proyecto final para optar al grado de Ingeniera en Materiales**

**Autor: Sofía Melucci**

**DNI: 40.568.661**

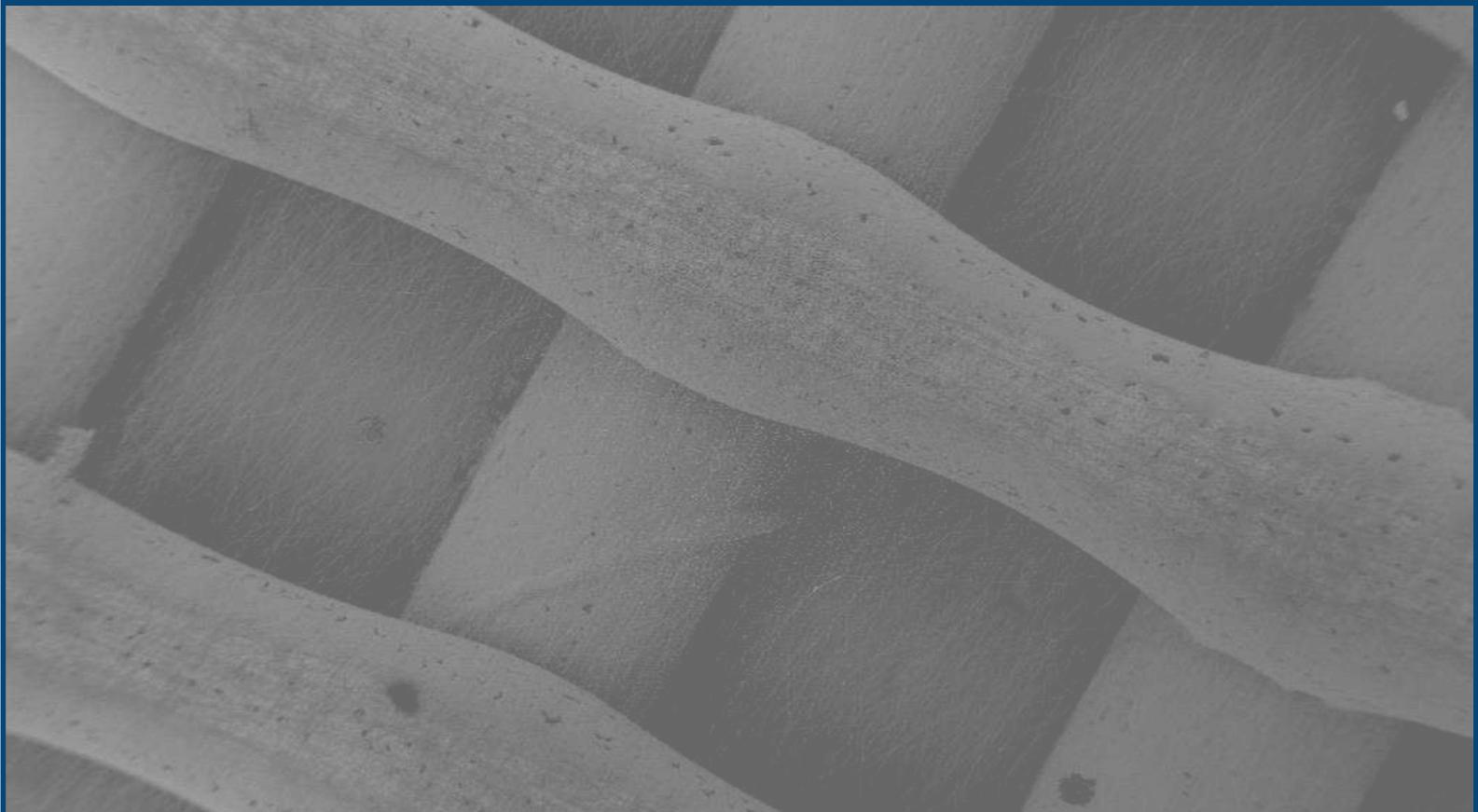
**Nro. de legajo: 11822**

**E-Mail: [sofiammelucci@gmail.com](mailto:sofiammelucci@gmail.com)**

**Directores: Dr. Gustavo A. Abraham y Dr. Aldo R. Boccaccini**

**Colaboradora: Irem Ünalán**

**Mar del Plata, 30 de septiembre de 2022**



## Resumen

Existen diferentes aproximaciones para reparar o reemplazar tejidos biológicos cuando estos han sido alterados por una enfermedad, lesión, traumatismo o defecto congénito. Las estrategias convencionales incluyen implantes de tejidos autólogos, alogénicos y xenogénicos. Estos presentan limitaciones relacionadas con la reducida disponibilidad de los tejidos y las reacciones de antigenicidad que provocan. Es por esto que la ingeniería de tejidos, que emplea células, biomateriales y factores físicos o moleculares apropiados, se ha establecido como una aproximación para mejorar las respuestas clínicas.

En este proyecto se fabricaron y caracterizaron matrices de PCL obtenidas por impresión 3D FDM con y sin recubrimiento de nanofibras electrohiladas de mezclas de PCL y gelatina. La estructura FDM determinó la arquitectura general de los andamios 3D al proporcionar suficiente resistencia mecánica para apoyar el crecimiento interno del tejido. Las nanofibras se depositaron sobre el andamio obtenido por impresión 3D para mejorar el atrapamiento de las células y la adhesión y proliferación celular al imitar la matriz extracelular. Estas fibras fueron obtenidas a partir de soluciones poliméricas con ácido acético, considerado un solvente benigno.

Primero, se optimizaron los parámetros de procesamiento de impresión 3D de PCL y, luego del electrohilado, se estudiaron las propiedades morfológicas y superficiales de las muestras a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja (FTIR) y ángulo de contacto. Los espectros FTIR corroboraron la presencia de la gelatina en las fibras y las micrografías corroboraron la obtención de fibras nanométricas libres de defectos y con una cierta alineación debido al empleo de un colector rotatorio durante el proceso de electrohilado. A su vez, se determinó un tiempo óptimo de electrohilado de 3 minutos para evitar recubrimientos con una elevada densidad de fibras. El ensayo de ángulo de contacto demostró un carácter hidrofóbico de las muestras de PCL que variaba con la forma de la superficie, y un carácter muy hidrofílico de las muestras de PCL/gel.

Por último, se estudió la degradación y viabilidad celular *in vitro*. Luego de 21 días de inmersión en PBS a 37°C, si bien las muestras no presentaron cambios significativos, la gelatina se degradó completamente. Por su parte, la viabilidad celular y la tinción de núcleo y citoplasma mostraron cierta mejoría en la adhesión y proliferación celular. Estos resultados demostraron la posible implementación de los andamios obtenidos a partir de la combinación de dos técnicas de procesamiento distintas en ingeniería de tejidos duros.

## **Abstract**

Nowadays, there are different approaches to repair or replace biological tissues when they have been altered by a disease, injury, trauma, or congenital defect. Conventional strategies include autologous, allogeneic, and xenogenic tissue implants. However, they present limitations related to the reduced availability of tissues and the antigenicity reactions they cause. This is why tissue engineering, which employs cells, biomaterials, and physical or molecular factors carefully chosen, has been established as an approach to improve clinical responses.

In this project, PCL matrices obtained by 3D FDM printing with and without the addition of a coating of electrospun nanofibers of mixtures of PCL and gelatin were fabricated and characterized. The FDM structure determined the overall architecture of the 3D scaffolds by providing sufficient mechanical strength to support tissue ingrowth. Nanofibers were deposited on the 3D-printed scaffold to enhance cell entrapment, adhesion and proliferation by mimicking the extracellular matrix. Furthermore, these fibers were obtained from polymeric solutions with acetic acid, considered as a benign solvent.

First, the PCL 3D printing processing parameters were optimized and, after the electrospinning process, the morphological and surface properties of the samples were studied through Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy (FTIR) and contact angle. The SEM micrographs corroborated the obtaining of nanometric fibers free of defects and with a certain alignment due to the use of a rotary collector during the electrospinning process and the FTIR spectra corroborated the presence of gelatin in the fibers. In addition, an optimal electrospinning time of 3 minutes was determined to avoid coatings with a high fiber density. The contact angle essay revealed a hydrophobic character of the PCL samples that varied with the shape of the surface, and a very hydrophilic character of the PCL/gel samples.

Lastly, in vitro cell viability and degradation were studied. After 21 days of immersion in PBS at 37°C, although the samples did not show significant changes, the gelatin completely degraded. On the other hand, cell viability and nucleus and cytoplasm staining showed some improvement in cell adhesion and proliferation for culture times of 1, 3 and 7 days. These results demonstrated the possible implementation of the scaffolds, obtained from the combination of two different processing techniques, in hard tissue engineering.

## Agradecimientos

Me gustaría aprovechar este lugar para mencionar a aquellas personas que han contribuido a mi desarrollo académico y profesional a lo largo de este proceso:

- Al Dr. Gustavo Abraham, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su gran dirección, por confiar en mí y por apoyarme a finalizar este proyecto.
- Al Dr. Aldo R. Boccaccini, por su liderazgo científico y por haberme recibido en el Institute of Biomaterials, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg, para desarrollar este proyecto.
- A la Dra. Silvia Simison y a todas aquellas personas involucradas en hacer posible el programa I.DEAR (Ingenieros Alemania-Argentina).
- A Irem Ünalán, por su excelente predisposición y supervisión a lo largo de este proyecto. Sin ella, la finalización de este trabajo no hubiera sido posible, sobre todo por los inconvenientes que produjo la pandemia.
- A la Universidad Nacional de Mar del Plata, a la Facultad de Ingeniería, y a todos los profesores por brindarme una formación de excelencia.
- A mis padres, Andrea y Juan Carlos, y a mis abuelos, Raquel y Juan, por apoyarme incondicionalmente todos estos años y por incentivar me a escribir este proyecto.
- A Martín, por haberme ayudado con el estudio durante toda la carrera y por no dejarme bajar los brazos.
- A Nicolás, por acompañarme en la cercanía y en los largos meses a la distancia, y por incentivar me a confiar en mí misma y a superarme día a día.
- A Alejandro, Alicia, Karina, Fernando, Emiliano y Francisco, por interesarse y apoyar a la distancia.
- A mis amigos de la vida, por su apoyo desde siempre, y a mis amigos de la facultad, por los largos días de estudio, risas, buenos y no tan buenos momentos. Sin duda lo mejor que me llevo de la facultad.

A todos los mencionados, mis más sinceros agradecimientos.

## Índice

1	Introducción .....	9
1.1	Ingeniería de tejidos .....	10
1.2	Técnicas de procesamiento para estructuras poliméricas porosas .....	14
1.2.1	Manufactura aditiva .....	15
1.2.1.1	Impresión tridimensional por modelado por deposición de fundidos (FDM) 16	
1.2.2	Electrohilado.....	19
1.2.2.1	Electrohilado con solventes benignos .....	27
1.2.3	Técnicas combinadas de impresión 3D/electrohilado .....	28
1.3	Biomateriales poliméricos .....	30
1.3.1	Polímeros sintéticos.....	30
1.3.1.1	Poli( $\epsilon$ -caprolactona) .....	31
1.3.2	Polímeros naturales.....	32
1.3.2.1	Gelatina .....	33
2	Objetivos.....	35
2.1	Objetivos generales .....	35
2.2	Objetivos específicos.....	35
3	Materiales .....	35
4	Métodos.....	36
4.1	Obtención de matrices impresas.....	36
4.2	Recubrimiento de matrices impresas con nanofibras electrohiladas .....	38
4.2.1	Preparación de la solución.....	38
4.2.2	Electrohilado.....	39
4.3	Caracterización morfológica .....	40
4.3.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	40
4.3.2	Determinación del diámetro de fibras .....	40
4.3.3	Determinación de la orientación de fibras .....	41
4.4	Caracterización química .....	41
4.4.1	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	41
4.5	Caracterización superficial.....	41
4.5.1	Ángulo de contacto (CA).....	41
4.6	Ensayo de degradación <i>in vitro</i> .....	42

4.6.1	Hinchamiento.....	42
4.6.2	Degradación .....	42
4.6.3	FTIR .....	43
4.7	Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i> .....	43
4.7.1	Cultivo celular .....	44
4.7.2	Viabilidad celular .....	45
4.7.3	Tinción de citoplasma y núcleo .....	46
4.8	Análisis estadístico .....	47
5	Resultados y discusión .....	47
5.1	Fabricación de estructuras poliméricas porosas .....	47
5.1.1	Impresión 3D por FDM de PCL.....	47
5.1.2	Electrohilado de soluciones PCL-Gelatina .....	49
5.2	Caracterización morfológica .....	50
5.3	Caracterización química .....	56
5.4	Caracterización superficial.....	58
5.5	Hinchamiento y degradación .....	60
5.6	Viabilidad celular .....	62
5.7	Tinción de citoplasma y núcleo .....	64
6	Balance económico .....	67
6.1	Equipamiento para impresión 3D.....	67
6.2	Equipamiento para electrohilado.....	69
6.3	Equipamiento integrado.....	70
7	Conclusiones .....	72
8	Trabajo futuro .....	73
9	Referencias .....	73

## Listado de figuras

Figura 1-1:	Estrategia de empleo de andamios con células para ingeniería de tejidos [8].	11
Figura 1-2:	Clasificación de las técnicas de manufactura aditiva [13], [14].	16
Figura 1-3:	Esquema de las tres tecnologías principales de fabricación aditiva de extrusión de materiales. Adaptado de [15].	17
Figura 1-4:	Modelo CAD de un andamio obtenido por FDM y de su porosidad. Adaptado de [15].	18

Figura 1-5: Esquema de la configuración del proceso de electrohilado. Adaptado de [21]. .....	20
Figura 1-6: Esquema de la formación del cono de Taylor a medida que el campo electrostático aumenta y supera un valor umbral de manera que las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial del líquido y ocurre el electrohilado. Adaptado de [23]. ....	20
Figura 1-7: Esquema del efecto de la viscosidad en la morfología de las fibras electrohiladas. Adaptada de [27]......	23
Figura 1-8: Esquema representativo de un colector plano con obtención de fibras al azar y un colector rotatorio con obtención de fibras alineadas. Adaptado de [32]......	26
Figura 1-9: Esquema del proceso híbrido combinando impresión 3D por FDM y electrohilado. Adaptado de [24]. ....	30
Figura 1-10: Estructura química de la poli( $\epsilon$ -caprolactona) [39]......	32
Figura 1-11: Estructura química de la gelatina [41]. ....	34
Figura 4-1: Obtención de matrices mediante la impresora GeSiM BioScaffolder 3.1.....	37
Figura 4-2: Obtención de matrices mediante la impresora Cellink BioX. ....	37
Figura 4-3: Esquema de la preparación de la solución de PCL/gelatina.....	38
Figura 4-4: Muestra almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis. ....	39
Figura 4-5: Disposición del equipo de electrohilado previo al procesamiento.....	40
Figura 4-6: Muestras colocadas dentro de la incubadora a 37°C y 75 rpm. ....	43
Figura 4-7: a) conteo de las células viables mediante el método de exclusión del colorante azul tripano, b) andamios siendo movidos a una nueva placa luego de la siembra celular y c) suspensión celular obtenida luego de separar las células de los frascos de cultivo usando tripsina. ....	45
Figura 5-1: Matrices impresas de PCL obtenidas mediante la impresora 3D GeSiM BioScaffolder 3.1 de: a,b) 3 capas; c) 4 capas. ....	48
Figura 5-2: Matriz impresa de PCL de 2 capas obtenida mediante la impresora 3D Cellink Bio X.....	48
Figura 5-3: Matriz 3D de PCL con un recubrimiento de 3 minutos de electrohilado de PCL/gelatina. ....	49
Figura 5-4: Micrografías SEM de una matriz de PCL de magnificación: a) 100x, b) 200x. 50	
Figura 5-5: Micrografías SEM de una matriz de PCL3D con 3 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 500x, c) 5.000x y d) distribución de diámetro de fibra. ....	52

Figura 5-6: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL3D con 3 minutos de electrohilado de PCL/gelatina. ....	52
Figura 5-7: Micrografías SEM de una matriz de PCL3D con 5 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 500x, c) 10.000x y d) distribución de diámetro de fibra.....	53
Figura 5-8: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL 3D con 5 minutos de electrohilado de PCL/gelatina. ....	53
Figura 5-9: Micrografías SEM de una matriz de PCL3D con 10 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 250x, c) 10.000x y d) distribución de diámetro de fibra.....	54
Figura 5-10: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL 3D con 10 minutos de electrohilado de PCL/gelatina. ....	54
Figura 5-11: Micrografías SEM de una matriz de PCL con 30 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 250x, c) 10.000x y d) distribución de diámetro de fibra.....	55
Figura 5-12: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL 3D con 30 minutos de electrohilado de PCL/gelatina. ....	55
Figura 5-13: Espectro ATR-FTIR de las matrices impresas de PCL sin recubrimiento y con 3, 5, 10 y 30 minutos de electrohilado.....	57
Figura 5-14: a) Ángulo de contacto de las matrices impresas de PCL en función del lugar de deposición de la gota, b) imágenes representativas de las distintas formas en las que se acomodaba la gota en la matriz, y c) proceso de acomodamiento de la gota en la matriz. ....	58
Figura 5-15: a) Evolución temporal de la medición del ángulo de contacto de dos matrices de PCL/gel y b) imágenes de la gota de agua destilada al comienzo, mitad y final de la medición (de izquierda a derecha).....	59
Figura 5-16: Hinchamiento (izq.) y degradación (dcha.) de las matrices de PCL y PCL/gel en función del tiempo de inmersión en PBS a 37°C.....	60
Figura 5-17: Espectro ATR-FTIR de las matrices de PCL (izq.) y PCL/gel (dcha.) luego de 1, 3, 7, 14 y 21 días de inmersión en PBS a 37°C. ....	61
Figura 5-18: pH en función del tiempo de inmersión en PBS a 37°C. Para mayor simplificación, en el caso de las matrices de PCL solo se indicaron las diferencias significativas, mientras que para las matrices de PCL/gel solo se indicaron las diferencias	

no significativas. Además, no hubo una diferencia significativa entre las matrices de PCL y PCL/gel para ninguno de los días. ....	62
Figura 5-19: Porcentaje de viabilidad celular de células NHDF en matrices de PCL y PCL/gel luego de 1, 3 y 7 días de incubación (número de muestras = 6; * p < 0.05). ....	63
Figura 5-20: Imágenes de fluorescencia de células NHDF en matrices de PCL y PCL/gel luego de 1 día de incubación. ....	65
Figura 5-21: Imágenes de fluorescencia de células NHDF en matrices de PCL y PCL/gel luego de 7 días de incubación. ....	66

### **Listado de tablas**

Tabla 4-1: Parámetros de procesamiento para los dos equipos utilizados. ....	38
Tabla 6-1: Presupuesto para la bioimpresora 3D Allevi 3 de 3D Systems. ....	67
Tabla 6-2: Presupuesto para la bioimpresora 3D BIO X generación 3 de Cellink. ....	68
Tabla 6-3: Presupuesto para el equipo de electrohilado Sistema Spinbox 1 de Bioinicia. ....	69
Tabla 6-4: Presupuesto para el equipo de electrohilado NE200 de Inovenso. ....	70
Tabla 6-5: Presupuesto para el equipo integrado de bioimpresión 3D y electrohilado Axo A3 de Axolotl Biosystems. ....	71

## 1 Introducción

Cada año se realizan millones de procedimientos quirúrgicos que requieren el uso de tejidos u órganos sustitutos para reparar o reemplazar aquellos dañados o gravemente afectados por una enfermedad. Si bien ciertos tejidos y órganos duros y blandos presentan capacidad de autocuración, esto depende del tejido y la extensión del daño. El problema de la falla de órganos o el reemplazo de tejidos tiende a agravarse debido a la falta de disponibilidad de los mismos y a la dificultad del control de los fenómenos de rechazo. Este incremento en la demanda se ve en gran medida afectado por el crecimiento de la esperanza de vida [1]. En este contexto resulta necesario desarrollar tecnologías y metodologías para sobrellevar la demanda cada vez mayor de tejidos biológicos tales como huesos, cartílagos, articulaciones, nervios, piel, ligamentos, tendones, córneas, órganos bioartificiales (hígado, páncreas), etc.

Entre las aproximaciones convencionales para reparar o reemplazar tejidos u órganos se encuentran el autoinjerto (*autografting*), que involucra la extracción de tejido sano (biopsia) para trasplantarlo en otra parte del mismo paciente (autoplastia); el aloinjerto (*allografting*), que requiere la extracción de tejidos u órganos de un donante fallecido o vivo para su trasplante a un paciente; el xenoinjerto (*xenografting*), que involucra el implante de tejidos de otras especies convenientemente tratados; y el empleo de biomateriales o dispositivos biomédicos [2]. Estos enfoques presentan varias desventajas. Entre otros, los implantes de xenoinjertos generan reacciones de antigenicidad y eventos de trombosis y calcificación; el trasplante de aloinjerto está limitado por el número de donantes disponibles; el autotrasplante tiene aplicaciones restringidas, generando dolor y malestar [1]; y los reemplazos con estructuras sintéticas para tejidos y órganos pueden abordar en gran medida solo sus deficiencias físicas y mecánicas a largo plazo, no dando opción para el reemplazo de las funciones biológicas (por ejemplo, metabólicas).

Durante la última década se ha presenciado un cambio fundamental en el enfoque de las terapias para muchas enfermedades a través de las diversas estrategias dentro del amplio campo de la medicina regenerativa. Por lo general, se considera que incluyen terapias celulares, terapia génica e ingeniería de tejidos, y están dirigidas esencialmente a inducir la regeneración de tejidos u órganos después de una enfermedad o lesión en lugar de reemplazarlo con materiales sintéticos [3].

En este sentido, la ingeniería de tejidos (IT) ha surgido como una aproximación alternativa para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales para la regeneración tisular.

## 1.1 Ingeniería de tejidos

Como campo interdisciplinario que combina varios conocimientos en biología e ingeniería, la ingeniería de tejidos emplea las tres entidades fundamentales de células, biomateriales y factores físicos o moleculares adecuados, solos o en combinación, para restaurar o regenerar tejidos y órganos y recuperar sus funciones normales [4], [5]. La mayoría de las aproximaciones clásicas utilizan un biomaterial diseñado de manera tal de tomar una forma específica (andamio, matriz, sustrato o *scaffold*) para proporcionar soporte estructural e impartir forma al tejido que se está regenerando, para facilitar la estimulación de la regeneración a través de señales moleculares y/o mecánicas, y para apoyar el crecimiento celular [3], [6].

A tal efecto, las estrategias en ingeniería de tejidos generalmente se dividen en dos categorías: el uso de matrices acelulares y el uso de matrices con células. En el primer abordaje se implantan los andamios artificiales directamente en la zona a regenerar, por lo que se depende de la habilidad natural del cuerpo para formar el nuevo tejido; o bien se les puede agregar factores de crecimiento/fármacos de manera que, tras la implantación, las células del cuerpo se recluten en el sitio del andamio y formen tejido sobre y a lo largo de las matrices, acelerando el proceso de recuperación [6].

El uso de andamios con células se esquematiza en la Figura 1-1 e incluye: i) extracción de tejido del paciente mediante una biopsia; ii) aislamiento de las células del tejido; iii) cultivo de las células primarias; iv) expansión mediante cultivo celular; v) siembra de las células en el andamio y cultivo controlado mediante factores de crecimiento en condiciones estáticas o en biorreactores específicamente diseñados, o bien sin cultivo previo e implante directo por inyección de células; vi) implantación de la matriz con las células en el sitio deseado del paciente donde se espera que se regenere el tejido dañado y, por lo general, que el biomaterial se degrade o se disuelva a medida que se forma el nuevo tejido. Para esto se requiere el diseño de un andamio soporte para la fijación de las células, incluyendo la selección de los materiales y las técnicas de procesamiento adecuados, y el uso de modelos animales que permitan probar las matrices *in vivo*, luego de los análisis *in vitro* y antes de los ensayos clínicos, minimizando los ensayos con animales [2].

Estos dos enfoques no son mutuamente excluyentes y se pueden combinar para obtener sustratos con células y que a su vez funcionen como vehículo para la administración de fármacos. El método más común utilizado para la siembra de células es la siembra estática, en la que se introduce pasivamente una suspensión celular concentrada en un andamio. Esta técnica tiene varias limitaciones que dan como resultado una baja eficiencia de siembra y una mínima penetración celular en la estructura del andamio. Es por esto que se han desarrollado técnicas de siembra alternativas que incluyen sistemas dinámicos, magnéticos, de vacío, de perfusión de flujo, electrostáticos, centrífugos y sistemas híbridos, entre otros. La técnica óptima requiere un método de un solo paso, rentable y confiable que aumente la eficiencia de la siembra y que mejore la distribución y penetración celular [7].

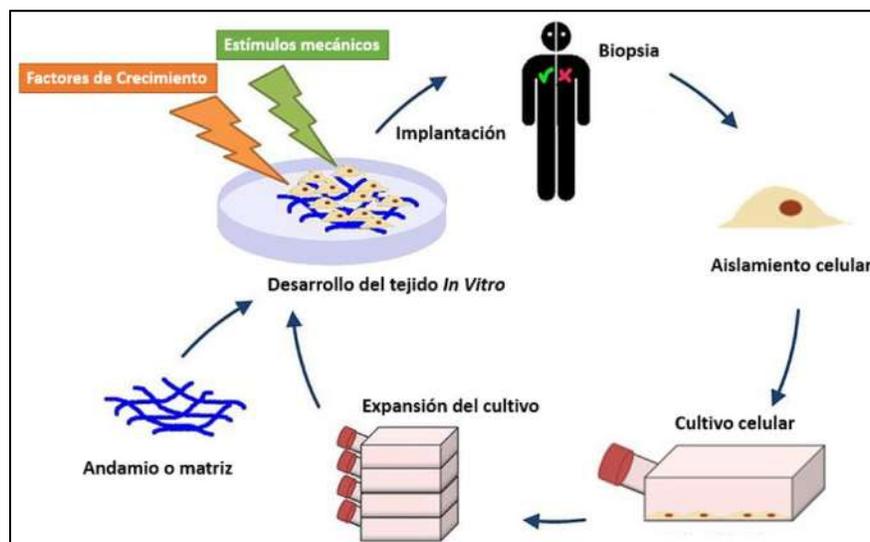


Figura 1-1: Estrategia de empleo de andamios con células para ingeniería de tejidos [8].

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. 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. 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. En este sentido, los estímulos involucran la interacción de las células con su matriz extracelular (MEC) y resultan

indispensables para la actividad celular normal, ya que impacta directa e indirectamente en la función y forma celular [2]. La MEC está compuesta por proteínas y polisacáridos, principalmente colágeno, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos y elastina. Estas proteínas y polisacáridos se organizan en multifibrillas a escala nanométrica formando una red tridimensional que brinda soporte mecánico y bioquímico a las células circundantes y dirige y modula su comportamiento [1] al proporcionarles señales que influyen en la migración, proliferación, y diferenciación celular, y en la expresión génica. Los proteoglicanos resisten la fuerza de compresión y las fibrillas de proteínas proporcionan una alta resistencia a la tracción. Las proteínas estructurales de la MEC tienen un diámetro de 50 a 500 nm [9].

En base a este paradigma, idealmente una matriz debería cumplir los siguientes requisitos:

- Ser biocompatible. La biocompatibilidad, definida como la capacidad de un material para funcionar con una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica [5], es el factor más importante que distingue a un biomaterial de cualquier otro material. En definitiva, este no debe provocar potencialmente ninguna respuesta biológica no deseada en células o tejidos detectada inmunológica o clínicamente [3] y debe permitir la siembra, proliferación y diferenciación celular. Asimismo, debe mantener la viabilidad celular tras el implante. Esto es fundamental dado que el andamio ideal debe presentar células sembradas distribuidas uniformemente por toda la matriz [2].
- Poseer una porosidad, tamaño de poros e interconectividad adecuados. Un área superficial mayor favorece la fijación y crecimiento celular, mientras que un volumen de poro mayor permite acomodar y proporcionar una masa celular suficiente para la reparación de tejidos. Por otro lado, debe ser altamente permeable para facilitar la migración de células y la difusión de nutrientes y productos de desecho. 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 [2].
- Ser biodegradable y poseer una velocidad de degradación controlada que debe coincidir con la tasa de regeneración del nuevo tejido, que luego se integrará en el tejido circundante. Si las matrices no se degradan, el tamaño efectivo de poro se verá reducido por la invasión de tejido en los poros y la adsorción de proteínas no específicas en la superficie del material [10].

- Ser biorreabsorbible. La biorreabsorción implica la eliminación total del material extraño inicial y de los subproductos de degradación (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos laterales residuales o tóxicos. El material experimenta una degradación en masa y además se reabsorbe *in vivo* mediante la eliminación por rutas metabólicas [2].

- Lograr una vascularización funcional para el suministro de nutrientes y la eliminación de metabolitos de las células. De no lograrse, la supervivencia celular no es posible. El soporte de esta vascularización depende principalmente de las características de superficie y tamaño de poro de la matriz, que controlan la adhesión y organización de las células endoteliales vasculares en los vasos sanguíneos [1].

- Poseer estabilidad y propiedades mecánicas (viscoelasticidad y rigidez) adecuadas para soportar la carga mecánica en el sitio anatómico (tejido) en el que se van a implantar. Estas pueden disminuir con el tiempo de implantación debido al proceso de degradación. Además, las células responden a estímulos mecánicos (mecanotransducción) y los esfuerzos que experimentan dependen de las propiedades mecánicas de la matriz y del entorno que rodea a las células [9].

- Ser biomiméticos. Es necesaria la creación de andamios biomiméticos que se asemejen a la matriz extracelular para obtener estructuras con un microambiente similar a *in vivo* que imiten entidades biológicas y desencadenen respuestas celulares específicas. Una topografía y química superficial promueven la fijación y proliferación celular [11].

Para abarcar todos los requisitos mencionados anteriormente, la forma en que se combinan un tipo de célula y andamiaje debe ser estudiado cuidadosamente. La elección de los materiales adecuados, el desarrollo de andamios nanoestructurados con poros interconectados, distribuciones amplias de tamaño de poro, grandes áreas superficiales y propiedades mecánicas adecuadas son parámetros que afectan no sólo a la supervivencia, señalización, adhesión, proliferación y reorganización celular, sino también a su expresión génica y a la conservación, o no, de su fenotipo, o a su diferenciación para el caso de las células madre [6], [1].

Los desafíos actuales radican en la elección/diseño de materiales biocompatibles y biorreabsorbibles naturales, sintéticos o compuestos para producir andamios que imiten las funciones biológicas de la matriz extracelular natural. Entre los materiales que reúnen estas características básicas y que pueden emplearse potencialmente en ingeniería de tejidos se incluyen los polímeros sintéticos o semisintéticos, los polímeros naturales (incluidos los

biomateriales a base de carbohidratos y proteínas de origen animal y vegetal), algunos cerámicos y materiales compuestos polímero/cerámico. 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 [2].

## **1.2 Técnicas de procesamiento para estructuras poliméricas porosas**

A medida que avanza el campo de la ingeniería de tejidos, la necesidad de nuevas estructuras de matrices y técnicas de fabricación reproducibles se ha vuelto de suma importancia. No existe una forma universal de crear andamios para regenerar todos los tejidos debido a que la elección de la técnica más apropiada depende del material polimérico utilizado y de la aplicación específica. En general, las tecnologías de procesamiento de polímeros en andamios de ingeniería de tejidos reticulados se pueden agrupar en dos categorías principales: técnicas convencionales y de manufactura aditiva (MA), cada una de las cuales produce andamios con diferentes características [10].

Las técnicas convencionales incluyen: disolución de partículas (colada con solventes y lixiviación de partículas), separación de fases (separación de fases inducida térmicamente-TIPS, separación de fases inducida por polimerización), agregado de micropartículas, espumado con gas de compuestos polímero-cerámicos, sol-gel, obtención de matrices bioactivas (modificación en masa de polímeros mediante la copolimerización o la fijación de grupos funcionales en las cadenas poliméricas antes de la preparación de la matriz, modificación superficial mediante tratamientos con plasma, inclusión de moléculas bioactivas y genes), y la obtención de matrices nanoestructuradas (autoensamblaje molecular, electrohilado), entre otras [2]. Dentro de las desventajas de estas técnicas de procesamiento, el principal problema es que no permiten obtener estructuras complejas con características de microescala controlables. Es difícil dominar con precisión la geometría, tamaño, interconectividad y distribución de los poros de los andamios [10].

Entre las tecnologías de procesamiento mediante MA se encuentran la sinterización por láser selectiva (SLS), impresión 3D, bioimpresión 3D y modelado por deposición de fundidos (FDM) [10]. Estas técnicas surgen por la necesidad de desarrollar matrices personalizadas, ya sea adaptadas a un propósito o para el paciente individual. De esta manera, se pueden obtener andamios construidos a partir de información 3D computarizada derivada de escaneos de pacientes o de simulaciones por computadora. Los andamios también se pueden imprimir para incluir las células [6].

### 1.2.1 Manufactura aditiva

MA es una tecnología de fabricación de andamios que produce estructuras tridimensionales complejas mediante la deposición capa sobre capa de materiales polimerizados, fundidos o sinterizados *in situ*. Siguen un enfoque de abajo hacia arriba agregando material capa por capa hasta que se obtiene la estructura completa. Para esto se emplean *softwares* de diseño asistido por computadora (CAD) y de manufactura asistida por computadora (CAM) que permiten la fabricación de matrices con un control muy preciso de la micro- y macroestructura [2]. De esta manera, la principal ventaja en comparación con las técnicas tradicionales de fabricación de andamios es la posibilidad de controlar completamente los parámetros geométricos de las matrices en términos de tamaño de poro, interconexión de poros y porosidad. Además, el diseño asistido por computadora permite que los datos de imágenes médicas en 3D de pacientes, como la resonancia magnética y la tomografía computarizada, se puedan utilizar para fabricar andamios personalizados que se ajusten a los sitios con defectos anatómicos [12]. Otra ventaja de las técnicas MA es que se logra una reducción del tiempo de fabricación. Es por esto que también se ha utilizado el término “fabricación rápida de prototipos” (RP) [10]. Sin embargo, debido a que es una técnica muy incipiente, la disponibilidad de materiales es muy limitada, en parte debido a que las aplicaciones están dirigidas mayoritariamente a campos donde la biocompatibilidad no es un requisito fundamental.

De acuerdo con los estándares establecidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales (ASTM), todas las tecnologías MA se pueden dividir en siete categorías: (1) inyección de aglutinante, (2) deposición de energía directa, (3) extrusión de material, (4) inyección de material, (5) fusión en lecho de polvo, (6) laminación de hojas y (7) fotopolimerización VAT [13]., [14]. En la Figura 1-2 se muestran las técnicas de MA más utilizadas. Sin embargo, también es común que se clasifiquen en función de la forma inicial del material procesado. Todos los sistemas de MA a base de polvo funcionan según el principio de unión/unión de micropartículas. Los métodos difieren entre los sistemas que emplean un láser y otros que utilizan un aglutinante/pegamento para lograr el efecto de unión. El sistema de base líquida funciona según el principio de "fotocurado" y son posibles dos métodos: el método del rayo láser y el método de la lámpara de máscara. El material base puede ser un polímero o una resina compuesta fotorreticulable. Los sistemas de MA de base sólida incluyen todas las formas

de materiales en estado sólido antes del procesamiento y funciona según el principio de fusión y solidificación [10]. Dentro de esta última se encuentra la técnica FDM.

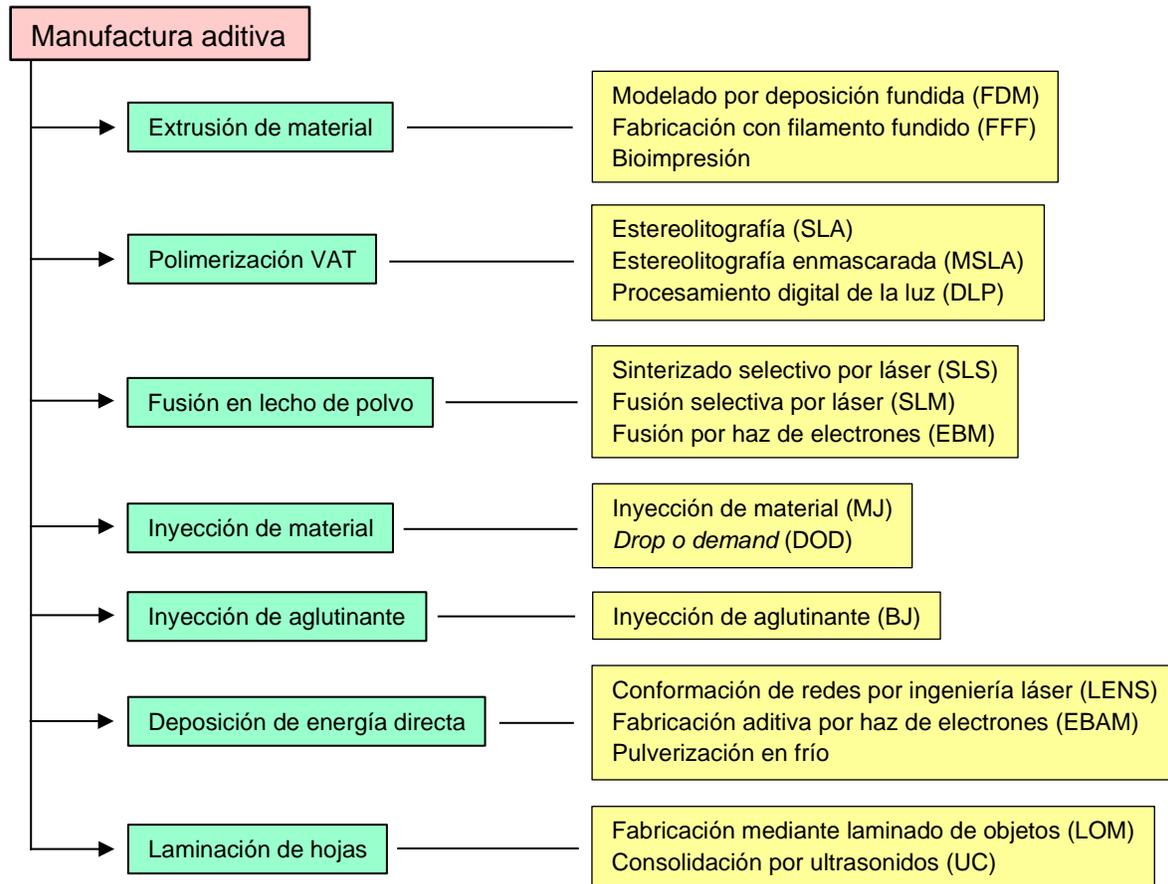


Figura 1-2: Clasificación de las técnicas de manufactura aditiva [13], [14].

### 1.2.1.1 Impresión tridimensional por modelado por deposición de fundidos (FDM)

El modelado por deposición fundida es una de las técnicas de MA más comunes, fáciles y rentables para obtener andamios 3D con geometría altamente controlada a partir de una amplia variedad de materiales y es una de las metodologías MA más exploradas para aplicaciones biomédicas. Actualmente, existen tres tecnologías principales de fabricación aditiva de extrusión de materiales que se utilizan para imprimir andamios para ingeniería de tejidos, como se muestra en la Figura 1-3: (1) extrusoras alimentadas por filamento (FFF), (2) extrusoras de tornillo (típicamente alimentadas por gránulos de polímero) y (3) extrusoras de cartucho (típicamente alimentadas de hidrogel o gránulos de polímero). Los sistemas FDM alimentados por filamentos utilizan bobinas de filamentos de polímero. Estos

filamentos se introducen en una cámara de fusión calentada que está unida a la boquilla y se extruyen mediante un sistema de rodillos de arrastre motorizados. En los sistemas FDM de extrusión por tornillo, los gránulos de polímero se introducen en un tornillo que está rodeado por un barril. A medida que el tornillo gira, el polímero fundido es forzado a través de la boquilla al final del cilindro. Con respecto a los sistemas de extrusión de cartucho, existen dos tipos principales: los que aplican presión neumática al émbolo y los que lo presionan por desplazamiento mecánico con un motor eléctrico. La mayoría de las impresoras comerciales utilizan varias combinaciones diferentes de estas tecnologías e incluso son capaces de imprimir células en combinación con varios biomateriales para la fabricación de andamios [15], [16].

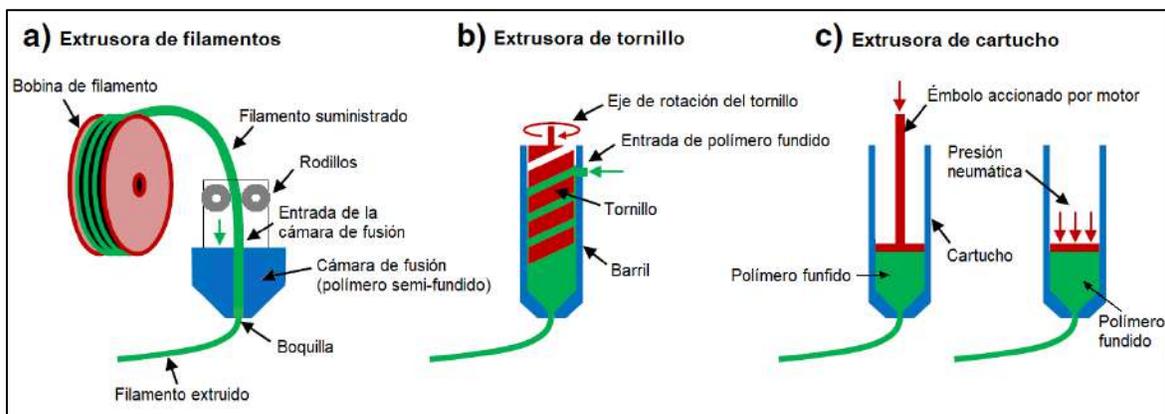


Figura 1-3: Esquema de las tres tecnologías principales de fabricación aditiva de extrusión de materiales. Adaptado de [15].

FDM de extrusión de gránulos en cartucho por presión neumática implica el calentamiento, la fusión y la extrusión de materiales termoplásticos altamente viscosos a través de una boquilla móvil para depositarlos en una plataforma que también se puede calentar y mover, para crear geometrías 3D complejas capa por capa. El equipamiento consta de un cartucho cilíndrico de acero inoxidable con microboquilla, un dispositivo de calentamiento del cartucho, un dispensador de aire comprimido y un sistema de microposicionamiento con movimiento tridimensional en los ejes x-y-z. Los gránulos del material se colocan en el cartucho y el calentador que lo rodea aumenta la temperatura del polímero uniformemente por encima su punto de fusión. Por consiguiente, cuando se aplica aire comprimido al polímero fundido, el material se extruye en forma de fibra a través de la microboquilla. Los movimientos tridimensionales del sistema de acuerdo con la trayectoria basada en la morfología CAD del andamio pueden fabricar estructuras microfibrasas en 3D mientras se extruye el polímero. De esta manera, los principales parámetros del proceso que afectan

las características de los andamios resultantes son el diámetro de la microboquilla, la temperatura de proceso del material, la presión de aire comprimido y la velocidad de la boquilla [10], [17], [18].

En la Figura 1-4 se muestra un modelo CAD de un andamio para ingeniería de tejidos por FDM donde se puede observar el gran control que se tiene sobre los parámetros geométricos de las matrices en términos de tamaño de poro, interconexión de poros y porosidad.

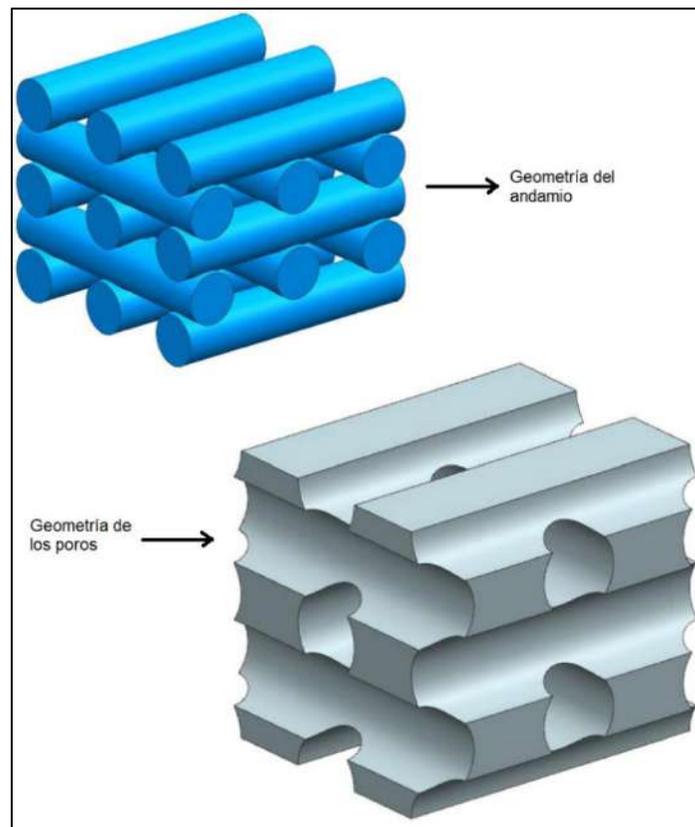


Figura 1-4: Modelo CAD de un andamio obtenido por FDM y de su porosidad. Adaptado de [15].

Los poliésteres biorreabsorbibles, como la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y el poli(ácido L-láctico) (PLLA), han sido los materiales más empleados para la preparación de andamios por FDM debido a su superior biodegradabilidad, biocompatibilidad y alta procesabilidad [12], [19]. Sin embargo, la resolución del andamio impreso en 3D no permite construir una estructura porosa que simule la MEC por sí sola. Es por esto que la resolución de los poros de los matrices plantea todavía un límite en la eficiencia de siembra de células y la formación de tejidos. El tamaño de poro de las estructuras FDM es relativamente grande

en comparación con la dimensión de una célula. Por lo tanto, se necesita una gran cantidad de células para obtener suficientes células adheridas que produzcan suficiente matriz extracelular para diseñar con éxito una construcción de tejido. Esto finalmente da como resultado procesos costosos y extensos de aislamiento, cultivo y expansión de células, lo que puede dificultar la relevancia clínica de los andamios obtenidos por esta técnica [20]. Asimismo, los filamentos obtenidos presentan una superficie relativamente lisa que no favorece la adhesión celular.

### **1.2.2 Electrohilado**

Una de las áreas de diseño de matrices extracelulares artificiales para ingeniería de tejidos se enfoca en el diseño de andamios constituidas por nanofibras unidimensionales. Esta aproximación surge del hecho de que se logra imitar la estructura fibrosa de las matrices extracelulares naturales, en donde moléculas biológicamente funcionales, células y componentes de la matriz extracelular interactúan a nivel nanométrico. Las técnicas mecánicas convencionales de producción de fibras permiten obtener fibras con diámetros en el orden del micrómetro [2]. El electrohilado es actualmente una de las técnicas más establecidas y ampliamente adoptadas para producir nanofibras continuas a partir de soluciones o fundidos de polímeros.

El proceso de electrohilado de solución se basa en el principio de la electrostática en el que las fuerzas de repulsión electrostáticas en un campo eléctrico elevado se utilizan para la síntesis de nanofibras. Es por esto que el término "electrohilado" se deriva de "hilado electrostático". La configuración convencional consta de cuatro componentes principales: una fuente de alimentación de alto voltaje, una jeringa con una aguja o capilar, una bomba conectada a la jeringa y un contraelectrodo/colector plano conectado a tierra. Actualmente hay dos configuraciones estándar de electrohilado, vertical y horizontal [4] (ver Figura 1-5).

Antes del electrohilado, los polímeros se disuelven en solventes y, cuando se disuelven por completo, forman una solución de polímero que se coloca en la jeringa. Durante el proceso, la solución es retenida por su tensión superficial al final de la aguja de la jeringa y se aplica un campo eléctrico entre la aguja (electrodo con carga eléctrica positiva) y el contraelectrodo mediante un voltaje de CC en el rango de varias decenas de kilovoltios. De esta manera, se induce una carga eléctrica en la superficie del líquido y, cuando el potencial aplicado alcanza un valor umbral, las fuerzas electrostáticas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial, produciendo la expulsión de la solución [21]. A medida que se

expulsa, la gota de solución en la aguja adopta una deformación en forma de cono debido a la diferencia de potencial entre la boquilla y el objetivo conectado a tierra. Esta región de inestabilidad se denomina cono de Taylor. Eventualmente, un microchorro cargado de la solución es acelerado desde la punta del cono hacia el contraelectrodo. Durante el tiempo de vuelo el solvente se evapora y la trayectoria inicialmente lineal comienza a formar inestabilidades de flexión debido a las fuerzas electrostáticas y la dinámica de fluidos. Esto lleva a la formación de nanofibras sólidas en el colector, las cuales se depositan continuamente para crear una malla de fibras no tejidas orientadas al azar [12], [17]. Debido a que puede haber diferentes niveles de inestabilidad, el electrohilado es una tecnología electrohidrodinámico que genera desafíos técnicos para controlar la deposición de fibras y obtener estructuras definidas [22]. El proceso de la formación del cono de Taylor se puede ver en la Figura 1-6.

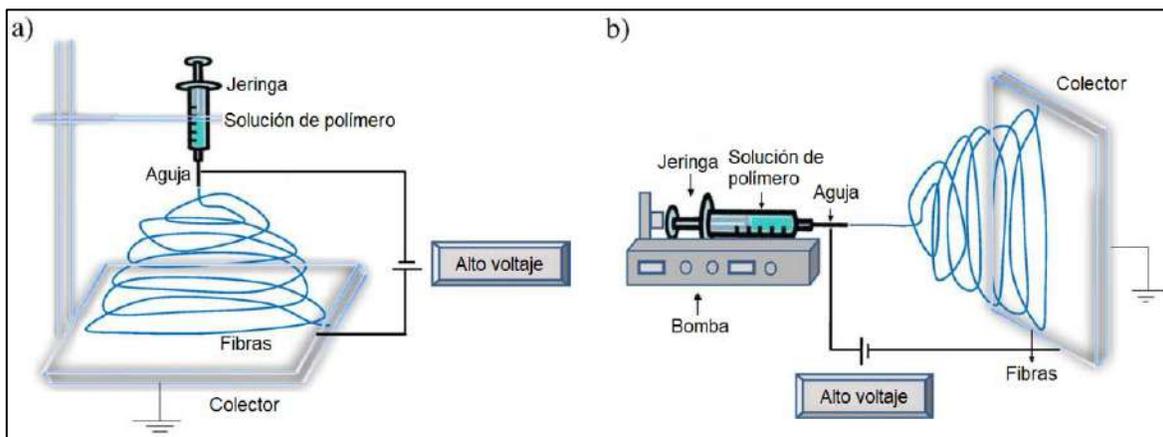


Figura 1-5: Esquema de la configuración del proceso de electrohilado. Adaptado de [21].

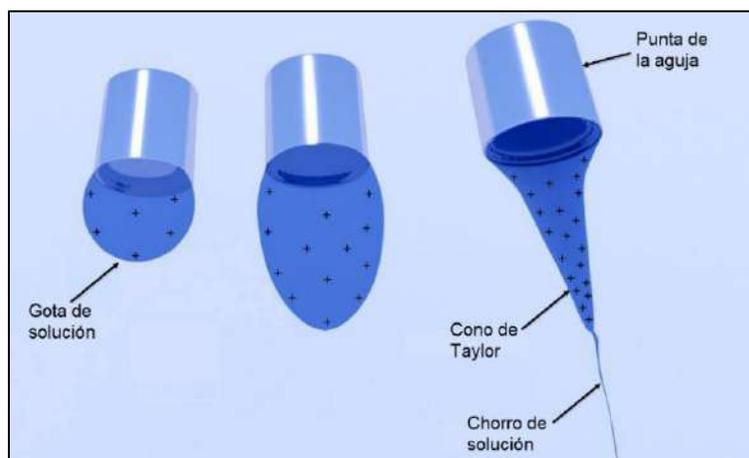


Figura 1-6: Esquema de la formación del cono de Taylor a medida que el campo electrostático aumenta y supera un valor umbral de manera que las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial del líquido y ocurre el electrohilado. Adaptado de [23].

Las estructuras obtenidas mediante este método son altamente porosas, de gran relación área/volumen y poseen una excelente interconexión de poros. Las ventajas del proceso incluyen una configuración simple, versátil y relativamente económica para producir fibras en el rango de diámetro de unos pocos nanómetros a varios micrómetros [1]. Incluso se han abordado los problemas de escalabilidad, utilizando múltiples sistemas de agujas o sistemas sin agujas. Además, se pueden electrohilar una gran variedad de polímeros sintéticos biocompatibles, polímeros naturales, cerámicos, metales o compuestos, cada uno con propiedades físicas, rendimiento mecánico, tasa de biodegradación e interacciones entre la célula y el material diferentes [11]. La selección específica de materiales depende mucho de los tipos y propiedades de los tejidos a regenerar así como de la duración de la regeneración. De esta forma, los andamios electrohilados promueven positivamente las interacciones célula-matriz y célula-célula de aquellas que posean una forma fenotípica y una expresión génica normales [21]. Es por esto que estas matrices proporcionan un soporte estructural de transición para la adhesión, migración, crecimiento, proliferación y diferenciación celular [11] hacia la síntesis de nuevas MEC naturales y la reparación posterior de los tejidos dañados. Además, proporcionan una vía para el transporte de nutrientes y el intercambio de desechos metabólicos, y pueden contener factores de crecimiento, drogas, principios activos y genes para estimular la regeneración de tejidos [2].

Sin embargo, la fabricación y el uso práctico de andamios nanofibrosos 3D a macroescala para ingeniería de tejidos siguen siendo un desafío. Esto se debe a que con el aumento del tiempo de electrohilado se acumulan mallas con una enorme densidad de fibras, lo que genera una disminución en el radio de poro medio. Por consiguiente, se crea un desajuste de gran tamaño entre los pequeños poros de la estructura y el tamaño físico más grande de las células. Esto, a su vez, limita la capacidad de las células para migrar y poblar el interior de los andamios con una profundidad creciente en condiciones normales de siembra pasiva. En consecuencia, se obtiene una distribución celular no uniforme y se generan tejidos casi bidimensionales que eventualmente no logran simular el microambiente fisiológico del tejido 3D. Por esta razón es de gran importancia formular un método que permita la fabricación de andamios permeables a las células utilizando la técnica de electrohilado [17], [21]. Además, las propiedades mecánicas de las nanofibras aún son deficientes y es difícil exponer las células cultivadas al entorno de estrés correcto para producir tejidos [24].

Los parámetros de la solución (estructura del polímero, peso molecular, concentración, tipo de solvente, viscosidad, conductividad y tensión superficial), los parámetros de procesamiento (voltaje aplicado, velocidad de flujo de la solución de polímero, distancia de la boquilla al colector, diámetro y número de boquillas, geometría y tipo de colector y polaridad del colector) y los parámetros ambientales (temperatura, humedad relativa, presión y velocidad del aire) afectan fuertemente la morfología y el diámetro de las fibras. Para producir nanofibras continuas libres de defectos y distribución de diámetro de fibra reproducibles, estos parámetros deben controlarse con precisión [4], [11], [25].

➤ Parámetros de la solución

- Concentración de polímero y viscosidad de la solución

Durante el electrohilado, las fuerzas viscoelásticas se oponen a las fuerzas de estiramiento que se generan en el chorro producto de que es acelerado hacia el contraelectrodo por la repulsión electrostática. A concentraciones bajas, y por ende viscosidades bajas, no se alcanzan suficientes enmarañamientos de las cadenas poliméricas, por lo que el campo eléctrico aplicado y la tensión superficial generan que los entrelazamientos se rompan y se obtengan gotas o perlas. Al aumentar la concentración, aumenta el enmarañamiento producto de la mayor viscosidad, por lo tanto el chorro no tiende a romperse debido a las mayores fuerzas viscoelásticas y se obtienen fibras (Figura 1-7). Sin embargo, aumentar demasiado la concentración genera una viscosidad muy alta que lleva a la formación de fibras de mayor diámetro producto de las mayores fuerzas viscoelásticas que se oponen al estiramiento y, por encima de un cierto límite, se interrumpe el flujo de polímero a través de la aguja. En consecuencia, existe un rango de concentraciones óptimo para el proceso de electrohilado. Dado que la concentración, la viscosidad y el peso molecular del polímero están correlacionados entre sí, estas últimas influyen en la determinación del rango de concentraciones a partir del cual se pueden obtener fibras continuas [26].

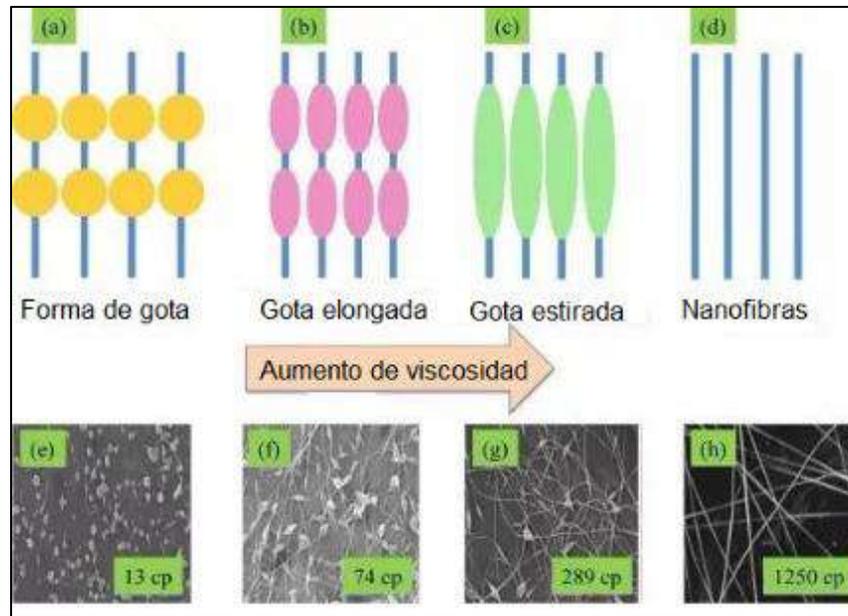


Figura 1-7: Esquema del efecto de la viscosidad en la morfología de las fibras electrohiladas. Adaptada de [27].

- Peso molecular del polímero

Se ha demostrado que existe una correlación entre los enredos de cadenas en la solución de polímero y la capacidad de electrohilado. El grado de enredos de la cadena se ve afectado por la longitud de la cadena molecular del polímero y la conformación de la cadena del polímero en solución. Es por esto que el peso molecular del polímero tiene un efecto significativo sobre las propiedades reológicas. De esta manera, al utilizar un polímero con alto peso molecular, incluso cuando la concentración es baja, se puede mantener un enmarañamiento suficiente de las cadenas de polímero, asegurando así una viscosidad de la solución que permita obtener un chorro uniforme durante el electrohilado y restringir los efectos de la tensión superficial. Se ha observado que un polímero de peso molecular demasiado bajo tiende a formar perlas en lugar de fibras, un polímero de alto peso molecular genera fibras con diámetros promedio más grandes y un polímero de peso molecular demasiado alto genera fibras con forma de listón. Los pesos moleculares altos no siempre son esenciales para el proceso de electrohilado si suficientes interacciones intermoleculares pueden proporcionar un sustituto para el enmarañamiento de las cadenas [21], [28].

- Tensión superficial

Para obtener fibras es necesario que las fuerzas electrostáticas vencan la tensión superficial. Generalmente, la alta tensión superficial de una solución inhibe el proceso de electrohilado debido a la inestabilidad de los chorros y genera gotas. Reducirla ayuda a que se produzca el electrohilado con un campo eléctrico más bajo y a que las fibras se puedan obtener sin perlas. Sin embargo, no necesariamente una tensión superficial más baja será siempre más adecuada para electrohilado. El valor de la tensión superficial depende tanto del polímero como del solvente [21].

- Conductividad eléctrica de la solución

La conductividad determina la capacidad de transporte de carga, siendo ésta mayor para soluciones de alta conductividad. En general, con el aumento de la conductividad hay una disminución significativa en el diámetro de las nanofibras electrohiladas. Esto se debe a que el chorro formado a partir de una solución de alta conductividad se ve sometido a mayores fuerzas de estiramiento al aplicar una cierta diferencia de potencial. Con una baja conductividad no se generan suficientes cargas en la superficie de la gota para formar el cono de Taylor y el electrohilado no es posible. Las soluciones altamente conductoras son muy inestables en presencia de fuertes campos eléctricos, lo que da como resultado una gran inestabilidad de flexión y una distribución de diámetro amplio. La conductividad de la solución está determinada por el tipo de polímero, el solvente utilizado y de la incorporación de sales que agregan portadores de carga [21].

- Tipo de solvente

Elegir el solvente adecuado es importante para lograr la disolución completa de un polímero. A su vez, la temperatura de ebullición de un solvente, indicativo de su volatilidad, también debe considerarse. En general, se emplean solventes volátiles porque aumentan la velocidad de evaporación del mismo. Solventes poco volátiles podrían generar una evaporación incompleta al llegar al colector, lo que conduciría a la obtención de fibras planas o fusión de fibras. Solventes muy volátiles pueden evaporarse muy rápidamente y secar la solución en la punta de la aguja, lo que genera que se obstruya el flujo de solución [29]. Además, es posible definir buenos solventes a aquellos en los que se favorecen las interacciones polímero-solvente, mientras que en los malos solventes se favorecen las interacciones polímero-polímero y se obtienen gotas. También pueden emplearse mezclas de solventes para obtener porosidad en la superficie de las fibras [30].

➤ Parámetros de procesamiento

- Voltaje aplicado

Solo después de alcanzar el voltaje umbral, se inducen las cargas necesarias en la solución e inicia el proceso de electrohilado y la formación de fibras. Este valor depende de cada sistema. En la mayoría de los casos, un voltaje más alto provoca un mayor estiramiento del chorro debido a las mayores cargas inducidas en la solución, y estos efectos conducen a una reducción en el diámetro de la fibra y también a una rápida evaporación del solvente. A mayor voltaje hay mayor probabilidad de obtener fibras con defectos [26].

- Velocidad de flujo

Siempre debe haber un caudal mínimo de la solución de hilado que logre balancear la solución eyectada de la aguja con la solución que la reemplaza para evitar la formación de perlas. Una velocidad menor a la mínima produce fibras con defectos, mientras que una velocidad mayor lleva a la formación de fibras de mayor diámetro debido al incremento de la cantidad de solución disponible en el cono de Taylor. Una velocidad demasiado alta no permite que el solvente tenga suficiente tiempo para evaporarse antes de llegar al colector, lo que da como resultado fibras en forma de perlas y se pueden generar gotas de exceso que son atraídas al colector [26].

- Distancia entre la punta y el colector

Se requiere una distancia mínima para dar tiempo suficiente a que el solvente se evapore antes de llegar al colector. Con distancias demasiado cercanas se generan fibras de forma plana debido a la evaporación incompleta. Al aumentar la distancia, el diámetro de las fibras disminuye debido a que el chorro experimenta un mayor tiempo de estiramiento. A distancias muy largas pueden depositarse gotas en vez de fibras [29].

- Tipos de colectores

En la configuración convencional las nanofibras generadas se depositan en un colector plano de forma aleatoria debido a la inestabilidad de flexión del chorro altamente cargado. Sin embargo, en ciertas aplicaciones se requiere una dirección de crecimiento distinta para las células. Es por esto que varios grupos de investigación han desarrollado sistemas más sofisticados que pueden fabricar estructuras nanofibrosas más complejas de una manera más controlada y eficiente. El colector rotatorio (Figura 1-8) es muy usado en la actualidad

para la obtención de fibras alineadas que ayudan a promover la adhesión celular. La alineación de la fibra está determinada por la velocidad de rotación del colector [31].

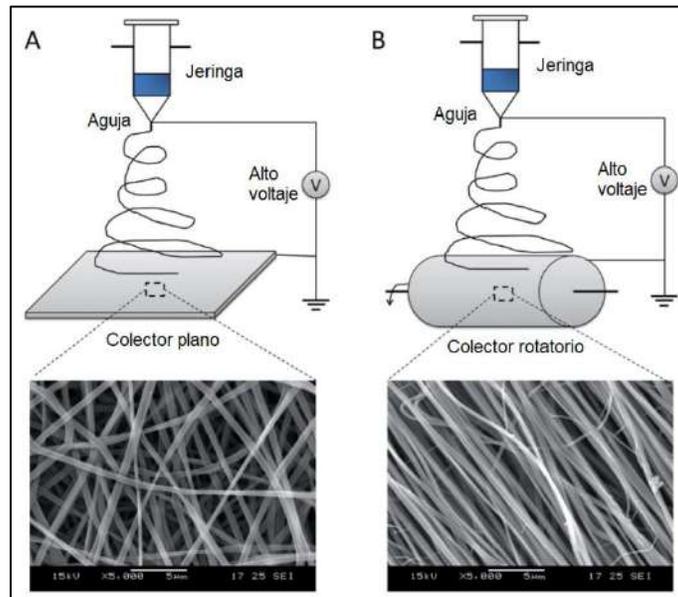


Figura 1-8: Esquema representativo de un colector plano con obtención de fibras al azar y un colector rotatorio con obtención de fibras alineadas. Adaptado de [32].

➤ Parámetros ambientales

- Temperatura

Al aumentar la temperatura, disminuye la viscosidad y aumenta la velocidad de evaporación del solvente. Al disminuir la viscosidad se obtienen fibras de menor diámetro debido a la menor resistencia viscoelástica. Si se genera una viscosidad demasiado baja, la solución carece de las fuerzas viscoelásticas requeridas para suprimir el efecto de la tensión superficial y se obtienen perlas. A su vez, a mayor velocidad de evaporación, el microchorro se encuentra expuesto a las fuerzas de estiramiento por menos tiempo, por lo que se obtienen fibras de más gruesas [33].

- Humedad

La humedad afecta el diámetro y la morfología de las fibras al influir en la velocidad de evaporación del solvente. Este fenómeno es diferente para cada sistema polímero-solvente, por lo que no se pueden encontrar generalidades. Se han observado tanto disminuciones como aumentos en el diámetro de las fibras al aumentar la humedad e incluso que, a muy baja humedad, un solvente volátil puede secarse muy rápidamente en comparación con la eliminación del solvente de la punta de la aguja. Esto último genera que el proceso de

electrohilado solo pueda llevarse a cabo durante unos minutos antes de que se obstruya la punta de la aguja [21].

### **1.2.2.1 Electrohilado con solventes benignos**

Luego del proceso de electrohilado puede ocurrir que queden residuos de solvente en las mallas fibrosas obtenidas. Los solventes más utilizados para el procesamiento son los orgánicos tóxicos, por lo que la presencia de estos residuos produciría mallas que no son adecuadas para una aplicación biomédica. Es por esto que las muestras obtenidas deben ser procesadas posteriormente para eliminar o neutralizar los residuos tóxicos, por ejemplo, mediante liofilización o secado al vacío. El contenido de estos residuos debe ser inferior a los límites de exposición informados en las reglamentaciones [22]. La detección de posibles solventes residuales en las fibras electrohiladas es crucial y para esto se pueden usar varias técnicas, como el análisis de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar los efectos en la superficie de la fibra debido a las diferentes velocidades de evaporación del solvente [30].

Sin embargo, no solo podría presentarse un problema en la aplicación final de las mallas, sino también en la seguridad y el impacto ambiental relacionado con el uso de estos solventes. Por esta razón, se ha introducido el concepto de "electrohilado verde" [30]. Esta tendencia consiste en el uso de solventes no tóxicos/benignos en lugar de los solventes más comúnmente utilizados en electrohilado, lo que mejora la citocompatibilidad de las mallas. La palabra "benigna" se refiere a solventes con bajo potencial tóxico (Clase 3) según la guía ICH (Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano) [25]. De acuerdo con la clasificación reportada en ICH existen 3 clases de solventes: la clase 1 incluye solventes a evitar, relacionados con carcinógenos humanos conocidos, carcinógenos humanos fuertemente sospechados y peligros ambientales; la clase 2 incluye solventes a limitar, relacionados con carcinógenos animales no genotóxicos o posibles causantes de otra toxicidad irreversible y solventes sospechosos de otras toxicidades significativas pero reversibles; y la clase 3 incluye solventes con bajo potencial tóxico y no se necesita un límite de exposición basado en la salud o tienen una exposición diaria permitida de 50 mg o más por día [30].

Dentro de los solventes tóxicos normalmente usados se encuentran el cloroformo, diclorometano, TFA, THF, HFP, entre otros, que pertenecen a las clases 1 o 2. Los solventes benignos empleados comúnmente son el agua, ácido acético, ácido fórmico,

etanol, acetato de etilo o mezclas de estos [26]. El uso de solventes clase 3 no solo mejora la citocompatibilidad de las mallas sino que también genera un impacto positivo en la seguridad de los trabajadores de laboratorio y los problemas de gestión de desechos [25].

Entre los biomateriales poliméricos, la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) es uno de los polímeros más investigados en el campo de la ingeniería de tejidos. La disolución de PCL, gelatina y la mezcla de ambos polímeros utilizando solventes individuales o mezclas de solventes, como agua, etanol, ácido fórmico, ácido acético y acetona, para obtener nanofibras ya se ha informado en la literatura [25], [34], [35], [36].

### **1.2.3 Técnicas combinadas de impresión 3D/electrohilado**

Un proceso reproducible y controlado para el diseño y la fabricación de andamios es uno de los elementos más importantes para promover la ingeniería de tejidos. Además, es necesario el desarrollo de andamios tridimensionales con señales topológicas físicas y químicas a escala macro, micro y nanométrica. Si bien ya existen numerosas técnicas de fabricación de andamios, cada método de procesamiento tiene sus desventajas. Esto genera que muchos de los factores que deben tenerse en cuenta al fabricarlos, como el tamaño de los poros, la porosidad total, la interconectividad de los poros, la rigidez del andamio, la química de la superficie del material, etc., no puedan ajustarse con precisión utilizando una única técnica de procesamiento. Por lo tanto, las deficiencias dentro de cada tecnología podrían resolverse combinando distintos métodos para diseñar y fabricar morfologías de andamios con una gran complejidad arquitectónica que cumplan más fielmente los requisitos de la mayoría de las aplicaciones de ingeniería de tejidos [7], [17], [22].

Ya se ha explicado en las secciones anteriores las ventajas y desventajas tanto de electrohilado como de FDM. Brevemente, si bien las características morfológicas y nanotopográficas están presentes, el electrohilado conduce a estructuras con malas propiedades mecánicas, diámetros de poros bajos y con una gran densidad de fibras que dificultan la infiltración celular, por lo que las células solo crecen sobre la superficie de las mallas. Además, la acumulación de carga con las fibras depositadas restringe el número de capas que permanecen unidas como una estructura coherente. Por lo tanto, debido a la escala de las fibras, el grosor de los andamios que se puede lograr se limita a dos dimensiones, lo que no es suficiente para reparar defectos de tejido con dimensiones más altas. Si bien existen técnicas de recolección de fibras diseñadas para mejorar la colección

ordenada de las mismas, el proceso aún se basa en una deposición caótica de fibras y ninguna de estas técnicas ofrece la ubicación precisa de las fibras y el control sobre la arquitectura del andamio como lo hacen los procesos MA. Mediante FDM se pueden fabricar estructuras 3D que facilitan el transporte masivo de oxígeno y nutrientes en el interior del andamio, el tiempo de procesamiento es corto y se pueden fabricar andamios personalizados. Sin embargo, la fabricación de estructuras con una resolución más baja que imiten la MEC está limitada, por lo que el tamaño de poro de las estructuras FDM es relativamente grande en comparación con la dimensión de una célula [7], [22], [24].

La combinación de FDM y electrohilado (Figura 1-9) se describió por primera vez como un esfuerzo por hacer andamios bimodales, donde se combinen señales de micro y nanoescala. En este sentido, la estructura FDM determina la arquitectura general de los andamios 3D y proporciona suficiente resistencia mecánica para apoyar el crecimiento interno del tejido. Los filamentos FDM forman poros grandes interconectados mientras que las nanofibras electrohiladas se depositan sobre el andamio obtenido por impresión 3D, cumpliendo la doble ventaja de funcionar como un "tamiz" para el atrapamiento de células y proporcionar señales similares a la MEC. Se ha observado que múltiples topografías físicas, como surcos, crestas, poros, escalones y nodos, tienen un efecto significativo en el tipo de comportamiento celular. En otras palabras, las células sembradas podrían detectar la topografía de la superficie de las nanofibras, lo que induciría diferentes reacciones celulares con respecto a la superficie lisa de los filamentos FDM. Asimismo, la estructura nanofibrosa puede mejorar la adsorción de proteínas en la superficie de las estructuras. Como la interacción célula-sustrato inicial es inducida por la absorción de proteínas en la superficie del sustrato, un aumento en el nivel de proteína absorbida puede mejorar la adhesión celular. De esta manera, las nanofibras aumentan el área de superficie disponible para la adhesión y proliferación celular, y promueven la infiltración celular [17], [24].

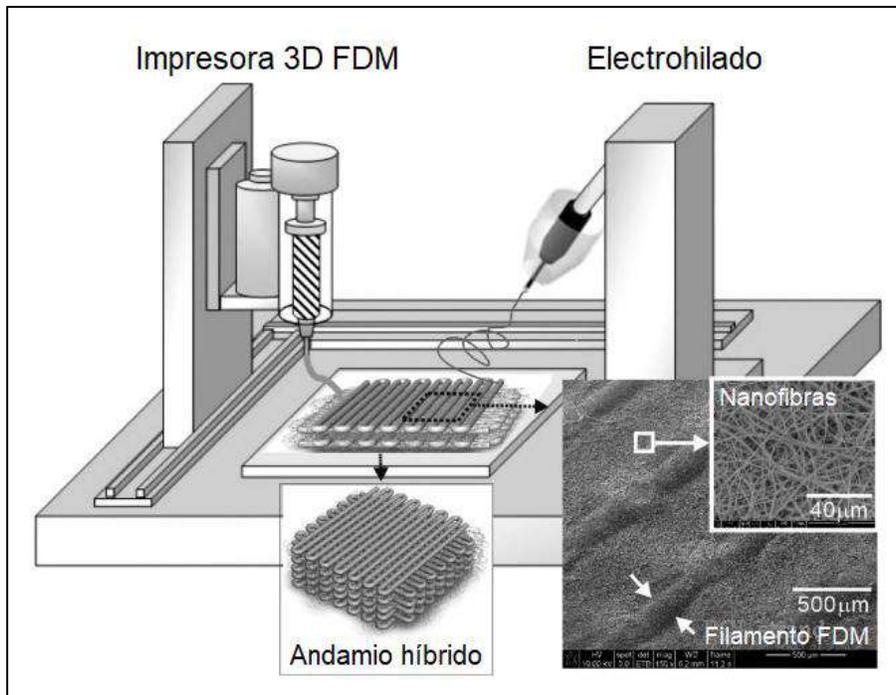


Figura 1-9: Esquema del proceso híbrido combinando impresión 3D por FDM y electrohilado. Adaptado de [24].

### 1.3 Biomateriales poliméricos

Los biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos incluyen a los polímeros, algunos cerámicos, y compuestos polímero/cerámicos. Se pueden procesar través de diversas técnicas para obtener distintas estructuras de andamiajes. La elección del biomaterial depende de la aplicación específica y de las propiedades mecánicas, químicas y biológicas que brinde.

Los polímeros presentan una gran ventaja debido a su biocompatibilidad y procesabilidad. Es por esto que son ampliamente utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos. Dependiendo de su origen se pueden clasificar en polímeros sintéticos y polímeros naturales.

#### 1.3.1 Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos pueden producirse a gran escala de manera que no haya variación de lote a lote y, en general, poseen mayor procesabilidad y mejores propiedades mecánicas que los polímeros naturales. Además, reducen al mínimo el riesgo de transporte de elementos patógenos o contaminantes. De esta forma, mediante la correcta elección del

polímero se pueden ajustar las propiedades mecánicas necesarias (viscoelasticidad y resistencia) y la velocidad de degradación deseada para cada aplicación [21].

Los poliésteres sintéticos tradicionales pueden proporcionar la resistencia necesaria para la estabilidad estructural, muy conveniente para aplicaciones donde deben soportar cargas. Sin embargo, son materiales no elásticos con una rigidez relativamente alta y no son ideales para la ingeniería de tejidos blandos [1]. Además, ninguno de los poliésteres tradicionales posee una cadena pendiente químicamente reactiva para la fijación de fármacos, agentes de entrecruzamiento y grupos biológicamente activos [2].

Los polímeros sintéticos más utilizados y ampliamente estudiados en aplicaciones biomédicas son los poliésteres hidrofóbicos biodegradables, como el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL).

#### **1.3.1.1 Poli( $\epsilon$ -caprolactona)**

La PCL es un polímero semicristalino, biorreabsorbible y biocompatible de bajo costo y posibilidad de almacenamiento a largo plazo aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. Pertenece a la familia de los poliésteres lineales alifáticos y posee alta resistencia mecánica y estabilidad térmica, y un extenso tiempo de degradación en condiciones fisiológicas, propiedad atractiva para aplicaciones a largo plazo y liberación controlada de fármacos. Su punto de fusión se encuentra entre los 58 a 63°C y su temperatura de transición vítrea es de aproximadamente -60°C. En comparación con otros tipos de biomateriales, la PCL presenta una gran flexibilidad de diseño debido a su baja temperatura de fusión y ha visto un aumento en el uso con el advenimiento de FDM. Al tener excelentes propiedades reológicas y viscoelásticas al calentarse, es uno de los principales candidatos para la impresión por extrusión basada en fusión. Además, debido a su historial en dispositivos de administración de fármacos, la PCL tiene un camino regulatorio más corto hacia el mercado que muchos otros sistemas de polímeros, lo que aumenta aún más sus beneficios [10], [16], [37].

La rigidez y el perfil de degradación extendido del PCL lo hacen útil principalmente para la ingeniería de tejidos duros. Su estructura está formada por grupos metileno no polares y grupos éster polares (ver Figura 1-10). Debido a la presencia de un mayor número de grupos hidrofóbicos -CH<sub>2</sub>, la hidrólisis completa del material podría tardar hasta 4 años. La degradación ocurre por la rotura hidrolítica de los enlaces éster y la migración fuera del

seno del material de los oligómeros resultantes. No se desencadena ninguna reacción inmune ni al poco tiempo de la implantación en el cuerpo ni durante la hidrólisis y, dado que el material conserva su estructura semicristalina en condiciones fisiológicas durante un largo período después de la implantación, su integridad mecánica general no se ve comprometida. Adicionalmente, la erosión superficial de la PCL dentro del cuerpo lo convierte en un sistema interesante para la administración de fármacos y factores de crecimiento en andamios impresos porque el comportamiento de degradación lento permite la liberación controlada de biomoléculas atrapadas [16], [38].

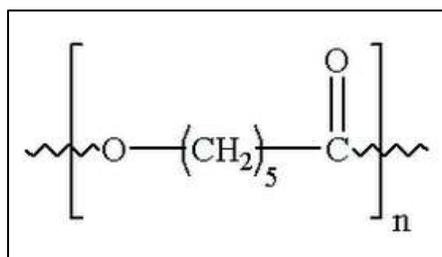


Figura 1-10: Estructura química de la poli(ε-caprolactona) [39].

Sin embargo, la PCL muestra propiedades hidrofóbicas. Debido a este factor y a la falta de sitios de reconocimiento celular en la superficie, el polímero tiene una afinidad celular limitada [37]. La combinación de PCL con polisacáridos naturales hidrofílicos es un método prometedor para mejorar su biocompatibilidad. De cualquier manera, la regeneración de muchos tejidos requieren materiales no tan rígidos y un módulo elástico más bajo [10], [40].

En definitiva, las propiedades inherentes de la PCL la hacen fácilmente procesable y permite el diseño de andamios utilizando técnicas de impresión 3D y electrospinning. La PCL es soluble en una amplia variedad de solventes, incluidos solventes benignos, y tiene buena miscibilidad con otros polímeros, pudiendo ser utilizado para mejorar el electrohilado de diversos polímeros naturales.

### 1.3.2 Polímeros naturales

Los polímeros de origen natural o biopolímeros típicos incluyen al colágeno, quitosano, gelatina, caseína, acetato de celulosa, quitina, fibrinógeno, laminina, ácido hialurónico, almidón y elastina, entre otros. Estos son macromoléculas producidas por microorganismos, plantas y animales, y pueden ser obtenidos a partir de componentes de la MEC. Son biodegradables, metabólicamente compatibles y presentan baja toxicidad [26]. Normalmente exhiben mejor biocompatibilidad que los polímeros sintéticos. Algunos

polímeros naturales se utilizan a menudo para preparar andamios nanofibrosos porque su mezcla con polímeros sintéticos puede mejorar la citocompatibilidad general del andamio. Esto se debe a su capacidad inherente para unirse a las células producto de su carácter hidrofílico y de que poseen sitios de reconocimiento celular que mejoran las interacciones célula/biomaterial. Estas son secuencias de proteínas específicas [21], [37]. Por lo tanto, los andamios nanofibrosos compuestos por mezclas de polímeros combinan las características biológicas altamente favorables y deseadas de los polímeros naturales y el rendimiento mecánico (es decir, resistencia y durabilidad) de los sintéticos [11].

Entre las principales desventajas se encuentran la variabilidad en sus propiedades de lote a lote producto de su origen de fuentes naturales, su posible inmunogenicidad, las débiles propiedades mecánicas, la rápida biodegradabilidad y los problemas de procesabilidad. Se descomponen a temperaturas menores a su temperatura de fusión por lo que no son aptos para el procesamiento termoplástico y tienen tendencia a formar soluciones viscosas similares a geles en bajas concentraciones, lo que dificulta la posibilidad de que estas soluciones sean procesadas por electrohilado [30].

### **1.3.2.1 Gelatina**

La gelatina (Figura 1-11) es una proteína fibrosa compuesta por una secuencia única de aminoácidos. Se obtiene a partir del colágeno mediante hidrólisis que provoca la pérdida de su estructura terciaria al romper los enlaces intermoleculares. Independientemente del proceso de hidrólisis que convierte el colágeno en gelatina, ambos biopolímeros tienen en la composición de su estructura primaria hasta 20 aminoácidos diferentes en proporciones variables. Esta estructura primaria proporciona segmentos RGD (L-arginina-glicina-L/ácido aspártico), una secuencia de reconocimiento de tres aminoácidos para la adhesión celular mediada por integrinas [11]. La influencia de la MEC en las actividades celulares se produce mediante la unión de moléculas de la MEC a receptores de la superficie celular, conocidos como integrinas. La adhesión celular mediada por integrinas es de gran importancia ya que vincula la MEC con el citoesqueleto y la cascada de transducción de señales para regular la forma, la diferenciación, la adhesión, la migración y la proliferación celular en muchos sistemas [9].

Las propiedades de la gelatina dependen de la fuente de colágeno (generalmente bovino o porcino), la edad del animal, el tipo de colágeno y del tipo de conversión del colágeno a gelatina (hidrólisis ácida o básica). En general, exhibe buena biocompatibilidad y

biodegradabilidad, posee carácter hidrofílico, es de bajo costo, y tampoco es inmunogénico. Una ventaja importante de la gelatina sobre otras proteínas estructurales, como el colágeno, es el hecho de que no ha mostrado fenómenos de desnaturalización como producto de la interacción con el campo eléctrico aplicado durante el proceso de electrohilado. Según el procedimiento de pretratamiento (antes del proceso de extracción) se pueden obtener dos tipos de gelatina. El pretratamiento ácido (gelatina tipo A) apenas afecta a los grupos amida, mientras que el pretratamiento alcalino (gelatina tipo B) se dirige a los grupos amida de asparagina y glutamina y los hidroliza en grupos carboxilo. Como proteína, la gelatina exhibe un comportamiento anfótero debido a la presencia de grupos funcionales tanto ácidos como básicos, resultado de la existencia de grupos funcionales de aminoácidos y grupos amino y carboxilo terminales [11], [21].

La gelatina no es electrohilable a partir de soluciones acuosas por debajo de alrededor de 30°C porque ocurre la gelificación, lo que hace imposible el electrohilado a temperatura ambiente. Además, la alta tensión superficial de las soluciones de agua complica el electrohilado debido a la desestabilización del chorro de polímero. La alta temperatura de ebullición del agua introduce un problema adicional ya que la evaporación no completa del agua antes de llegar al colector conduce a la fusión de las fibras. Otro método para obtener nanofibras es mediante el uso de ciertos disolventes orgánicos y de solventes benignos como el ácido acético y las soluciones acuosas de ácido fórmico [11], [26].

Para aplicaciones biomédicas, la disolución y pérdida de estructuras tridimensionales de la gelatina en condiciones fisiológicas a temperaturas típicas en condiciones *in vivo* e *in vitro* es un desafío importante a superar. Hay dos métodos principales de estabilización de la estructura de la gelatina, ya sea mediante entrecruzamiento químico o la mezcla física con otros polímeros, lo que también mejora las correspondientes propiedades mecánicas [26].

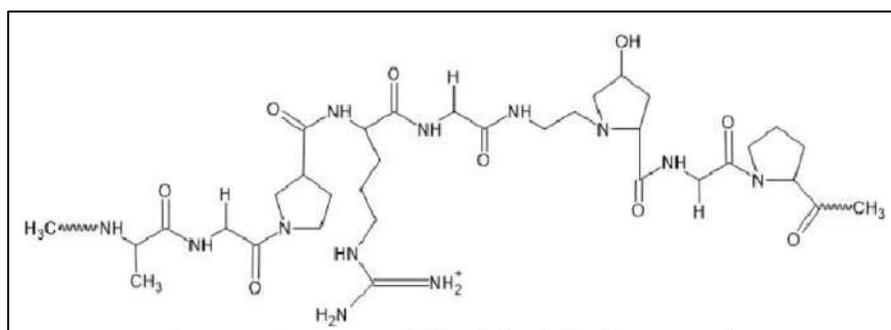


Figura 1-11: Estructura química de la gelatina [41].

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivos generales**

El presente proyecto tiene como finalidad obtener matrices poliméricas biomiméticas mediante el empleo de tecnologías de impresión tridimensional y electrohilado, para su uso en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa al actuar como matrices extracelulares temporarias.

Así mismo, el proyecto busca estimular y fortalecer las actividades de cooperación de la División Polímeros Biomédicos de INTEMA (UNMdP – CONICET) con el *Institute of Biomaterials, Department of Material Science and Engineering, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg* (Alemania), bajo la dirección del Prof. Dr.-Ing. hábil. Aldo R. Boccaccini, y el intercambio de estudiantes de grado y docentes investigadores en el marco del Programa I.DEAR.

### **2.2 Objetivos específicos**

Los objetivos específicos propuestos son:

- Diseñar y preparar micro/nanoestructuras mediante la combinación de procesos de manufactura aditiva (impresión tridimensional por deposición directa de polímeros fundidos, FDM) seguida de electrohilado de soluciones con solventes benignos (no tóxicos).
- Caracterizar la morfología y propiedades superficiales de las muestras.
- Estudiar el proceso de degradación hidrolítica.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las matrices preparadas.
- Analizar la posibilidad de fabricar las matrices mediante un equipamiento integrado al comparar equipos separados e integrados en el mercado.

## **3 Materiales**

Para la obtención de las matrices por impresión tridimensional se utilizó poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, 45 kDa, Sigma-Aldrich, Alemania) en forma de pellets. El recubrimiento de nanofibras por electrospinning se obtuvo al preparar una solución de PCL y gelatina (~ 300 g. Bloom, Tipo A, de Sigma-Aldrich, Alemania), utilizando como solvente ácido acético glacial (AA) obtenido de VWR (Alemania).

Para el ensayo de degradación in vitro se empleó una solución buffer-fosfato salina (PBS, grado biotecnológico, pH 7.4) comprado a VWR (Alemania).

En los ensayos de cultivo celular se empleó suero bovino fetal (FBS; F2442, Sigma-Aldrich, Alemania), medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Thermo Scientific, Alemania), tripsina/EDTA (Thermo Scientific, Alemania) y una solución buffer-fosfato salina de Dulbecco (DPBS 1X, Thermo Scientific, Alemania). La línea celular de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF) se obtuvo del *Translation Research Center (TRC)*, *Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nuremberg* [42].

## **4 Métodos**

### **4.1 Obtención de matrices impresas**

Se fabricaron matrices de PCL mediante la técnica de impresión tridimensional por deposición directa del polímero fundido. Para esto se utilizaron dos impresoras 3D distintas: GeSiM BioScaffolder 3.1 (Radeberg, Alemania) y Cellink Bio X (Gothenburg, Sweden). Para el diseño de las estructuras se utilizó un *software* de diseño y modelado 3D (CAD). Una vez obtenidos los formatos CAD, se convirtieron a formato STL y fueron interpretados por los *softwares* propios de las impresoras: GeSiM Robotics para la BioScaffolder 3.1 y el sistema operativo HeartOS y DNA Studio para la Bio X. Los andamios se imprimieron en una plataforma fija por deposición capa por capa a través de un cartucho con boquilla de diámetro pequeño con movimientos en los ejes x-y-z. En este se colocaron los pellets de PCL y se calentaron hasta una temperatura constante superior a la temperatura de fusión del material, comprendida alrededor de los 60°C. Luego de 1 hora se dio comienzo a la impresión y los filamentos de PCL fueron solidificando inmediatamente a temperatura ambiente a medida que eran posicionados. Los parámetros de procesamiento se optimizaron en ambos equipos para lograr estructuras con filamentos y poros homogéneos. En este sentido, el diámetro y la temperatura de la boquilla se mantuvieron constantes, mientras que se acomodaron tanto la presión como la velocidad de impresión. Los parámetros resultantes se presentan en la Tabla 4-1.

Las geometrías finales de las matrices se diseñaron con un patrón de orientación ortogonal entre las capas, obteniéndose estructuras cilíndricas con la impresora GeSiM y estructuras cúbicas con la impresora Cellink. A su vez, se trataron de fabricar andamios de 2, 3 y 4 capas con la BioScaffolder 3.1.

En las Figura 4-1y Figura 4-2 se pueden observar las impresoras BioScaffolder 3.1 y Cellink BioX en funcionamiento.

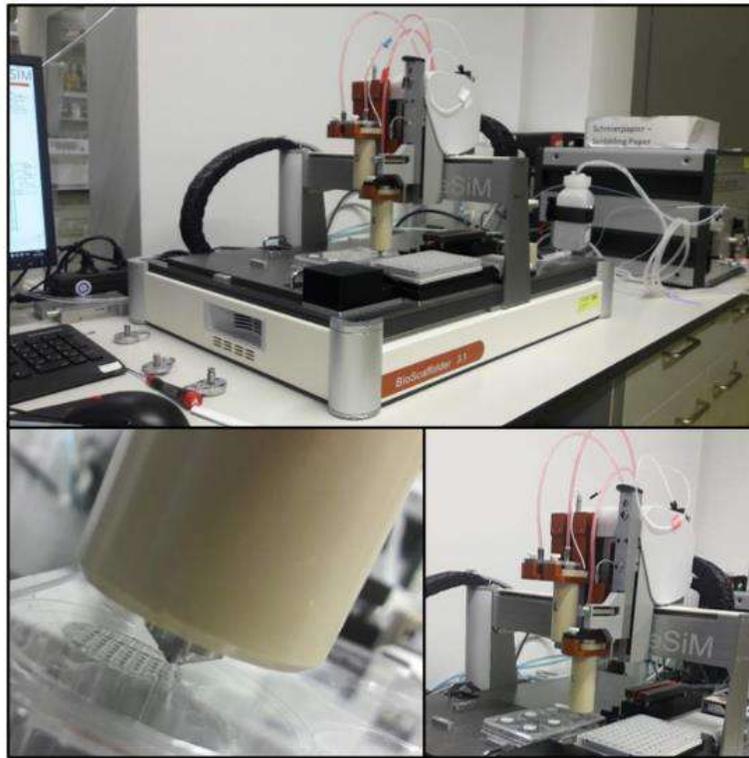


Figura 4-1: Obtención de matrices mediante la impresora GeSiM BioScaffolder 3.1.

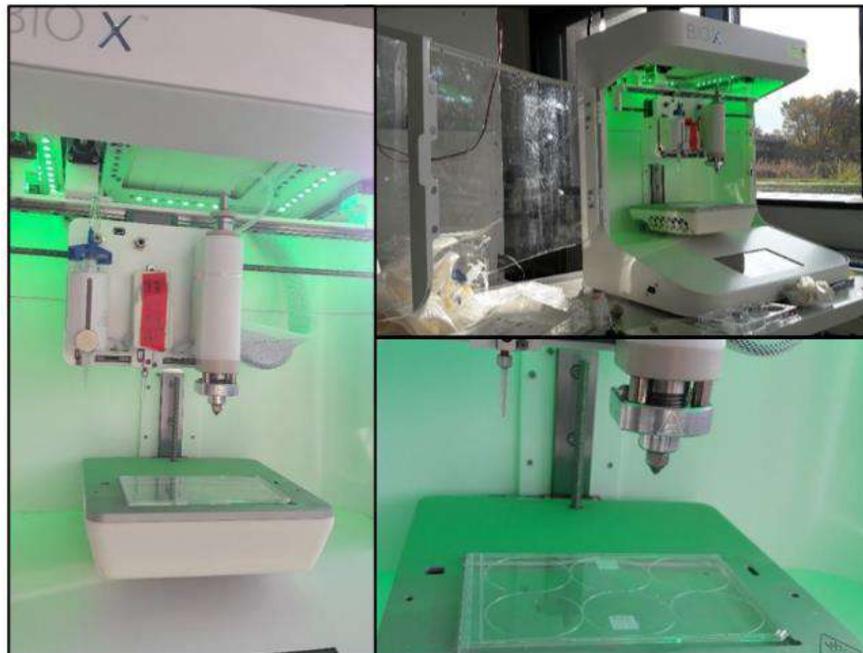


Figura 4-2: Obtención de matrices mediante la impresora Cellink BioX.

Tabla 4-1: Parámetros de procesamiento para los dos equipos utilizados.

	Temperatura de boquilla (°C)	Velocidad de impresión (mm/s)	Presión de extrusión (kPa)	Diámetro boquilla (µm)
GeSiM BioScaffolder 3.1	80	3.5	450	250
Cellink Bio X	80	3	270	450

## 4.2 Recubrimiento de matrices impresas con nanofibras electrohiladas

El recubrimiento de las matrices impresas de PCL con nanofibras se realizó por electrohilado de soluciones poliméricas de PCL y gelatina (mezcla de polímero sintético/biopolímero). Para esto se siguió un proceso previamente optimizado [42].

### 4.2.1 Preparación de la solución

Para preparar la solución, primero se disolvió el polvo de gelatina GEL (4.8 %, w/v) en ácido acético glacial AA (90 %, v/v) a 45°C por 4 horas. Luego de que la gelatina se disolviera, se agregaron los pellets de PCL (11.2 %, w/v) a la solución y se la dejó bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. Finalmente, se cargó la solución en una jeringa. La concentración total de polímero en el solvente AA se fijó en 16% (w/v).

El proceso de la preparación de la solución y obtención de las nanofibras se esquematiza en la Figura 1-3.

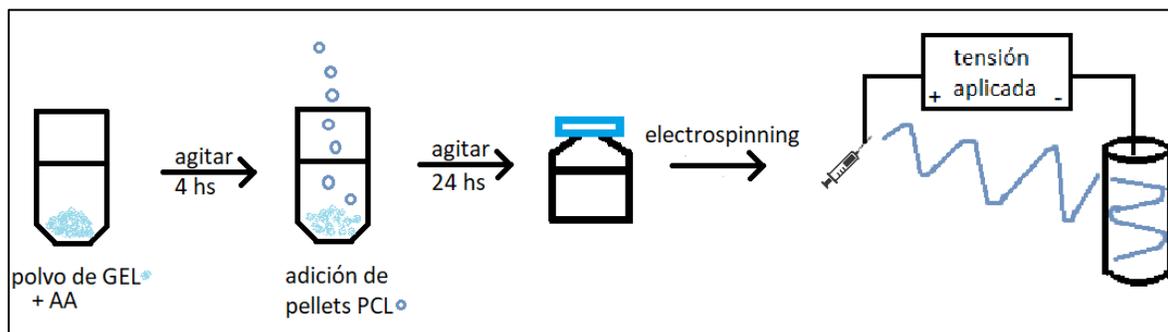


Figura 4-3: Esquema de la preparación de la solución de PCL/gelatina.

### 4.2.2 Electrohilado

Las nanofibras de PCL/gelatina fueron fabricadas utilizando un equipo de electrohilado comercial (IME's *medical electrospinning machines*, EC-16 CLI, IME Technologies, Netherlands). La solución resultante se cargó en una jeringa de polipropileno de 3 mL equipada con una aguja de diámetro 23G. El tipo de colector utilizado fue un mandril rotatorio para obtener fibras alineadas, al cual se lo envolvió en un film de aluminio. La velocidad de rotación del mandril fue de 500 rpm. Los parámetros de electrohilado para obtener una morfología controlada se detallan a continuación.

La distancia de procesamiento fue de 12 cm desde la punta de la aguja al colector. El proceso de electrohilado se llevó a cabo conectando la aguja y el colector a una fuente de polaridad positiva y negativa respectivamente, y aplicando una diferencia de potencial de 20 kV, siendo el voltaje de +19 kV en la aguja y de -1 kV en el colector. La velocidad de infusión de la solución se estableció en 0.6 mL/h. Las condiciones de humedad y temperatura se fijaron en 25°C y 25% respectivamente, y se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso. Además, se instaló el accesorio de boquilla para gas de protección con un flujo de nitrógeno de 8 mL/min para optimizar el cono de Taylor [42]. El recubrimiento de las matrices de PCL se realizó con distintos tiempos de deposición: 3, 5, 10 y 30 minutos de electrohilado. Al finalizar, las muestras fueron almacenadas a 4°C en la oscuridad hasta su posterior análisis. En la Figura 4-4 y Figura 4-5 se muestran las muestras almacenadas y el equipo de electrohilado.



Figura 4-4: Muestra almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis.



Figura 4-5: Disposición del equipo de electrohilado previo al procesamiento.

### 4.3 Caracterización morfológica

#### 4.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las matrices obtenidas se evaluó mediante microscopia SEM empleando un microscopio Everhart-Thornley detector (SE2), AURIGA base 55, Carl Zeiss, perteneciente al IB FAU, Alemania. Las muestras se recubrieron inicialmente con una fina capa de oro (Q150T Turbo-Pumped Sputter Coater/Carbon Coater, Quorum Technologies) [42] para luego ser analizadas utilizando un haz de electrones acelerado a 2 kV (*ETH-Electron high tension*).

#### 4.3.2 Determinación del diámetro de fibras

A partir de las micrografías obtenidas mediante SEM se determinó el diámetro de 100 fibras distintas seleccionadas al azar mediante el *software* ImageJ NIH. Con los resultados obtenidos se elaboró un histograma de la distribución de diámetros de las fibras y se calculó el valor medio del diámetro de fibras para las matrices estudiadas.

### **4.3.3 Determinación de la orientación de fibras**

La orientación de las fibras se determinó utilizando el complemento Directionality de ImageJ, el cual computa un histograma que indica la cantidad de fibras en una dirección dada. Este método se basa en el análisis del espectro de Fourier. El complemento corta la imagen en pedazos cuadrados y aplica una transformada de Fourier para obtener sus espectros de potencia. Estos últimos se analizan en coordenadas polares y se mide la potencia para cada ángulo [43].

## **4.4 Caracterización química**

### **4.4.1 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Los grupos funcionales de las matrices de PCL sin y con recubrimiento de nanofibras de PCL/gelatina se analizaron con la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), utilizando un espectrómetro IRAffinity-1S, Shimadzu. Los espectros FTIR se obtuvieron realizando 32 barridos con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  y variando el número de onda de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

## **4.5 Caracterización superficial**

### **4.5.1 Ángulo de contacto (CA)**

La determinación del ángulo de contacto de la superficie de los materiales se realizó con un goniómetro (Modelo 500, Ramé-Hart Instruments Co., USA), utilizando el método de la gota sésil. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. De esta manera, con una micropipeta se depositaron gotas de  $1\ \mu\text{l}$  de agua destilada (MilliQ) sobre la superficie de las matrices de PCL con y sin recubrimiento de PCL/gelatina, y se tomaron fotos. Para las matrices sin recubrimiento se tomaron 100 fotos, mientras que para los andamios con recubrimiento la medición se detuvo antes de llegar a las 100 fotos debido a que la gota se adsorbía por completo. Luego, en cada imagen se midió el ángulo formado entre la gota y la matriz en los extremos de la izquierda y/o derecha de la gota, y se calculó el ángulo de contacto medio con el *software DROPimage Advanced*. El procedimiento se repitió al menos tres veces por muestra.

## 4.6 Ensayo de degradación *in vitro*

Se prepararon tres muestras de las matrices impresas de PCL y tres muestras de las estructuras combinadas de PCL/gelatina para cada uno de los tiempos predeterminados: 1, 3, 7, 14 y 21 días. Se evaluó el grado de hinchamiento y la pérdida de masa de las muestras por degradación hidrolítica mediante inmersión en PBS (pH = 7.4) como medio fisiológico a 37°C.

### 4.6.1 Hinchamiento

Inicialmente se pesaron todas las muestras en una balanza analítica, obteniendo el peso inicial de todas las matrices ( $W_i$ ). A continuación, cada muestra fue inmersa en 10 mL de solución buffer-fosfato salina (PBS) de pH = 7.4 y colocada en una incubadora a 37°C y 75 rpm. Al cumplirse los tiempos estipulados de incubación, se removieron los andamios, se lavaron tres veces con agua desionizada para remover sales residuales del buffer y se secaron con papel para remover el exceso de agua. Finalmente se pesaron nuevamente, obteniéndose el peso mojado ( $W_w$ ). El grado de hinchamiento se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{(W_w - W_i)}{W_i} \times 100$$

### 4.6.2 Degradación

Luego de obtenerse el peso mojado  $W_w$ , las muestras anteriormente inmersas en PBS y lavadas con agua desionizada se secaron en la incubadora a 37°C durante 3 días (Figura 4-6). Al cabo de este periodo se pesaron en la balanza analítica y se obtuvo el peso seco ( $W_d$ ). El porcentaje de pérdida de masa en función del tiempo se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{(W_i - W_d)}{W_i} \times 100$$

Así mismo, se monitoreó que el pH del medio se mantuviera en 7.4 durante la degradación en todos los tiempos fijados.



Figura 4-6: Muestras colocadas dentro de la incubadora a 37°C y 75 rpm.

#### 4.6.3 FTIR

Asimismo, después de calcularse el peso seco  $W_d$  se analizaron los espectros FTIR de las muestras degradadas para evaluar los grupos funcionales y los cambios químicos que pudieran haber ocurrido durante el proceso de degradación. El análisis se realizó con la técnica FTIR-ATR como ya se describió anteriormente para 1, 3, 7, 14 y 21 días. Los espectros FTIR se obtuvieron realizando 32 barridos con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  y variando el número de onda de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.7 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad de las matrices impresas de PCL y PCL/gelatina se evaluó usando una línea celular de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) para obtener una noción del comportamiento biológico. Para esto se realizaron dos ensayos *in vitro*. Por un lado, la viabilidad celular de las muestras se analizó empleando un kit colorimétrico de conteo de células CCK-8 (Sigma-Aldrich). Como un indicador adicional de la viabilidad celular y la adhesión de las células a la superficie de las matrices, se realizó una tinción del citoplasma y del núcleo.

#### 4.7.1 Cultivo celular

Las células NHDF fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (PS) en matraces de cultivo celular (Nunc, Denmark) y se incubaron a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire hasta alcanzar la confluencia [42]. A continuación, las células se separaron por tripsinización usando tripsina/EDTA y luego se prosiguió a realizar el conteo de las mismas mediante el método de exclusión de colorante azul tripano (Figura 4-7). Este método se basa en que las células vivas excluyen el colorante azul tripano y por lo tanto aparecen claras y brillantes bajo el microscopio, mientras que las células muertas absorben el tripano y aparecen de color azul bajo el microscopio. Para esto se tomaron 100 µL de la suspensión de células y se mezclaron con 100 µL de tripano azul. Esta mezcla se utilizó para llenar ambos lados de la cámara de un porta-objeto hemocitómetro (Roth, Alemania), también llamado cámara de Neubauer mejorada, y se lo observó en el microscopio (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, Alemania) usando una magnificación de 10x para contar las células vivas. La concentración de células viables se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{células vivas}}{\text{mL}} = \frac{\text{nro. de células vivas contadas}}{\text{nro. cuadrados grandes de esquina contados}} \times \text{factor dilución} \times 10.000$$

Donde el factor de dilución se calculó como:

$$\text{factor de dilución} = \frac{\text{vol. final de la mezcla}}{\text{vol. de las células}} = \frac{200\mu\text{L}}{100\mu\text{L}} = 2$$

La concentración de células viables resultó de ser 35.000 células/mL, por lo tanto, para sembrar 100.000 células por cada placa de pocillos se armó una suspensión final de células de 2.86 mL a la cual se le agregó 7.14 mL del medio de cultivo DMEM modificado con FBS y PS. Luego se pipetearon 500 µL de medio a cada andamio para humedecerlos, los cuales habían sido previamente colocados en placas de 12 pocillos y esterilizados por radiación de luz ultravioleta durante 30 minutos. Al pasar 15 minutos se quitó el medio y se agregó la suspensión de células. Nuevamente se esperaron 15 minutos antes de cambiar los andamios a nuevas placas de 12 pocillos para que solo las células en la superficie de las matrices influyeran en el resultado de los ensayos. Finalmente, se agregó una pequeña cantidad de medio a cada pocillo y se colocaron las placas en el incubador a 37°C con una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Los tiempos de cultivo fueron de 1, 3 y 7

días para el ensayo de viabilidad celular con el kit WST-8, y 1 y 7 días para el ensayo de tinción de citoplasma y núcleo.

Se debe aclarar que debido a un error a la hora de agregar la suspensión de las células, estas no se cultivaron a una densidad de 100.000 células/placa, sino a una densidad de aproximadamente 10.000 células/placa.

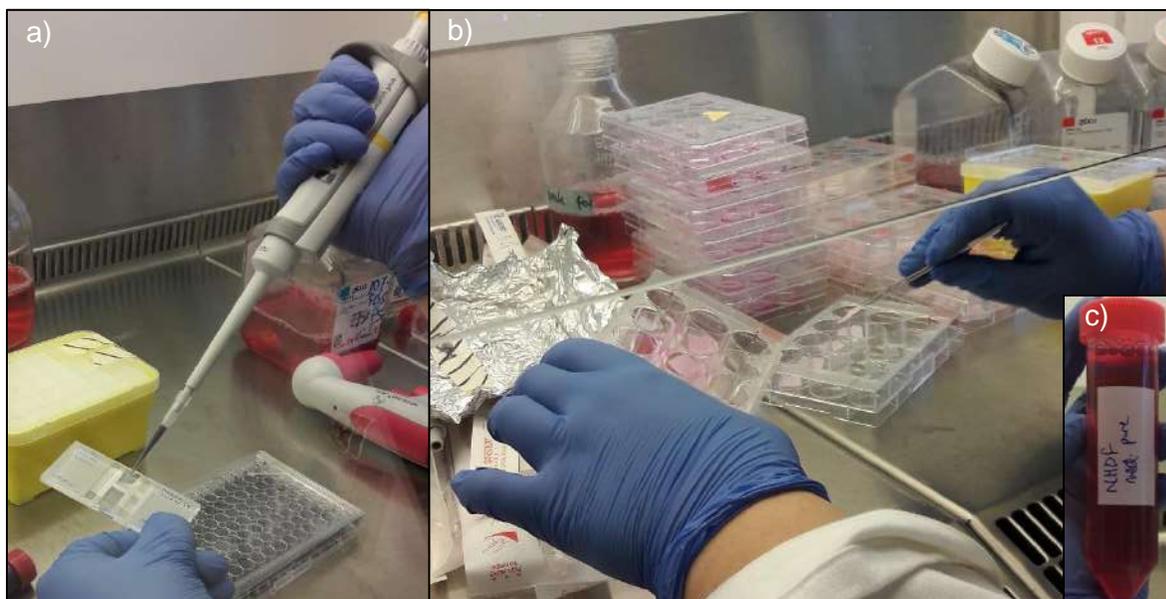


Figura 4-7: a) conteo de las células viables mediante el método de exclusión del colorante azul tripano, b) andamios siendo movidos a una nueva placa luego de la siembra celular y c) suspensión celular obtenida luego de separar las células de los frascos de cultivo usando tripsina.

#### 4.7.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular de las células NHDF fue analizada empleando un kit colorimétrico de conteo de células CCK-8. Este ensayo utiliza una sal de tetrazolio altamente soluble en agua (WST-8) que produce un colorante de formazán soluble en agua tras la reducción en presencia de un portador de electrones. En este sentido, el reactivo WST-8 es reducido mediante enzimas deshidrogenasas secretadas por las mitocondrias de células metabólicamente activas para dar un producto de color amarillo (formazán), que es soluble en el medio de cultivo. La cantidad de colorante de formazán generado por la actividad de las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional al número de células vivas [44].

Al cumplirse los tiempos de cultivo, se removió el medio de las muestras y se lavaron con DPBS para remover las células no adheridas. Posteriormente, se incubaron por 3 horas con 10% del reactivo WST-8 en DMEM. Luego de la incubación, el reactivo WST-8 reducido se pipeteó a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando una lectora de placas espectrofotométricas (PHOmo, anthos Mikrosysteme GmbH, Alemania). Finalmente, el porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{(Amuestra - Ablank)}{(Areferencia - Ablank)} \times 100$$

Donde Amuestra, Areferencia y Ablank representan la absorbancia de las muestras, de las células más el medio de cultivo utilizado como control, y del reactivo WST-8, respectivamente.

Todas las muestras se midieron en triplicado y fueron normalizadas con respecto a la referencia.

#### **4.7.3 Tinción de citoplasma y núcleo**

Como un indicador adicional de la viabilidad celular y la adhesión de las células a la superficie de las matrices, los citoplasmas de las células vivas se tiñeron con éster de acetoximetilo de calceína verde (Calceína, InvitrogenTM, EE.UU.) y la integridad de los núcleos se evaluó mediante tinción azul con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, InvitrogenTM, EE.UU.), colorante que se une a regiones ricas en A-T en moléculas de ADN. Para esto, una vez cumplidos los tiempos de cultivo, se removió el medio de las muestras y se lavaron con DPBS para remover las células no adheridas. Luego se agregó 1 ml de una solución de DPBS que contenía 4  $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$  de Calceína y se cubrieron las muestras con film de aluminio por 15 minutos. Paso seguido, se lavaron nuevamente las muestras con DPBS, se fijaron las células y nuevamente se lavó con DPBS para después agregar 1 ml de una solución de DPBS que contenía 1  $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$  de DAPI. Las muestras se cubrieron con film de aluminio por otros 15 minutos y se lavaron con DPBS. Finalmente, se examinaron los andamios usando un microscopio de fluorescencia (MF) Axio Scope A.1, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Alemania.

## 4.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) con Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.). Para evaluar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de grupos múltiples se aplicó la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un \*p valor < 0,05. Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD).

## 5 Resultados y discusión

Se fabricaron matrices de PCL mediante la técnica de impresión tridimensional por deposición directa del polímero fundido, a las cuales se las designó como PCL. Así mismo, a estas matrices se las recubrió con nanofibras de PCL/gelatina obtenidas por el método de electrohilado, designadas PCL/gel. Se las caracterizó química, superficial y morfológicamente, y se estudió su degradación y citotoxicidad *in vitro* para determinar si las matrices obtenidas por procesos combinados resultaban más aptas para su uso en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa.

### 5.1 Fabricación de estructuras poliméricas porosas

#### 5.1.1 Impresión 3D por FDM de PCL

Usando la tecnología FDM fue posible fabricar matrices impresas porosas de PCL, siguiendo los parámetros establecidos en la Tabla 4-1. La Figura 5-1 y Figura 5-2 muestran las estructuras obtenidas empleando las impresoras GeSiM BioScaffolder 3.1 y la Cellink Bio X, respectivamente. Se puede observar que los poros de los andamios cilíndricos no fueron homogéneos a lo largo de toda la estructura, sino que presentaron desviaciones de la geometría de poro idealmente rectangular diseñada. Esto demostró la dificultad para obtener estructuras porosas bien controladas e interconectadas. Por otro lado, no fue posible diferenciar la cantidad de capas impresas en las matrices, sobre todo al aumentar el número de capas. Esto quiere decir que no se conservó la integridad de los filamentos individuales, dándose el colapso entre estos y en consecuencia de la estructura. Además, al momento de la deposición, parte del material no lograba separarse de la boquilla al pasar de la impresión de una capa a otra, lo que producía que se arrastran parte de los filamentos ya posicionadas que no habían llegado a solidificar por completo. Esto se muestra en la Figura 5-1c, donde se puede observar que falta parte de material en las zonas cercanas a

los bordes. Por lo tanto, ante la imposibilidad de obtener poros con tamaño y forma bien definidos e interconectados, y de obtener estructuras con una buena integridad, no se pudo garantizar la reproducibilidad de las matrices por impresión 3D. En consecuencia, las matrices fabricadas con la BioScaffolder 3.1 se descartaron para los análisis posteriores.

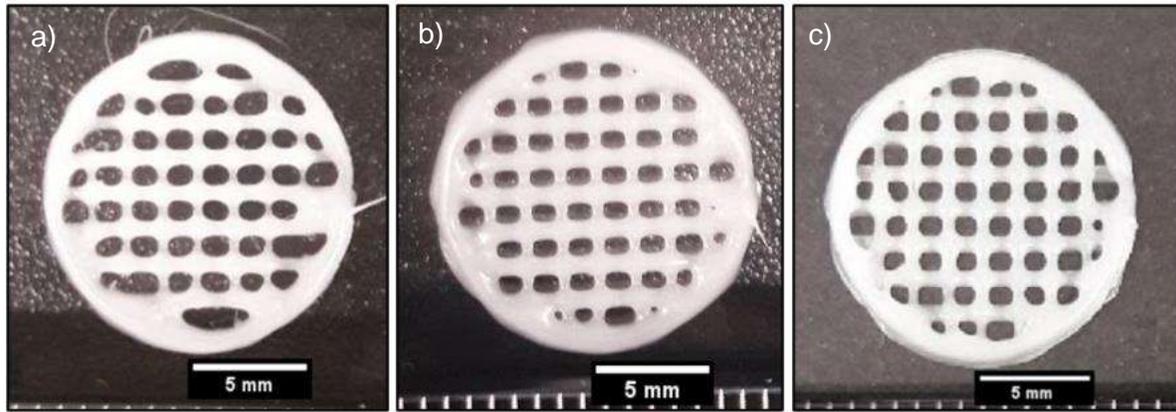


Figura 5-1: Matrices impresas de PCL obtenidas mediante la impresora 3D GeSiM BioScaffolder 3.1 de: a,b) 3 capas; c) 4 capas.

Los andamios obtenidos mediante la impresora Bio X mostraron tener una estructura regular con poros interconectados de forma y tamaño bien definidos. Los poros seguían una geometría cuadrada y fueron homogéneos a lo largo de toda la estructura. La integridad de los filamentos luego de la impresión se conservó, sin detectarse el colapso entre filamentos individuales. Por consiguiente, matrices de dos capas fueron replicadas y seleccionadas para los análisis posteriores.

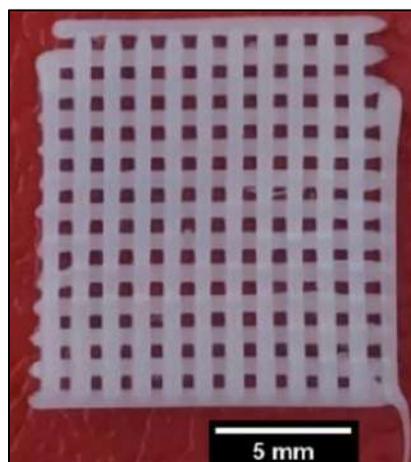


Figura 5-2: Matriz impresa de PCL de 2 capas obtenida mediante la impresora 3D Cellink Bio X.

### 5.1.2 Electrohilado de soluciones PCL-Gelatina

Las matrices impresas de PCL se recubrieron exitosamente con nanofibras de PCL/gel mediante la técnica de electrohilado usando los parámetros establecidos en la Introducción sección 4.2.2. Se produjeron muestras con distintos espesores de recubrimientos para evaluar la influencia del tiempo de electrohilado en la morfología y orientación de las fibras. Además, se las caracterizó químicamente. Para esto se fabricaron matrices de PCL con 3, 5, 10 y 30 minutos de electrohilado. A pesar de que en aquellos andamios con menor tiempo de procesamiento la remoción fue más difícil, en general todos pudieron ser manipulados con facilidad.

De igual manera, se lograron obtener condiciones de microchorro estable y una expulsión continua de fibras empleando ácido acético como solvente. El ácido acético está caracterizado como un solvente benigno y su uso fue necesario para evitar la posible presencia de trazas de solventes tóxicos en las fibras electrohiladas, mejorando su citocompatibilidad. De esta forma, se logró evitar la utilización de solventes orgánicos típicos como el cloroformo, lo que ayudó a generar un progreso en la seguridad de los trabajadores en el laboratorio y en la gestión de desechos. En la Figura 5-3 se puede observar una matriz de PCL con un recubrimiento de 3 minutos de electrohilado de PCL/gel.

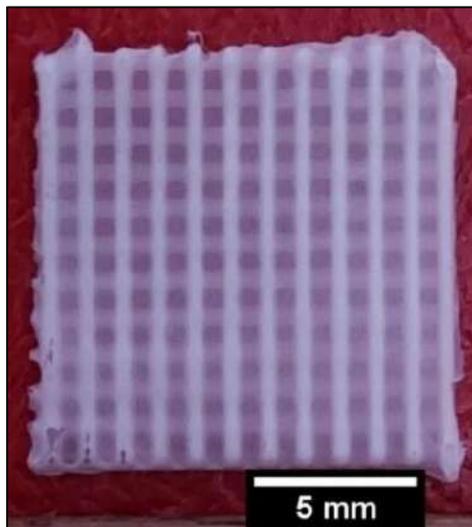


Figura 5-3: Matriz 3D de PCL con un recubrimiento de 3 minutos de electrohilado de PCL/gelatina.

## 5.2 Caracterización morfológica

La morfología de las matrices fabricadas se estudió mediante microscopía SEM. En la Figura 5-4 se muestran las micrografías obtenidas para una matriz de PCL fabricada por impresión 3D FDM. Se puede observar que utilizando el método de procesamiento de manufactura aditiva se logró tener un control preciso de la distribución espacial de los poros (tamaño, interconectividad y porosidad) y de la arquitectura de la matriz. Los filamentos presentaron un espesor de  $605.6 \pm 44.9 \mu\text{m}$  y los filamentos de la capa superior en las intersecciones presentaron un espesor de  $730.6 \pm 15.2 \mu\text{m}$ . La distancia entre filamentos fue de  $556.3 \pm 20.9 \mu\text{m}$ .

Sin embargo, la resolución obtenida a partir de esta técnica permite la generación de filamentos de tamaño mucho mayor a los que posee la MEC, por lo que estos andamios no imitan fielmente este aspecto estructural de la matriz extracelular. En consecuencia, el tamaño de poro entre los filamentos resultó muy grande comparado con el tamaño de las células, lo que dificulta la adhesión y cultivo de células. Los fibroblastos, por ejemplo, poseen un tamaño de entre  $10\text{-}15 \mu\text{m}$  [24]. Además, se observó que los filamentos impresos poseen una superficie lisa con presencia de algunos poros, muchas veces alineados, en su superficie. Esto podría ayudar a la adhesión celular inicial ya que las células han demostrado responder a defectos topográficos a escala nanométrica.

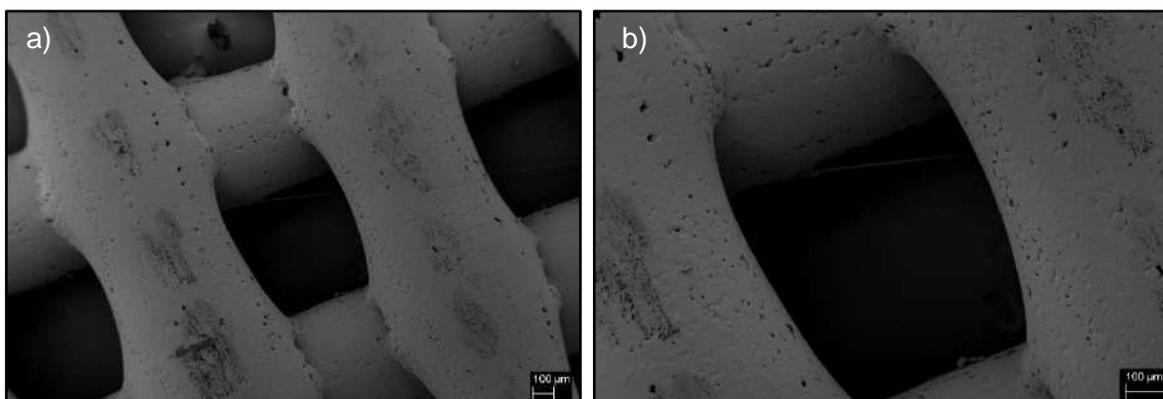


Figura 5-4: Micrografías SEM de una matriz de PCL de magnificación: a) 100x, b) 200x.

Por su parte, mediante el proceso de electrohilado se pudieron obtener mallas de nanofibras que imitan la estructura de las nanofibrillas de la MEC y su organización espacial (orientación de las fibras), además de poseer poros interconectados, una gran área superficial y porosidad alta. Las micrografías SEM para estructuras con recubrimientos de

3, 5, 10 y 30 minutos se observan en la Figura 5-5, Figura 5-7, Figura 5-9 y Figura 5-11, respectivamente. En todos los casos se lograron obtener fibras homogéneas y continuas con una morfología sin perlas. A medida que se aumentó el espesor de recubrimiento también se observó un mayor número de contactos fibra-fibra, lo cual era de esperarse debido al mayor tiempo de electrohilado y la mayor cantidad de fibras presentes. Así mismo, se incluyen los histogramas de distribución del diámetro de fibras y los diámetros medio de fibras. Se observaron distribuciones relativamente estrechas de los diámetros de las fibras, sobre todo para 3 y 5 minutos de electrohilado, lo que conlleva a una mayor uniformidad en la estabilidad y el proceso de degradación. Los resultados de diámetro medio de fibras fueron de  $220 \pm 50$ ,  $180 \pm 40$ ,  $210 \pm 70$  y  $240 \pm 60$  nm para 3, 5, 10 y 30 minutos de electrohilado, respectivamente. Estos valores son similares entre sí y se corresponden con el rango de valores descrito en literatura para nanofibras electrohiladas obtenidas en las mismas condiciones [42] y además se encuentran en el intervalo de diámetros de estructuras fibrilares propias de la MEC nativa.

Sin embargo, las nanofibras hiladas tienen algunos inconvenientes que limitan su desempeño en la regeneración de ciertos tejidos gruesos: estructura plana (bidimensional) de fibras densamente compactadas, espesor limitado, tamaño de poro pequeño y malas propiedades mecánicas [7]. En este sentido, las matrices de PCL/gel se fabricaron para aprovechar las ventajas y superar los inconvenientes que poseen ambos métodos de procesamiento. Como se mencionó anteriormente, al aumentar el tiempo de electrohilado se obtienen mallas con mayor densidad de fibras y por lo tanto poros de menor tamaño. Esto limita la habilidad de las células para migrar/infiltrarse hacia el interior de la matriz y la integración con el tejido del huésped después del tratamiento, dado el mayor tamaño de las mismas con respecto a los poros. Esto compromete la regeneración tisular. La falta de vascularización es otro factor limitante, ya que es fundamental para la difusión de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho (metabolitos) de las células o de lo contrario no sobreviven. Incluso a medida que aumenta el tiempo de electrohilado se produce una mayor densidad de fibras que logra cubrir por completo tanto los filamentos como los macroporos de las matrices de PCL. Es por esto que las matrices de PCL/gel con 3 minutos de recubrimiento se consideraron como las matrices con mejor relación morfología/composición y en consecuencia candidatas como matrices extracelulares temporarias para su uso en ingeniería de tejidos. El mayor espacio entre las fibras podría favorecer la penetración celular. Por lo tanto, los ensayos de ángulo de contacto,

degradación y citotoxicidad *in vitro* se realizaron para este tipo de muestras y la matriz base de PCL.

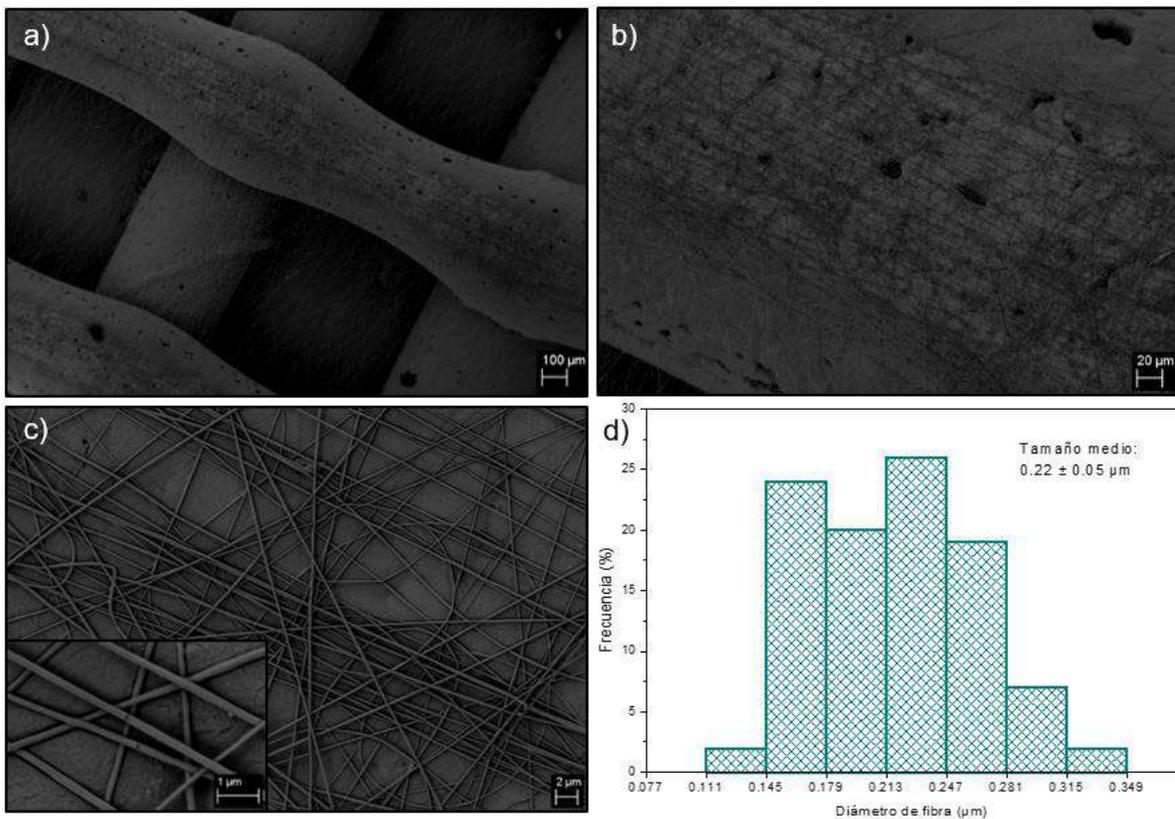


Figura 5-5: Micrografías SEM de una matriz de PCL3D con 3 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 500x, c) 5.000x y d) distribución de diámetro de fibra.

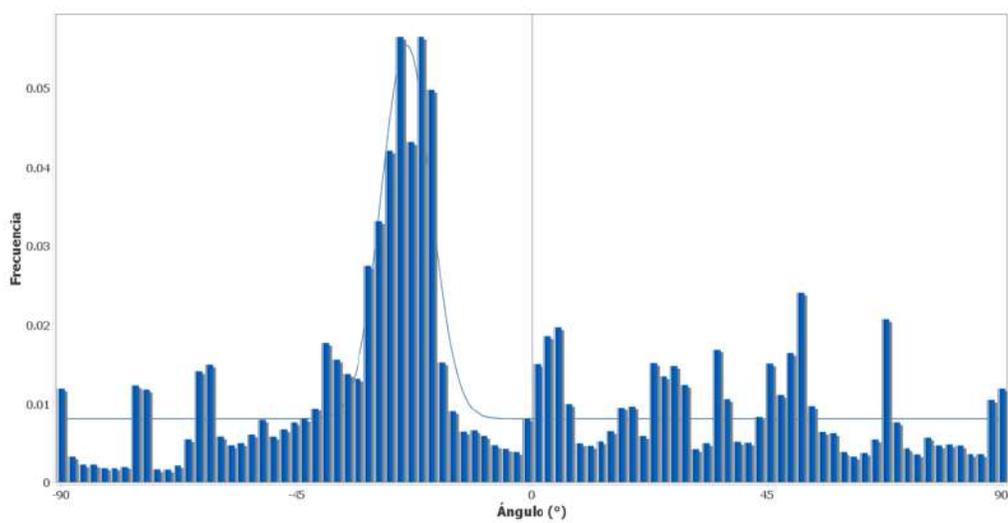


Figura 5-6: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL3D con 3 minutos de electrohilado de PCL/gelatina.

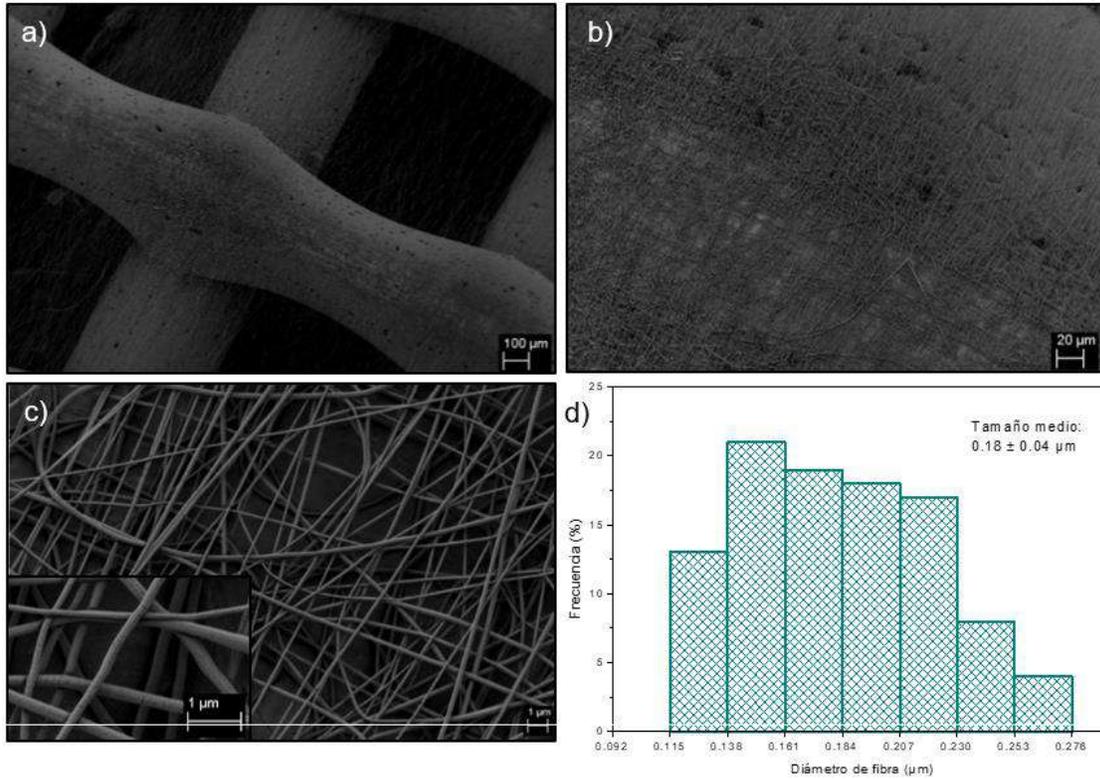


Figura 5-7: Micrografías SEM de una matriz de PCL3D con 5 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 500x, c) 10.000x y d) distribución de diámetro de fibra.

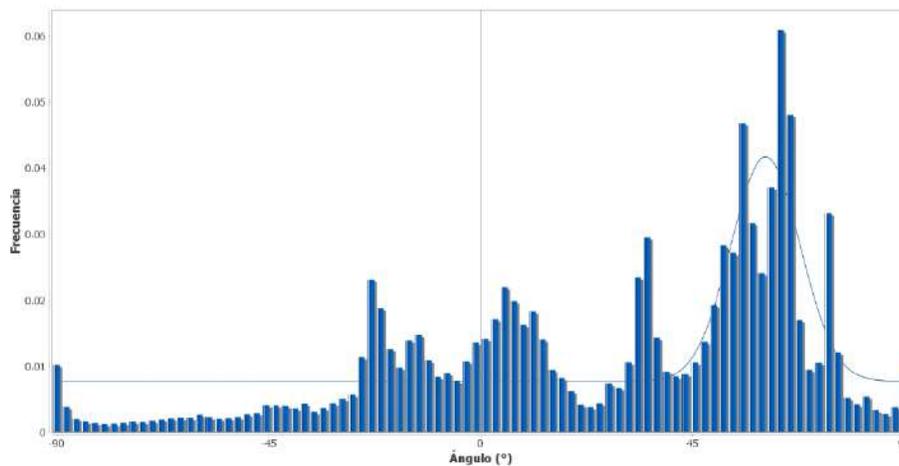


Figura 5-8: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL 3D con 5 minutos de electrohilado de PCL/gelatina.

Además, se ha reportado que la orientación de fibras mejora la adhesión, proliferación y la viabilidad celular, e incluso proporciona un estímulo externo para la disposición ordenada de las células [1], [11], [45], [46]. En este proyecto se utilizó un colector rotatorio con una velocidad de rotación de 500 rpm. Esto permitió obtener una tendencia hacia una orientación preferencial, como se puede observar en los histogramas de la distribución de

la orientación de las fibras (Figura 5-6, Figura 5-8, Figura 5-10, Figura 5-12). Si bien en todos los casos se observó una cierta orientación preferencial, esta fue menos marcada para el caso de recubrimientos de 3 y 5 minutos de electrohilado, mientras que para mayores tiempos de electrohilado la orientación de las fibras mejora. Esto se encuentra en concordancia con la literatura, donde se ha informado que se requieren velocidades de rotación del orden de 1000 rpm para obtener un mayor grado de alineación de las fibras, aun a menor tiempo de electrohilado [47].

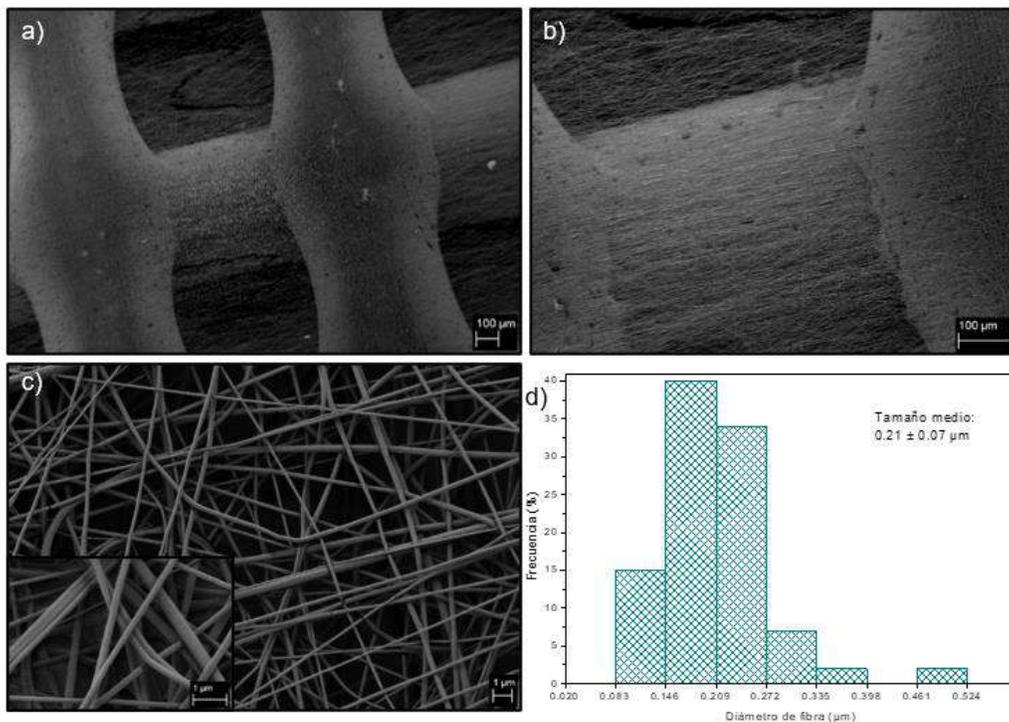


Figura 5-9: Micrografías SEM de una matriz de PCL3D con 10 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 250x, c) 10.000x y d) distribución de diámetro de fibra.

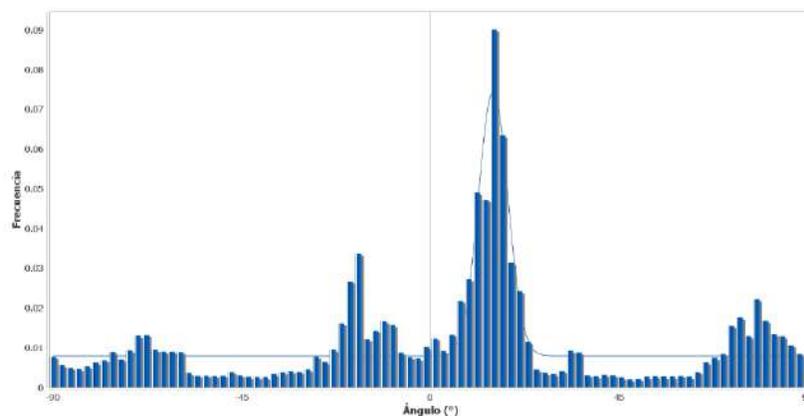


Figura 5-10: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL 3D con 10 minutos de electrohilado de PCL/gelatina.

A su vez, en las micrografías SEM para 10 y 30 minutos de electrohilado se puede observar que hay fusión de fibras. Esto pudo deberse a que el solvente no logró evaporarse por completo antes de llegar al colector. Estos defectos podrían presentarse para mayores tiempos de electrohilado debido a la mayor densidad de fibras y a las mayores probabilidades de contacto fibra-fibra, y por esa razón no ocurriría para tiempos cortos.

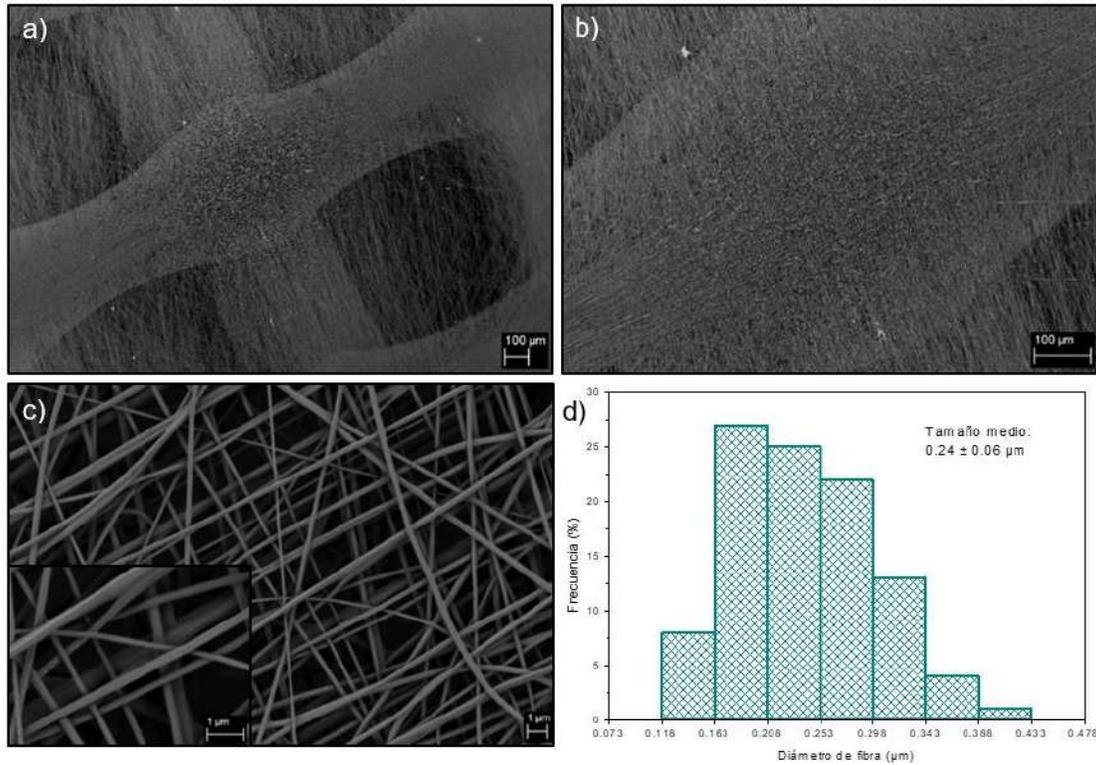


Figura 5-11: Micrografías SEM de una matriz de PCL con 30 minutos de electrohilado de PCL/gelatina de magnificación: a) 100x, b) 250x, c) 10.000x y d) distribución de diámetro de fibra.

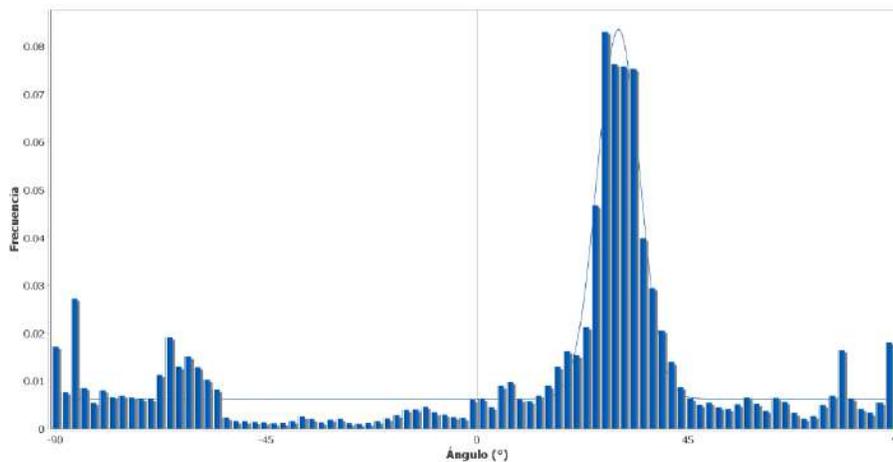


Figura 5-12: Histograma ilustrando la direccionalidad de las fibras de una matriz de PCL 3D con 30 minutos de electrohilado de PCL/gelatina.

### 5.3 Caracterización química

Para analizar la composición química de las matrices y confirmar la presencia de la gelatina en las matrices de PCL/gel, se analizaron los espectros ATR-FTIR de las distintas muestras obtenidas, los cuales se muestran en la Figura 5-13. Todos los espectros evidenciaron las principales bandas asociadas a PCL: a  $2949\text{ cm}^{-1}$  y  $2870\text{ cm}^{-1}$  las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces  $\text{CH}_2$ , respectivamente; a  $1724\text{ cm}^{-1}$  la banda correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo del éster ( $\text{C}=\text{O}$ ); a  $1296\text{ cm}^{-1}$  la banda correspondiente al estiramiento de los enlaces  $\text{C}-\text{O}$  y  $\text{C}-\text{C}$ ; y a  $1236\text{ cm}^{-1}$  y  $1168\text{ cm}^{-1}$  las bandas atribuidas al estiramiento asimétrico y simétrico del enlace  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  [34].

Las bandas asociadas a las proteínas en las muestras de PCL/gel aparecieron alrededor de:  $3305\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace  $\text{N}-\text{H}$ ;  $1647\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$  de la amida I; y  $1540\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión del enlace  $\text{N}-\text{H}$  de la amida II [47], [48]. Estas bandas características de la gelatina se presentaron en todas las matrices de PCL/gel, confirmando la correcta incorporación a las nanofibras. Sin embargo, recién a los 10 y 30 minutos de electrohilado pueden observarse más claramente las tres bandas anteriormente mencionadas. Para 3 y 5 minutos de electrohilado las bandas mostraron una absorbancia muy baja, indicando que la cantidad de gelatina agregada era más baja debido al menor tiempo de recubrimiento. De hecho, la banda correspondiente al estiramiento del enlace  $\text{N}-\text{H}$  a  $3305\text{ cm}^{-1}$  no se observó a estos tiempos de electrohilado.

Por otro lado, en las matrices de PCL/gel no se mostraron cambios ni en la intensidad de las bandas atribuidas al PCL ni en los números de onda a los cuales se presentaron en la matriz base, indicando que no se producen interacciones entre la gelatina y la PCL.

Así mismo, es importante destacar que no se detectaron las bandas típicas de absorción del ácido acético, lo que confirma que el solvente se evaporó completamente durante el proceso de electrohilado. La no presencia de trazas de solvente en las fibras es importante en caso de que el ácido acético pueda producir una reducción en la citocompatibilidad de las matrices, ya que, si bien está clasificado como un solvente benigno, esto quiere decir que es de baja toxicidad.

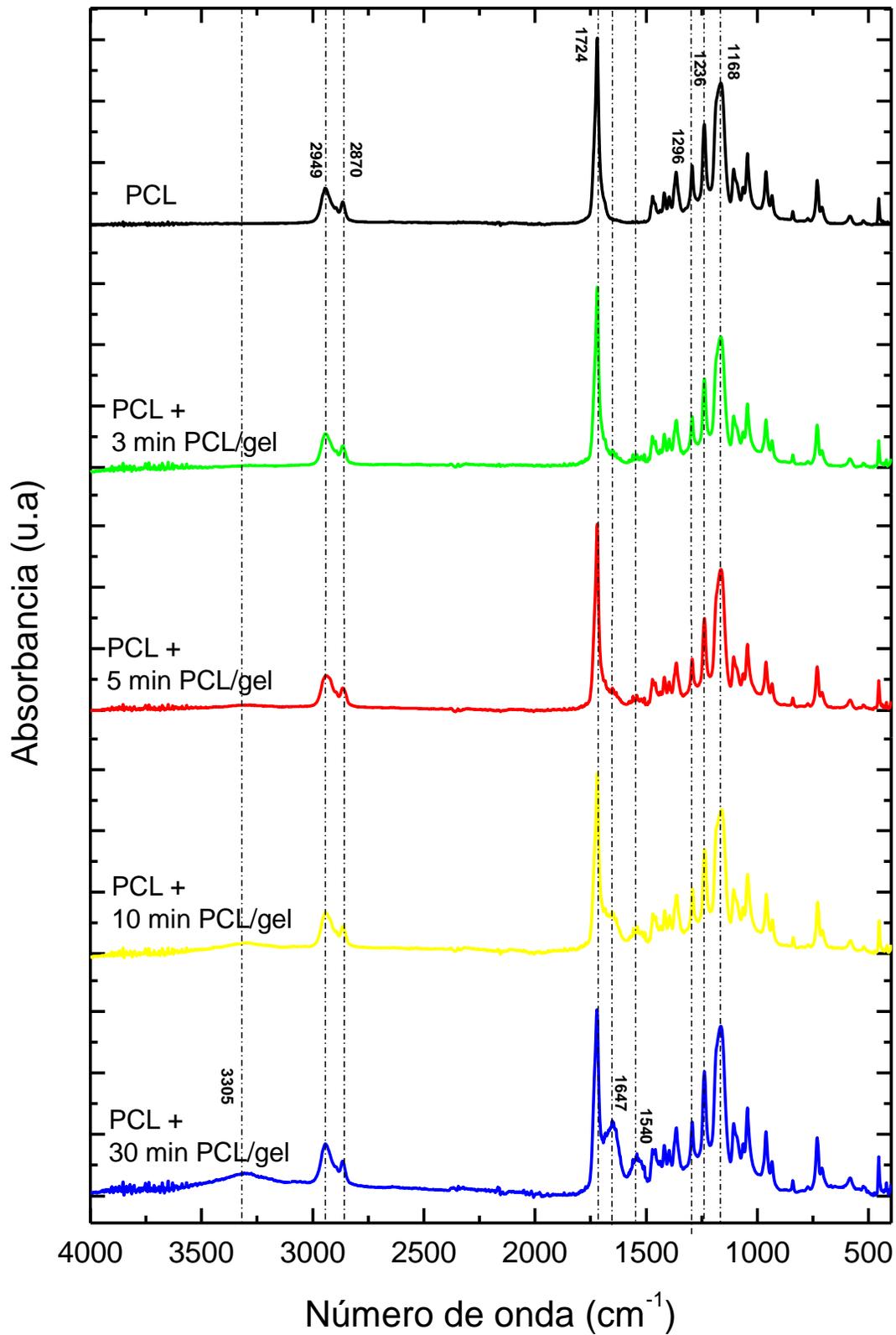


Figura 5-13: Espectro ATR-FTIR de las matrices impresas de PCL sin recubrimiento y con 3, 5, 10 y 30 minutos de electrohilado.

## 5.4 Caracterización superficial

La hidrofiliidad de un material es una propiedad que influye directamente en las interacciones célula-biomaterial que tienen lugar en la superficie de un sustrato, afectando la adhesión, propagación, proliferación y migración celular [49]. El ensayo de ángulo de contacto se utiliza comúnmente como medida de la hidrofiliidad. De acuerdo con la literatura, superficies muy hidrofóbicas o muy hidrofílicas no son favorables para la adhesión celular, encontrándose el ángulo de contacto óptimo en el rango de 40-70° [50], y aquellos materiales con ángulo de contacto superior a 90° son considerados hidrófobos [51].

Los valores medios de los ángulos de contacto obtenidos para una matriz de PCL se muestran en la Figura 5-14a. La estructura de micro fibras de las matrices impresas de PCL afectó la medición debido a que el *software* mide los ángulos que la gota forma con la matriz a partir de las imágenes que se capturan durante la medición, y estos ángulos dependían del lugar donde la gota se depositaba y posicionaba. De esta forma, se obtuvieron dos valores de ángulo de contacto significativamente diferentes. Cuando la gota se posicionaba abarcando tres filamentos de la capa superior (modo A) se obtuvo un valor de  $79 \pm 9$ , y cuando la gota se posicionaba abarcando dos filamentos de la capa superior (modo B) fue de  $109 \pm 12$ . La gota demoraba unos segundos en llegar a la posición de equilibrio, por lo que esto debió tenerse en cuenta para no iniciar una medición temprana (ver Figura 5-14c).

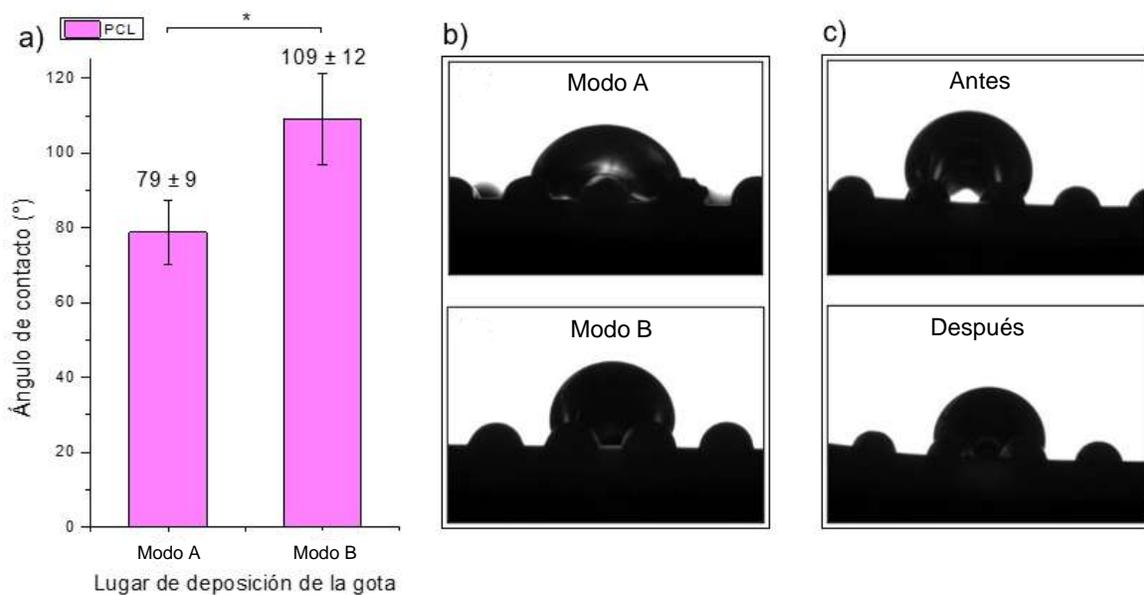


Figura 5-14: a) Ángulo de contacto de las matrices impresas de PCL en función del lugar de deposición de la gota, b) imágenes representativas de las distintas formas en las que se acomodaba la gota en la matriz, y c) proceso de acomodamiento de la gota en la matriz.

Se ha reportado en literatura que el ángulo de contacto del PCL puro con el agua es de aproximadamente  $120^\circ$  [51]. Esta propiedad hidrofóbica del PCL se debe a la presencia de un gran número de grupos no polares  $-CH_2$  y a un bajo número de grupos éster polares. Sin embargo, en el caso de las matrices impresas de PCL, los valores de ángulo de contacto obtenidos fueron menores. Dependiendo de la forma de deposición de la gota, los ángulos fueron tanto de carácter hidrofílico como hidrofóbico. En consecuencia, la matriz de PCL presentó un carácter de hidrofiliicidad anisotrópico debido a la forma irregular de la superficie. Estos valores se acercaron a los obtenidos por Dong, Li, Wang y colaboradores [52], [53], [54] en matrices impresas similares.

El ángulo de contacto de las matrices de PCL/gel no se pudo medir debido a que las gotas depositadas fueron absorbidas gradualmente hasta volverse indetectables sin alcanzar un valor de equilibrio. La variación temporal de dos de las mediciones realizadas en este tipo de matrices se muestra en la Figura 5-15. Este comportamiento puede atribuirse al recubrimiento de las nanofibras electrohiladas de PCL/gel, ya que la gelatina posee grupos terminales amino y carboxilo en su estructura que le proporcionan una mayor hidrofiliicidad. También podría atribuirse al hecho de que, debido a la relativamente baja densidad de fibras, la matriz resultó permeable. En literatura, sistemas de nanofibras de PCL/gel similares presentaron ángulos de contacto estables en el rango de  $32^\circ$ - $62^\circ$  [36], [42], [47], [48], [55]. Sin embargo, la densidad de nanofibras era mayor.

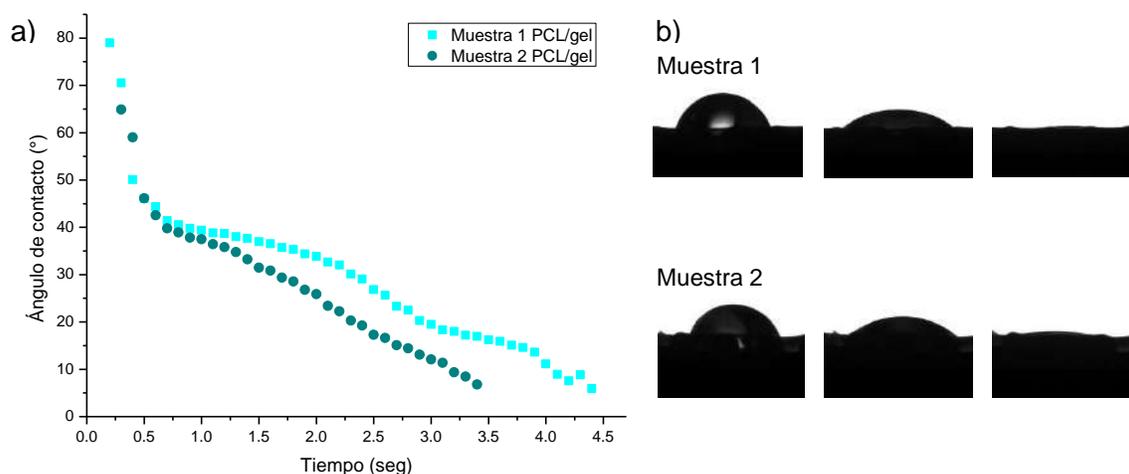


Figura 5-15: a) Evolución temporal de la medición del ángulo de contacto de dos matrices de PCL/gel y b) imágenes de la gota de agua destilada al comienzo, mitad y final de la medición (de izquierda a derecha).

## 5.5 Hinchamiento y degradación

Un biomaterial adecuado para su uso en ingeniería de tejidos debería tener una cinética de degradación conocida y que acompañe la velocidad de reparación del tejido, y formar subproductos de degradación no tóxicos. En este sentido, la degradación *in vitro* se determinó midiendo la pérdida de masa en función del tiempo de las matrices de PCL y PCL/gel al sumergirlas en PBS (pH 7.4) a 37°C por 1, 3, 7, 14 y 21 días. Asimismo, se evaluó el grado de hinchamiento a los distintos tiempos de inmersión. Los resultados se presentan en la Figura 5-16.

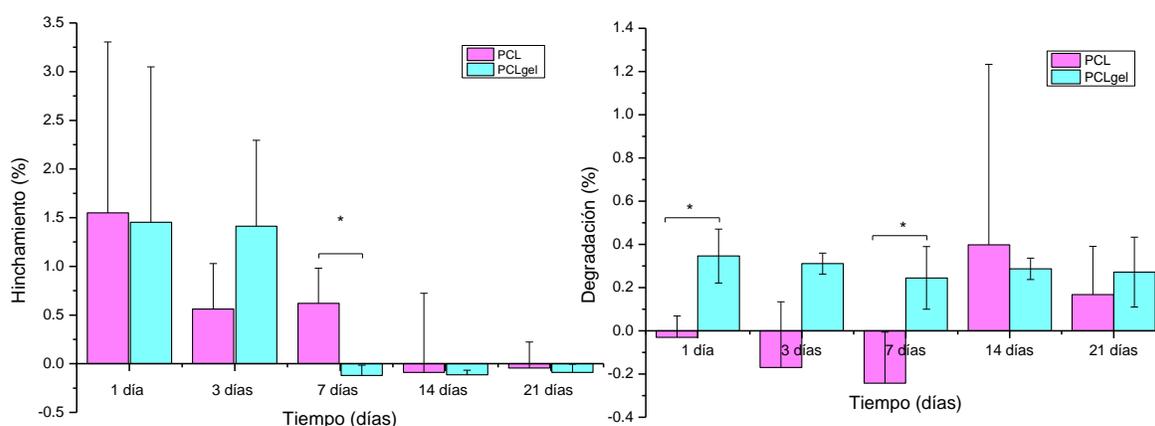


Figura 5-16: Hinchamiento (izq.) y degradación (dcha.) de las matrices de PCL y PCL/gel en función del tiempo de inmersión en PBS a 37°C.

Se puede observar que al cabo de 1 día de inmersión el hinchamiento fue bajo y similar para ambos tipos de matrices (alrededor del 1.5%), y luego de este periodo comenzó a decrecer. Esto era de esperarse debido al carácter hidrofóbico del PCL y al marcado carácter hidrofílico que mostró la gelatina en los ensayos de ángulo de contacto debido a la presencia de grupos amino y carboxilo. A su vez, el decrecimiento luego de 1 día indicó que la degradación de las matrices prevaleció frente al hinchamiento. Estos resultados también se corresponden con los espectros ATR-FTIR de las matrices para los distintos tiempos de inmersión, presentes en la Figura 5-17. En todos los casos se evidenciaron las principales bandas asociadas al PCL. Para las matrices de PCL se observaron a 2947  $\text{cm}^{-1}$  y 2865  $\text{cm}^{-1}$  las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces  $\text{CH}_2$ , respectivamente; a 1720  $\text{cm}^{-1}$  la banda correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo del éster ( $\text{C}=\text{O}$ ); a 1292  $\text{cm}^{-1}$  la banda correspondiente al estiramiento de los enlaces C-O y C-C ; y a 1242  $\text{cm}^{-1}$  y 1170  $\text{cm}^{-1}$  las bandas atribuidas al estiramiento asimétrico y simétrico del enlace C-O-C; mientras que para las matrices de PCL/gel estas bandas se

observaron a  $2943\text{ cm}^{-1}$ ,  $2860\text{ cm}^{-1}$ ,  $1723\text{ cm}^{-1}$ ,  $1294\text{ cm}^{-1}$ ,  $1238\text{ cm}^{-1}$  y  $1164\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Se puede observar que la absorbancia de estas bandas no disminuyó al incrementarse el tiempo de inmersión, lo que denota la lenta degradación del PCL y se corresponde con el perfil de degradación obtenido. Sin embargo, incluso luego de 1 día de inmersión, las bandas de la gelatina no se presentaron, indicando la completa degradación del material atribuible a su carácter hidrofílico. Esto podría explicar porque el hinchamiento a este mismo periodo no es mayor en las matrices de PCL/gel y la posterior disminución del hinchamiento.

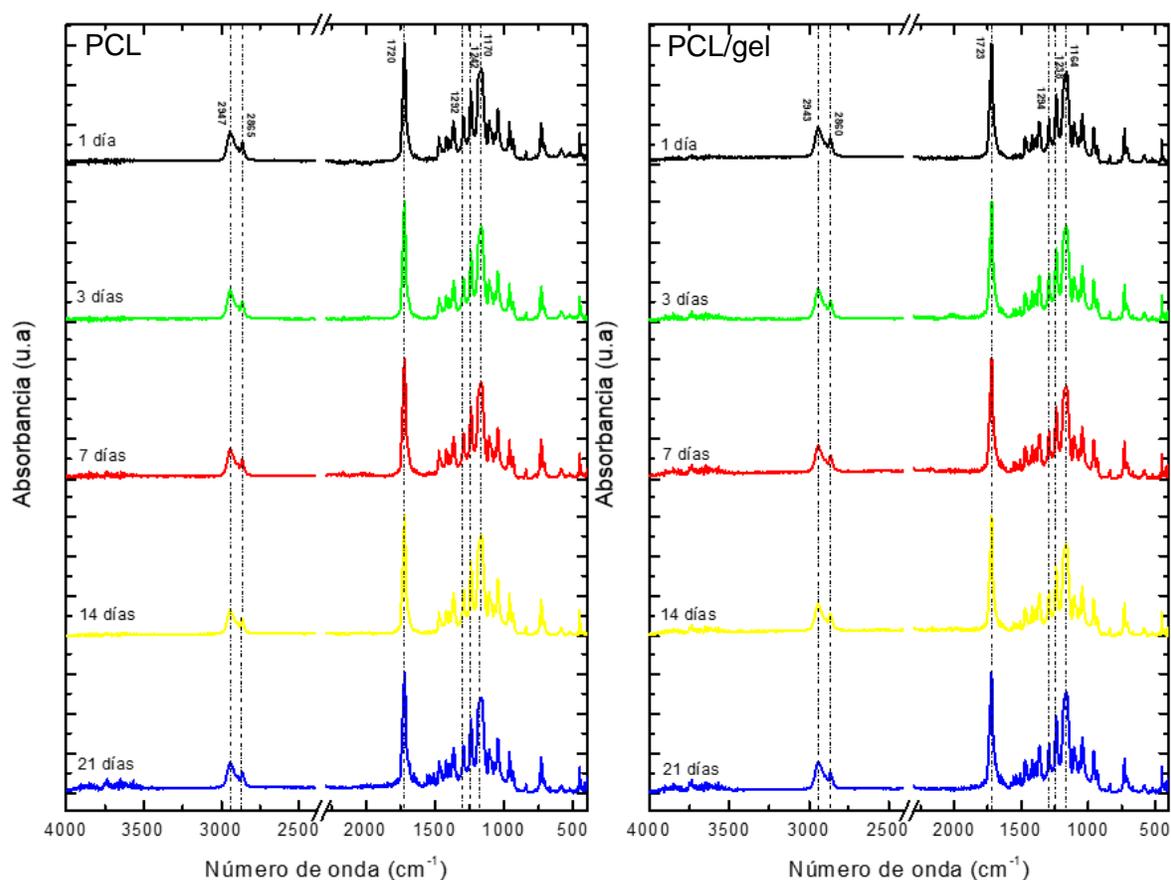


Figura 5-17: Espectro ATR-FTIR de las matrices de PCL (izq.) y PCL/gel (dcha.) luego de 1, 3, 7, 14 y 21 días de inmersión en PBS a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La degradación de los polímeros conduce a escisiones de las cadenas poliméricas y depende de factores como la cristalinidad, hidrofiliidad, peso molecular, estructura morfológica, pH y la temperatura [56]. En general, a mayor hidrofiliidad, mayor es la velocidad de degradación. De acuerdo con la literatura, la PCL posee una lenta degradación hidrolítica, mientras que la gelatina posee una degradación rápida, lo que muestra

concordancia con los resultados obtenidos. La PCL es estable en el cuerpo durante más de 6 meses y se degrada por completo y de forma no tóxica en alrededor de 3 años, haciéndolo útil principalmente para ingeniería de tejidos duros e implantes a largo plazo [16]. Por lo tanto, se puede decir que la PCL es un polímero biorreabsorbible, dado que se reabsorbe *in vivo* mediante la eliminación de los productos por rutas metabólicas sin producir efectos laterales residuales [2].

Así mismo, se monitoreó el cambio en el pH del PBS con el tiempo (Figura 5-18). Se puede observar que, en general, este disminuyó con los días de inmersión. Esto se debe a que en la reacción de hidrólisis de poliésteres biodegradables se generan productos ácidos de degradación (al producirse la escisión del enlace éster se produce un grupo carboxilo), que actúan como catálisis de la siguiente reacción de hidrólisis [57], [58]. Por lo tanto, el pH del sistema se vuelve ácido a medida que avanza la reacción debido a la acumulación de estos productos.

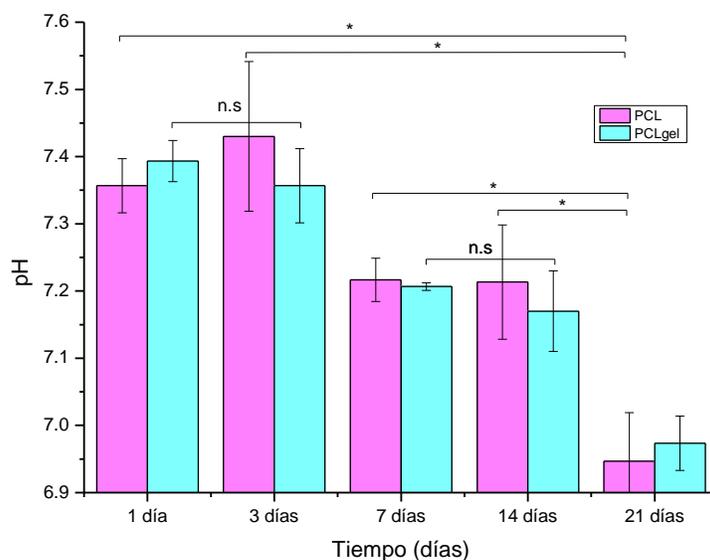


Figura 5-18: pH en función del tiempo de inmersión en PBS a 37°C. Para mayor simplificación, en el caso de las matrices de PCL solo se indicaron las diferencias significativas, mientras que para las matrices de PCL/gel solo se indicaron las diferencias no significativas. Además, no hubo una diferencia significativa entre las matrices de PCL y PCL/gel para ninguno de los días.

## 5.6 Viabilidad celular

Se utilizó la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) para evaluar la viabilidad, adhesión y proliferación celular de las matrices de PCL y PCL/gel. Los resultados del kit CCK-8 luego de 1, 3 y 7 días de incubación se muestran en la Figura 5-19.

Por un lado, estos resultados indican que la viabilidad celular de las estructuras de PCL en el tercer y séptimo día de cultivo aumentó con respecto al primer día, pero entre los periodos de 3 y 7 días no hay una diferencia significativa en el incremento. Lo mismo se cumple para a las estructuras de PCL/gel. Por otro lado, si bien se puede observar una mejoría en la viabilidad celular de las matrices de PCL/gel respecto de las matrices de PCL para todos los tiempos de incubación, para 1 y 3 días esta diferencia no fue significativa. Se puede concluir que luego de 7 días de cultivo la viabilidad celular de las matrices de PCL/gel fue superior a aquella de las matrices de PCL, e incluso superó el valor del control. Por consiguiente, se evidenció una mejoría en la adhesión y proliferación celular de las estructuras que combinan ambos métodos de procesamiento con respecto a aquellas obtenidos por impresión 3D. Esto demuestra que todas las matrices que se fabricaron son citocompatibles, siendo las matrices de PCL/gel menos citotóxicas que las de PCL.

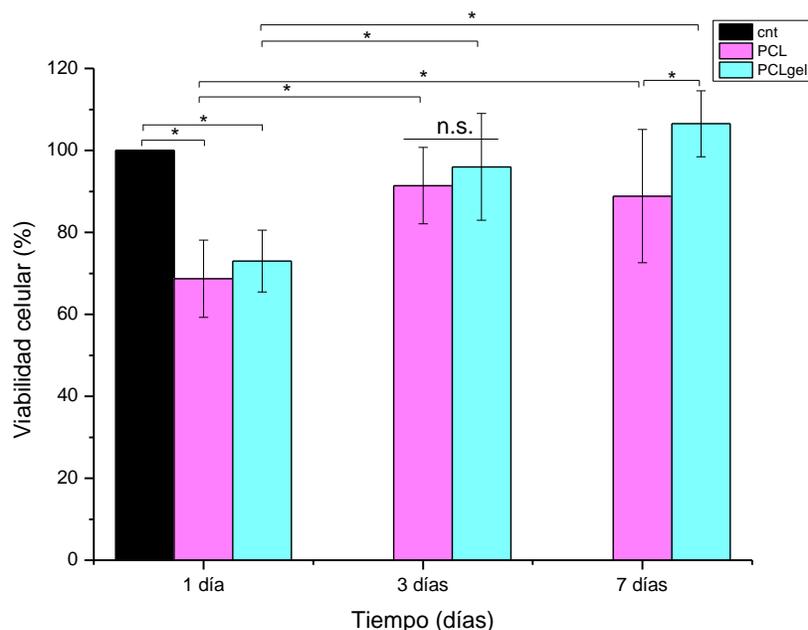


Figura 5-19: Porcentaje de viabilidad celular de células NHDF en matrices de PCL y PCL/gel luego de 1, 3 y 7 días de incubación (número de muestras = 6; \* p < 0.05).

Este efecto pudo deberse a la mayor relación de área superficial/volumen disponible para que las células se adhieran y crezcan, brindada por las nanofibras cuya topografía imita la MEC. A su vez, la presencia de la gelatina en las nanofibras también puede influenciar la adhesión y proliferación celular. Teniendo esto en cuenta, se esperaría que la adhesión inicial y proliferación fueran significativamente mejor luego de 1 día de cultivo. Sin embargo, la rápida degradación de la gelatina incluso luego de 1 día mostrada anteriormente podría explicar porque la viabilidad celular no fue significativamente superior para las matrices de

PCL/gel. Al perderse la gelatina se pierden los sitios de reconocimiento celular y el carácter hidrofílico, lo que indicaría que el efecto en la proliferación es probablemente debido al PCL.

## **5.7 Tinción de citoplasma y núcleo**

La adhesión y proliferación de las células se observaron mediante la tinción del citoplasma y del núcleo con Calceína y DAPI, respectivamente. Las imágenes obtenidas a través del microscopio fluorescente se muestran en la Figura 5-20 y Figura 5-21. Se puede observar que para un tiempo de cultivo de 1 día, las células adheridas, en general, se encuentran bien distribuidas a lo largo de los filamentos obtenidos por impresión 3D, tanto en las matrices de PCL como en las de PCL/gel. La cantidad de células presentes es baja, no llegándose a desarrollar una monocapa de células ni grupos aglomerados de estas, sino una adhesión individual de células. Incluso en algunos casos parecerían seguir un cierto alineamiento que podría ser debido a que los microporos inherentes del material, observados en las micrografías SEM de una matriz de PCL (sección 5.2), ayudaron a la adhesión celular. Esto demuestra que las células no se adhieren bien en superficies lisas como lo son la de los filamentos obtenidos por impresión 3D, pero que responden a surcos, crestas, escalones y otros defectos topográficos.

Se hubiera esperado, además, cierta adhesión celular a lo largo de los macroporos entre los filamentos de las estructuras 3D de PCL/gel al encontrarse cubiertos por nanofibras electrohiladas y a la presencia de la gelatina. Por el contrario, esto no ocurrió. La baja cantidad de células adheridas pudo haber sido influenciada por el bajo número inicial de células sembradas durante el cultivo celular, la rápida degradación de la gelatina y su alta hidrofiliidad. Este hecho se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos mediante el ensayo CCK-8 para el primer día de cultivo, donde no se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular para ambos tipos de matrices, y confirma que para 1 día de incubación no se generó una mejor adhesión y proliferación celular de las estructuras que combinan ambos métodos de procesamiento con respecto a aquellas obtenidos por impresión 3D.

Luego de 7 días de cultivo las matrices de PCL presentaron una gran cantidad de células NHDF que se adhirieron y proliferaron a lo largo de toda la superficie de los filamentos, formando una monocapa interconectada que la cubrió por completo. Sin embargo, las matrices de PCL/gel no presentaron una gran diferencia con las imágenes obtenidas para 1 día de cultivo. Las células no parecieron adherirse y proliferar para formar una monocapa,

sino que se presentaron pocas células individuales y esparcidas. Además, la disposición de las fibras en las matrices dio como resultado una fuerte dispersión de la luz que interfirió con las imágenes microscópicas. Estos resultados no se encuentran en concordancia con aquellos obtenidos para la viabilidad celular al séptimo día de cultivo, donde se mostró una mejoría significativa para las matrices combinadas de PCL/gel con respecto a las matrices obtenidas por FDM.

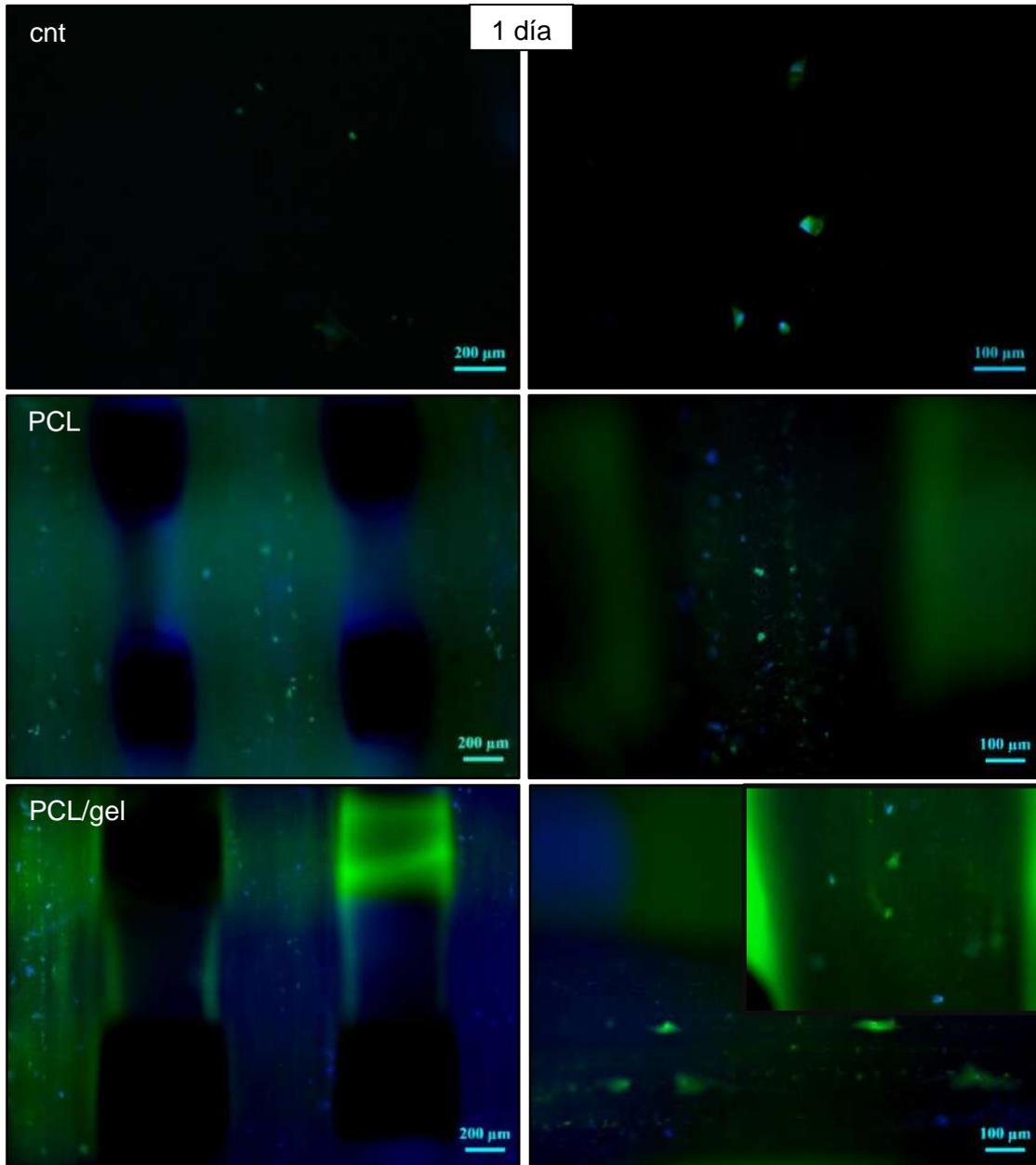


Figura 5-20: Imágenes de fluorescencia de células NHDF en matrices de PCL y PCL/gel luego de 1 día de incubación.

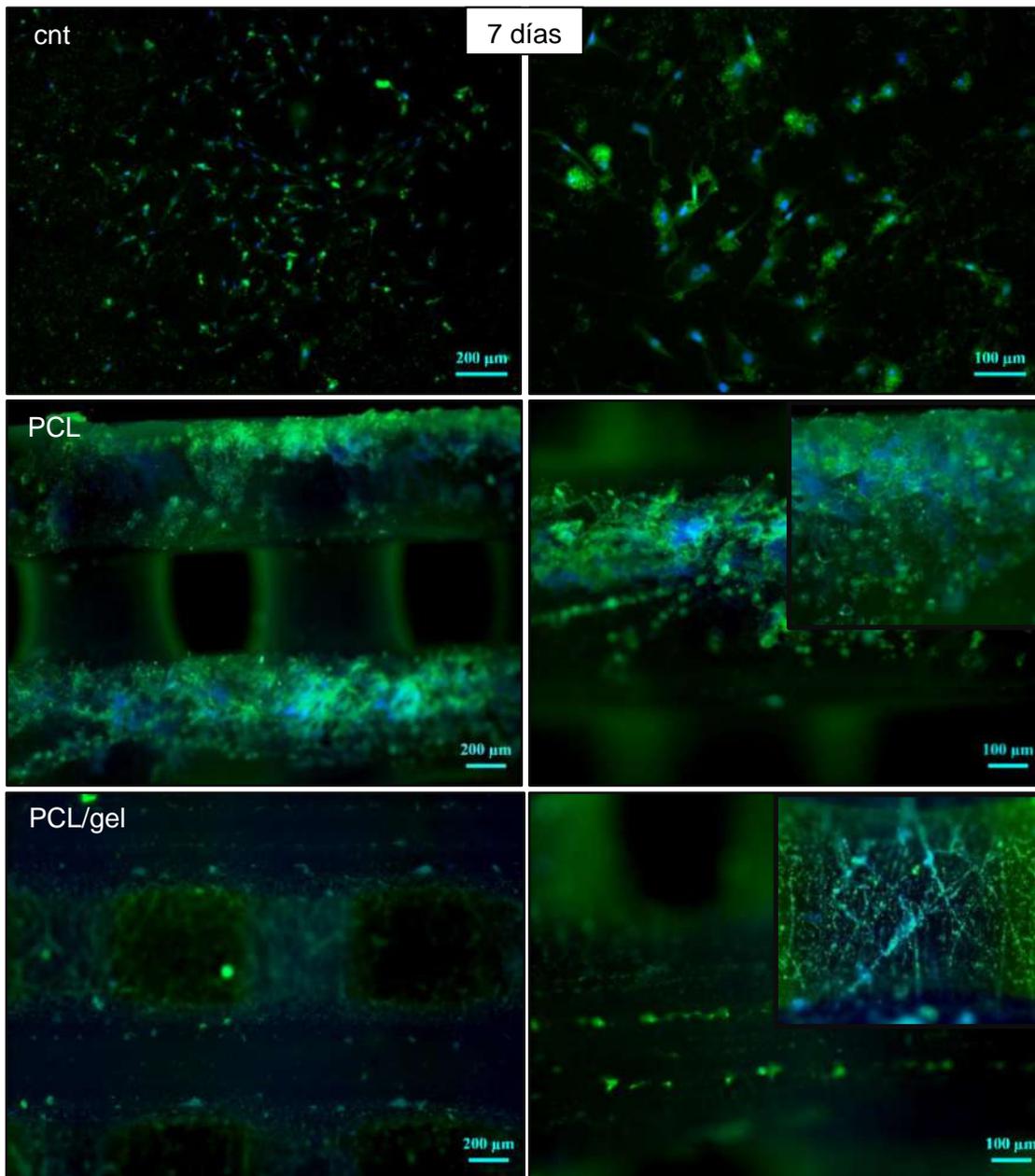


Figura 5-21: Imágenes de fluorescencia de células NHDF en matrices de PCL y PCL/gel luego de 7 días de incubación.

La estructura característica de los fibroblastos es alargada en forma de huso (*spindle-shaped*) [59] y se puede ver claramente en las imágenes de fluorescencia del control para 7 días de cultivo. En el caso de las matrices de PCL y PCL/gel no se pudo distinguir si las células NHDF mantuvieron esta morfología y la integridad del núcleo luego de la siembra para ambos tiempos de incubación.

Con respecto a la orientación preferencial de las nanofibras, se ha reportado que esta mejora la adhesión, proliferación y la viabilidad celular, e incluso proporciona un estímulo externo para la disposición ordenada de las células. El incremento en la viabilidad celular de las matrices de PCL/gel en el séptimo día de cultivo pudo haber estado relacionado con este hecho. No obstante, las imágenes fluorescentes no muestran una mejor adhesión, proliferación y disposición ordenada de las células.

En general, los resultados indican que las matrices soportan la proliferación de las células NHDF y sus efectos no citotóxicos las hacen aptas para su utilización en aplicaciones para ingeniería de tejidos.

## 6 Balance económico

Con el objetivo de analizar la inversión inicial requerida para adquirir el equipamiento necesario para fabricar las estructuras propuestas en este proyecto, se consultaron a algunas de las principales compañías los precios de impresoras 3D que incluyeran la tecnología FDM, de equipos de electrohilado y de equipos integrados. Los precios de los equipos no incluyen gastos de importación ni los impuestos locales para su exportación a Argentina, y para el caso de la bioimpresora Cellink Bio X (utilizada en este trabajo) tampoco se incluyen los gastos de envío.

### 6.1 Equipamiento para impresión 3D

En la Tabla 6-1 y Tabla 6-2 se detallan los costos para dos bioimpresoras, la Allevi 3 y la Bio X, y se incluye una descripción de los equipos. Con ambas impresoras sería posible reproducir las estructuras FDM de PCL fabricadas en este proyecto.

#### 1. Allevi 3 de 3D Systems (Estados Unidos)

Tabla 6-1: Presupuesto para la bioimpresora 3D Allevi 3 de 3D Systems.

Producto	Tipo de ítem	Cantidad	Precio (USD)
Bioimpresora Allevi 3, incluye: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lugar para 3 cabezales de impresión.</li> <li>• Tres cabezales de extrusión CORE™ (tecnología FDM) con control de temperatura desde 4°C hasta 160°C.</li> </ul>	Hardware	1	40,000.00

<ul style="list-style-type: none"> <li>• LEDs de fotocurado con luz visible y ultravioleta en los rangos de 365 nm y 405 nm.</li> <li>• Cama de impresión con control de temperatura desde temperatura ambiente hasta 60°C.</li> <li>• Precisión X,Y,Z: 1 µm.</li> </ul>			
Compresor de aire (rangos de presión de 1 - 120 PSI o 6 - 800 kPa).	Hardware	1	250.00
Jeringa metálica de 5 mL.	Hardware	1	150.00
Boquilla metálica	Hardware	1	200.00
Kit de inicio Allevi	Wetware	1	350.00
Solución de software basada en la nube - 1 mes - Cloud	Software	1	125.00
1 año de garantía + soporte y mantenimiento	Garantía	1	4,000.00
Transporte	Envío y manipulación	1	500.00
		<b>Total</b>	<b>45,575.00</b>

## 2. BIO X generación 3 de Cellink (Suecia)

Tabla 6-2: Presupuesto para la bioimpresora 3D BIO X generación 3 de Cellink.

Producto	Cantidad	Precio (USD)	Precio total (USD)
Bio X Gen 3, incluye: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lugar para 3 cabezales de impresión.</li> <li>• 3 cabezales de impresión neumáticos intercambiables y de temperatura hasta 65°C.</li> <li>• Cabezal de impresión termoplástico (hasta 250°C).</li> <li>• Cabezal de impresión con control de temperatura (4°C).</li> <li>• 4 módulos de fotocurado intercambiables de 365, 405, 485 y 520 nm para entrecruzamiento.</li> <li>• Tecnología de cámara limpia: filtro HEPA + esterilización UV + recinto.</li> <li>• Calentamiento/refrigeración de la cama de impresión (4 - 65°C).</li> <li>• Rango de presión de bomba interna: 0 – 200kPa</li> <li>• Rango de presión suministro de aire externo: 0 – 700kPa</li> <li>• Resolución de movimiento X,Y,Z: 1 µm.</li> <li>• 12 meses de garantía.</li> </ul>	1	49,000.00	49,000.00

Licencia de actualización de DNA Studio 4.	1	5,000.00	5,000.00
Paquete de inicio de biotinta.	1	2,500.00	2,500.00
Paquete de investigación de introducción a la bioimpresión (opcional).	1	10,000.00	
Paquete de atención al cliente año 1, todas las impresoras (opcional).	1	5,900.00	
Paquete de atención al cliente, BIO X, año 2 (opcional).	1	6,900.00	
Instalación remota y formación INK/BIO X/BIO X6.	1	950.00	950.00
	<b>Total</b>	<b>80,250.00</b>	<b>57,450.00</b>

## 6.2 Equipamiento para electrohilado

En la Tabla 6-3 y Tabla 6-4 se detallan los costos para dos máquinas de electrohilado, la Spinbox 1 y la NE200, y se incluye una descripción de los equipos. Con ambos sistemas sería posible reproducir las nanofibras de PCL/gelatina fabricadas en este proyecto.

### 1. Sistema Spinbox 1 de Bioinicia (España)

Tabla 6-3: Presupuesto para el equipo de electrohilado Sistema Spinbox 1 de Bioinicia.

Producto	Cantidad	Precio (€)
Sistema Spinbox 1 incluye: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cabina de electrohilado Spinbox.</li> <li>• Fuente de alta tensión positiva integrada: 0 - 30 kV.</li> <li>• Cabezal de hilado monofásico.</li> <li>• Colector de placa plana: 200mm x 200mm.</li> <li>• La distancia entre la boquilla y el colector es de 50 a 240mm para electrohilado horizontal y de 50 a 162 mm para electrohilado vertical.</li> <li>• Sistema de alimentación por jeringa.</li> </ul>	1	20,090.00
Sistema de colector rotativo incluye: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plataforma colectora giratoria: velocidad de rotación de 250 a 2000 rpm.</li> <li>• Colector de tambor: 100 mm (D) x 200 mm (L).</li> <li>• Escaneo de movimiento del emisor.</li> </ul>	1	
Costo de envío + seguro a todo riesgo	1	1,450.00
	<b>Total</b>	<b>21,540.00</b>
	<b>Total (USD)</b>	<b>21,423.68</b>

## 2. NE200 de Inovenso (Turquía)

Tabla 6-4: Presupuesto para el equipo de electrohilado NE200 de Inovenso.

Producto	Cantidad	Precio (USD)
NE200 - Máquina de electrohilado de una sola boquilla - Contiene: ✓ Área de hilado: • Cámara sellada con pintura electrostática (puerta de seguridad). • Hilado de abajo hacia arriba. • La distancia entre la boquilla y el colector se puede ajustar automáticamente de 33,5 a 232,5 mm. • Bomba de jeringa totalmente programable. ✓ Área de recolección: • Tambor giratorio: 100 mm (D) x 150 mm (L), velocidad de rotación: 100 - 500 rpm (conexión a tierra). • Colector plano 370 mm x 130 mm (conexión a tierra). ✓ Fuente de alimentación de alta tensión: 0 - 40 kV. ✓ Control: Panel de pantalla táctil para ajustar los parámetros del proceso (distancia de giro, caudal, voltaje, etc.). ✓ Disponible dentro del Programa Scale-up de Inovenso. ✓ Cubierto por garantía de un año.	1	37,300.00
Boquilla gas de protección (opcional).	1	5,200.00
Instalación y capacitación en el sitio	1	3,300.00
Gastos de envío	1	2,250.00
<b>Total</b>		<b>48,050.00</b>

### 6.3 Equipamiento integrado

En la Tabla 6-5 se detallan los costos para un equipo (Axo A3) que integra impresión 3D FDM y electrohilado de solución y se incluye una descripción del mismo. La obtención de las estructuras FDM de PCL mediante la Axo A3 sería factible, mientras que la diferencia de potencial máxima que presenta el cabezal de electrohilado es de 10 kV. Este factor podría dificultar la obtención de las nanofibras de PCL/gel, por lo que con este equipamiento deberían ajustarse nuevamente los parámetros de procesamiento de electrohilado. Sin embargo, utilizando equipos separados se necesitaría una inversión inicial mínima de aproximadamente 67,000.00 USD, pero que podría elevarse hasta los 105,500.00 USD aproximadamente. En cambio, utilizando el equipamiento integrado la inversión inicial

necesaria es de aproximadamente 40,000.00 USD. Por lo tanto, la adquisición de equipos integrados para producir matrices bimodales a partir de impresión 3D y electrohilado para la ingeniería de tejidos es significativamente más económica y rentable que la adquisición de equipos separados.

1. Axo A3 por Axolotl Biosystems (Turquía)

Tabla 6-5: Presupuesto para el equipo integrado de bioimpresión 3D y electrohilado Axo A3 de Axolotl Biosystems.

<b>Producto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
AL-ABS-A3: Equipado con capacidad de modo de impresión triple y cabezales de impresión y herramientas intercambiables. Contiene: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cabezal de impresión de baja temperatura (de 8 a 60°C).</li> <li>• Cabezal de impresión de alta temperatura (hasta 250°C).</li> <li>• Cabezal de impresión de electrospinning de solución (rango: hasta 10 kV).</li> <li>• 2 cabezales de herramienta de curado UV.</li> <li>• Cama de impresión con control de temperatura (8 a 60°C).</li> <li>• Resolución X,Y,Z: 1,25 µm.</li> <li>• Rango de presión de aire: 0-120 PSI (0-800 kPa).</li> </ul>	1	24,083.49	24,083.49
AL-ABS-IU-001 (opcional) - actualización de MEW - Contiene: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cabezal de impresión MEW.</li> <li>• Fuente de alimentación de alto voltaje.</li> <li>• Colector de placa plana.</li> <li>• Cabezal de herramientas de cámara HD.</li> </ul>	1	6,020.87	
AL-ABS-IU-002 (opcional) - actualización del colector rotatorio - Incluye: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colector rotatorio.</li> <li>• Set de mandriles.</li> </ul>	1	1,805.23	1,805.23
AL-ABS-IU-003 (opcional) - actualización de impresión Core/Shell - Incluye: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cabezal de impresión de bomba de jeringa accionada mecánicamente.</li> </ul>	1	1,805.23	

• Boquilla coaxial.			
Costos de instalación y sesión de capacitación inicial en el sitio del cliente	1	4,912.60	4,912.60
Gastos de embalaje, transporte gratuito lugar de uso y seguro	1	1,685.00	1,685.00
Total		40,312.42	32,486.32
Total + impuestos (19%)		47,971.78	38,658.72
Total + impuestos (19%) en USD		47,712.73	38,449.96

## 7 Conclusiones

En este trabajo se logró la fabricación exitosa de estructuras bimodales mediante la combinación de dos técnicas de procesamiento individuales, de manera de aprovechar las ventajas y superar las desventajas que cada una de ellas ofrece. Se lograron optimizar los parámetros de impresión FDM para obtener andamios impresos de PCL. Los filamentos demostraron poseer porosidad inherente y las fibras electrohiladas de PCL/gelatina del recubrimiento demostraron la incorporación satisfactoria de la gelatina y una topografía a escala nanométrica. Asimismo, los espectros FTIR permitieron corroborar la evaporación completa del ácido acético durante el tiempo de vuelvo, probando ser un solvente benigno adecuado para aplicaciones biomédicas y evitando problemas de toxicidad.

A su vez, se demostró que las matrices de PCL/gel presentaron un fuerte carácter hidrofílico producto de los grupos terminales amino y carboxilo que aporta la gelatina. Por lo tanto, a pesar de poseer segmentos RGD para la adhesión celular inicial, luego de 1 día de inmersión en PBS la gelatina se degradó completamente. Esto se vio reflejado en los ensayos de cultivo celular. Solo se obtuvo una mejoría significativa de la viabilidad celular respecto de la matriz base de PCL luego de 7 días de cultivo. Esto indica que el incremento en la proliferación celular se debió a las características estructurales a escala micro y nanométrica de los andamios, ya que las fibras proporcionan mayor superficie para la adhesión celular e imitan la MEC. Sin embargo, la tinción del núcleo y citoplasma de las células no mostró concordancia con respecto a la viabilidad celular ya que no se observó una mayor proliferación celular para ese tiempo. Este resultado pudo haber sido influenciado por el bajo número inicial de células sembradas durante el cultivo celular.

En general, las matrices de PCL/gel demostraron poseer propiedades de interés para la aplicación en ingeniería de tejidos duros y presentar un cierto incremento en la citocompatibilidad en comparación con las matrices de PCL.

## 8 Trabajo futuro

Si bien se logró todo lo propuesto en el plan de estudio, a continuación se presentan algunas actividades que podrían completar y expandir el proyecto:

- Optimizar la proporción de PCL/gelatina durante el proceso de electrohilado para lograr un carácter hidrofílico de la gelatina que permita obtener una degradación más controlada y así mejorar la adhesión celular.
- Medir el tamaño de poro y la porosidad de las matrices para poder predecir mejor la infiltración celular y el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos.
- Fabricar estructuras con más capas para estudiar la infiltración celular.
- Estudiar las propiedades mecánicas de las matrices propuestas para su posible uso en regeneración de tejidos óseos con defectos planos.
- Repetir los ensayos de cultivo celular con una correcta siembra, de manera de obtener resultados comparables con literatura.

## 9 Referencias

- [1] Caracciolo, P. C., Cortez Tornello, P. R., Montini Ballarin, F., & Abraham, G. A. (2013). Development of Electrospun Nanofibers for Biomedical Applications: State of the Art in Latin America. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 3, 39-60.
- [2] Abraham, G. A., Caracciolo, P. C., Buffa, F. A., & Cuadrado, T. R. (n.d.). Diseño y preparación de matrices poliméricas porosas para ingeniería de tejidos biológicos. 1-22.
- [3] Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941–2953.
- [4] Kenry, & Lim, C. T. (2017). Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science*, 2017, 1-17.

- [5] Williams, D. F. (2018). The Language of Biomaterials-Based Technologies. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 2018, 1-8.
- [6] Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M., & Roberts, S. J. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*, 213, 66-72.
- [7] Bongiovanni Abel, S., Montini Ballarin, F., & Abraham, G. A. (2020). Combination of electrospinning with other techniques for the fabrication of 3D polymeric and composite nanofibrous scaffolds with improved cellular interactions. *Nanotechnology*, 31 172002, 1-22.
- [8] INGECELL. (2019, 09 20). /2019/09/20/historia-de-la-ingenieria-de-tejidos/. Retrieved 07 10, 2022, from ingecell.com: <https://ingecell.com/2019/09/20/historia-de-la-ingenieria-de-tejidos/>.
- [9] Maurmann, N., Pereira, D. P., Burguez, D., de S Pereira, F. D., Neto, P. I., Rezende, R. A., . . . Pranke, P. (2017). Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. *Biomedical Physics and Engineering Express*, 3 045005, 1-16.
- [10] D'Amora, U., Ronca, A., Raucci, M. G., & Ambrosio, L. (2022). Part II: General issues: Processing and characterization - Chapter 6: Overview of scaffolds processing technologies. In *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers* (pp. 215-262). Elsevier.
- [11] Aldana, A. A., & Abraham, G. A. (2016). Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 523 (2017), 441-453.
- [12] Ryan, C. N., Fuller, K. P., Larrañaga, A., Biggs, M., Bayon, Y., Sarasua, J. R., . . . Zeugolis, D. I. (2015). An academic, clinical and industrial update on electrospun, additive manufactured and imprinted medical devices. *Expert Review of Medical Devices, Early Online*, 1-12.
- [13] Qu, H. (2020). Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Today Communications*, 24 101024, 1-16.

- [14] All3DP. (2022, 02 16). /es/1/tipos-de-impresoras-3d-tecnologia-de-impresion-3d/. Retrieved 07 29, 2022, from all3dp.com: <https://all3dp.com/es/1/tipos-de-impresoras-3d-tecnologia-de-impresion-3d/>.
- [15] Gleadall, A., Visscher, D., Yang, J., Thomas, D., & Segal, J. (2018). Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. *Burns & Trauma*, 6:19, 1-16.
- [16] Guvendiren, M., Molde, J., Soares, R. M., & Kohn, J. (2016). Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2016, 1-15.
- [17] Park, S. H., Kim, T. G., Kim, H. C., Yang, D.-Y., & Park, T. G. (2008). Development of dual scale scaffolds via direct polymer melt deposition and electrospinning for applications in tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4, 1198-1207.
- [18] Park, S. A., Kim, H. J., Lee, S. H., Lee, J. H., Kim, H. K., Yoon, T. R., & Kim, W. D. (2011). Fabrication of Nano/Microfiber Scaffolds Using a Combination of Rapid Prototyping and Electrospinning Systems. *Polymer Engineering and Science*, 2011, 1883-1890.
- [19] Tardajos, M. G., Cama, G., Dash, M., Misseeuw, L., Gheysens, T., Gorzelanny, C., . . . Dubruel, P. (2018). Chitosan functionalized poly- $\epsilon$ -caprolactone electrospun fibers and 3D printed scaffolds as antibacterial materials for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 191, 127-135.
- [20] Moroni, L., Schotel, R., Hamann, D., de Wijn, J. R., & van Blitterswijk, C. A. (2008). 3D Fiber-Deposited Electrospun Integrated Scaffolds Enhance Cartilage Tissue Formation. *Advanced Functional Materials*, 18, 53-60.
- [21] Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28, 325-347.
- [22] Dalton, P. D., Vaquette, C., Farrugia, B. L., Dargaville, T. R., Brown, T. D., & Hutmacher, D. W. (2012). Electrospinning and additive manufacturing: converging technologies. *Biomaterials Science*, 2013, 1-14.
- [23] Radacsi, N., & Nuansing, W. (2020). Chapter 7: Fabrication of 3D and 4D polymer micro-and nanostructures based on electrospinning. In *3D and 4D printing of polymer nanocomposite materials* (pp. 191-229). Elsevier.

- [24] Kim, G. H., Son, J. G., Park, S. A., & Kim, W. D. (2008). Hybrid Process for Fabricating 3D Hierarchical Scaffolds Combining Rapid Prototyping and Electrospinning. *Macromolecular Rapid Communications*, 29, 1577-1581.
- [25] Bongiovanni Abel, S., Liverani, L., Boccaccini, A. R., & Abraham, G. A. (2019). Effect of benign solvents composition on poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fiber properties. *Materials Letters*, 245, 86-89.
- [26] Vega-Avila, A. L., Perales-Perez, O., & Rullan, R. V. (2017). Biopolymers Nanofibers for Biomedical Applications and Environmental Applications. *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*, 2017, 109-147.
- [27] Zahmatkeshan, M., Adel, M., Bahrami, S., Esmaeili, F., Rezayat, S. M., Saeedi, Y., . . . Ashtari, K. (2018). Polymer Based Nanofibers: Preparation, Fabrication, and Applications. *Handbook of Nanofibers*, 2018, 1-47.
- [28] Subrahmanya, T. M., Arshad, A. B., Lin, P. T., Widakdo, J., Makari, H. K., Austria, H. F., . . . Hung, W.-S. (2021). A review of recent progress in polymeric electrospun nanofiber membranes in addressing safe water global issues. *RSC Advances*, 11, 9638–9663.
- [29] Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y. E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., . . . Ndesendo, V. M. (2013). A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 1-22.
- [30] Liverani, L., Vester, L., & Boccaccini, A. R. (2017). Biomaterials Produced via Green Electrospinning. *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*, 2017, 149-168.
- [31] Stoddard, R. J., Steger, A. L., Blakney, A. K., & Woodrow, K. A. (2016). In pursuit of functional electrospun materials for clinical applications in humans. *Therapeutic Delivery*, 2016, 387-409.
- [32] Kai, D., Jin, G., Prabhakaran, M. P., & Ramakrishna, S. (2013). Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells. *Biotechnology Journal*, 8, 59-72.

- [33] De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., & De Clerck, K. (2009). The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science*, *44*, 1357–1362.
- [34] Liverani, L., & Boccaccini, A. R. (2016). Versatile Production of Poly(e-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. *Nanomaterials*, *6*, 75.
- [35] Li, W., Shi, L., Zhang, X., Liu, K., Ullah, I., & Cheng, P. (2017). Electrospinning of polycaprolactone nanofibers using H<sub>2</sub>O as benign additive in polycaprolactone/glacial acetic acid solution. *Journal of Applied Polymer Science*, *2017* 45578, 1-9.
- [36] Binulal, N. S., Natarajan, A., Menon, D., Bhaskaran, V. K., Mony, U., & Nair, S. V. (2014). PCL–gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid–ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *25:4*, 325-340.
- [37] Dong, L., Wang, S.-J., Zhao, X.-R., Zhu, Y.-F., & Yu, J.-K. (2017). 3D- Printed Poly(ε-caprolactone) Scaffold Integrated with Cell-laden Chitosan Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Scientific Reports*, *7:13412*, 1-9.
- [38] Daskalova, A., Filipov, E., Angelova, L., Stefanov, R., Tatchev, D., Avdeev, G., . . . Buchvarov, I. (2021). Ultra-Short Laser Surface Properties Optimization of Biocompatibility Characteristics of 3D Poly-e-Caprolactone and Hydroxyapatite Composite Scaffolds. *Materials*, *14*, 7513, 1-22.
- [39] Tecnología de los plásticos. (2012, 11 21). /2012/11/policaprolactona-pcl.html. Retrieved Julio 7, 2022, from [tecnologiadelosplasticos.blogspot.com](http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com): <https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/11/policaprolactona-pcl.html>.
- [40] Fazeli, N., Arefian, E., Irani, S., Ardeshirylajimi, A., & Seyedjafari, E. (2021). 3D-Printed PCL Scaffolds Coated with Nanobioceramics Enhance Osteogenic Differentiation of Stem Cells. *ACS Omega* *2021*, *6*, 35284-35296.
- [41] Molina, A. B., & Flórez-Castillo, J. M. (2020). Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación. *Research Gate*, 2-9. Recuperado el 08 de 08 de 2022, de <https://www.researchgate.net/publication>.

- [42] Unalan, I., Endlein, S. J., Slavik, B., Buettner, A., Goldmann, W. H., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2019). Evaluation of Electrospun Poly(E-Caprolactone)/Gelatin Nanofiber Mats Containing Clove Essential Oil for Antibacterial Wound Dressing. *Pharmaceutics*, 11:570, 1-16.
- [43] ImageJ. (2015, 11 24). */plugins/directionality#fn:1*. Retrieved 03 20, 2022, from Imagej.net: <https://imagej.net/plugins/directionality#fn:1>.
- [44] Sigma Aldrich Cell Counting Kit-8. (2018). *Alemania Patent No. 96992*.
- [45] Castilla-Casadiego, D. A., Rivera-Martínez, C. A., Quiñones-Colón, B. A., & Almodóvar, J. (2017). Electrospun Collagen Scaffolds. *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*, 2017, 21-56.
- [46] Kim, J. I., Hwang, T. I., Lee, J., Park, C. H., & Kim, C. S. (2017). Electrospun Nanofibrous Nerve Conduits. *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*, 2017, 207-234.
- [47] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.-H., & Ramakrishna, S. (2008). Electrospun Poly(e-Caprolactone)/Gelatin Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *Biomaterials*, 29, 4532-4539.
- [48] Ramalingam, R., DhanD, C., Leung, C. M., Ezhilarasu, H., Prasannan, P., Ong, S. T., . . . Arunachalam, K. D. (2019). Poly(e-Caprolactone)/Gelatin Hybrid Electrospun Composite Nanofibrous Mats Containing Ultrasound Assisted Herbal Extract: Antimicrobial and Cell Proliferation Study. *Nanomaterials*, 9, 462.
- [49] Bikuna-Izagirre, M., Aldazabal, J., & Paredes, J. (2022). Gelatin Blends Enhance Performance of Electrospun Polymeric Scaffolds in Comparison to Coating Protocols. *Polymers*, 14, 1311.
- [50] Luginina, M., Schuhladden, K., Orrú, R., Cao, G., Boccaccini, A. R., & Liverani, L. (2020). Electrospun PCL/PGS Composite Fibers Incorporating Bioactive Glass Particles for Soft Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials*, 10, 978.
- [51] Lores, N. J., Hung, X., Talou, M. H., Abraham, G. A., & Caracciolo, P. C. (2021). Novel three-dimensional printing of poly(ester urethane) scaffolds for biomedical applications. *Polymers Advanced Technologies*, 32, 3309-3321.

- [52] Dong, Q., Zhang, M., Zhou, X., Shao, Y., Li, J., Wang, L., . . . Bai, J. (2021). 3D-printed Mg-incorporated PCL-based scaffolds: A promising approach for bone healing. *Materials Science & Engineering C*, 129 112372, 1-14.
- [53] Wang, S., Li, R., Xu, Y., Xia, D., Zhu, Y., Yoon, J., . . . Zhou, Y. (2020). Fabrication and Application of a 3D-Printed Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Cage Scaffold for Bone Tissue Engineering. *BioMed Research International*, 2020, 1-12.
- [54] Li, H., Liao, Z., Yang, Z., Gao, C., Fu, L., Li, P., . . . Guo, Q. (2021). 3D Printed Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Meniscus Extracellular Matrix Composite Scaffold Functionalized With Kartogenin-Releasing PLGA Microspheres for Meniscus Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9:662381, 1-18.
- [55] Hu, Y., Feng, B., Zhang, W., Yan, C., Yao, Q., Shao, C., . . . Fu, Y. (2019). Electrospun gelatin/PCL and collagen/PCL scaffolds for modulating responses of bone marrow endothelial progenitor cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 17, 3717-3726.
- [56] Unalan, I., Slavik, B., Buettner, A., Goldmann, W. H., Frank, G., & Boccaccini, A. R. (2019). Physical and Antibacterial Properties of Peppermint Essential Oil Loaded Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) Electrospun Fiber Mats for Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:346, 1-11.
- [57] Yoshioka, T., Kamada, F., Kawazoe, N., Tateishi, T., & Chen, G. (2010). Structural Changes and Biodegradation of PLLA, PCL, and PLGA Sponges During In Vitro Incubation. *Polymer Engineering and Science*, 2010, 1895-1903.
- [58] Díaz, E., Sandonis, I., & Valle, M. B. (2014). In Vitro Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1-8.
- [59] Distler, T., Fournier, N., Grünwald, A., Polley, C., Seitz, H., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2020). Polymer-Bioactive Glass Composite Filaments for 3D Scaffold Manufacturing by Fused Deposition Modelling: Fabrication and Characterization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8:552, 1-43.