



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE UNA NUEVA TÉCNICA PARA LA CREACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES BIOMIMÉTICAS CON LA CAPACIDAD DE PRODUCIR REGENERACIÓN CELULAR**

**Jesús Manuel Rodríguez Rego**

**R024 - PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍAS INDUSTRIALES POR LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

Conformidad del director y los codirectores en su caso, D. Antonio Macías García, D. Juan Pablo Carrasco Amador y D. Antonio Díaz Parralejo.

Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

**2023**

---





**TESIS DOCTORAL**  
**DOCTORADO EN INGENIERÍAS INDUSTRIALES**

**“ESTUDIO DE UNA NUEVA TÉCNICA PARA LA CREACIÓN DE ESTRUCTURAS  
TRIDIMENSIONALES BIOMIMÉTICAS CON LA CAPACIDAD DE PRODUCIR  
REGENERACIÓN CELULAR”**

**Jesús Manuel Rodríguez Rego**

**2023**

---

---

---

El Dr. Antonio Macías García, catedrático del Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales de la Universidad de Extremadura, el Dr. Antonio Díaz Parralejo, catedrático del Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales de la Universidad de Extremadura y el Dr. Juan Pablo Carrasco Amador, Profesor contratado doctor del Departamento de Expresión Gráfica de la Universidad de Extremadura, en calidad de directores de la Tesis Doctoral (modalidad Doctorado Internacional) presentada por Don Jesús Manuel Rodríguez Rego, con el título **“Estudio de una nueva técnica para la creación de estructuras tridimensionales biomiméticas con la capacidad de producir regeneración celular”**.

CERTIFICAN

Que la presente memoria, **“Estudio de una nueva técnica para la creación de estructuras tridimensionales biomiméticas con la capacidad de producir regeneración celular”**, para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Extremadura, reúne las condiciones adecuadas para constituir la tesis doctoral de Don Jesús Manuel Rodríguez Rego (modalidad Doctorado Internacional).

Asimismo, certifican que la citada tesis doctoral se ha realizado en la Escuela de Ingeniería Industrial de la Universidad de Extremadura.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Badajoz a 30 de marzo de 2023.

Fdo. Dr. Antonio Macías  
García

Fdo. Dr. Antonio Díaz  
Parralejo

Fdo. Dr. Juan Pablo  
Carrasco Amador

---

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el catedrático Antonio Macías García, el catedrático Antonio Díaz Parralejo y el profesor Juan Pablo Carrasco Amador, por su apoyo y completa disposición. Cada uno de ellos ha conseguido que me sintiera muy afortunado de trabajar en la universidad y que las horas de trabajo se convirtieran en una motivación diaria para querer seguir avanzando y esforzándome por aprender y contribuir. En especial debo agradecer a Antonio Macías su calidad profesional y humana, fue él quien me brindó la oportunidad de trabajar en investigación y poder comprobar lo apasionante que es este mundo. Desde el comienzo, nuestra relación fue muy cercana donde prácticamente todos los días (vacaciones incluidas) teníamos largas conversaciones acerca de ciencia, cualquier excusa era buena para llamarle y contarle los resultados que estábamos teniendo. Antonio gracias por haberme enseñado tanto y confiar en mí, una de las mejores decisiones de mi vida fue llamar a tu puerta para hacer grafeno transparente.

A Antonio Díaz le agradezco su confianza, su apoyo y por estar disponible siempre que le necesitaba. Antonio te agradezco tus consejos y valoro profundamente que me hayas enseñado tu forma de trabajar, no me cabe duda de que me será tremendamente útil en mi vida.

A Juan Pablo le agradezco su confianza en mis capacidades, sus consejos y el cariño que siempre me ha mostrado, pero sobre todo le agradezco su amistad. Muchas gracias, Juan Pablo por ser tan buen director y amigo.

A la catedrática María Ángeles le agradezco su disposición a ayudarme siempre, su guía, pero sobre todo le doy las gracias por su trato y hacerme sentir desde el primer día como uno más del grupo de investigación.

Al profesor Alfonso Carlos le doy las gracias por su implicación en mi carrera investigadora, su amistad y su calidad humana. Gracias Alfonso por apoyarme día tras día, por sacar tiempo de donde no lo tienes para ayudarme y haber depositado en mi tanta confianza.

A mi antiguo compañero y amigo Raúl Sánchez (zape) le agradezco la paciencia y amistad que siempre hemos tenido. Empecé con él esta aventura y aunque tomamos caminos diferentes, me ha enseñado y motivado en todo momento.

A mi pareja le agradezco su amor, su confianza y su sacrificio diario. No es fácil encontrar a una persona que, sin pedírselo, quiera sacrificar tanto por verme conseguir mis objetivos, por demostrarme día tras día con una sonrisa que confía en mí y que vale la pena cualquier riesgo si eso me acerca a mis metas. Laura gracias por hacerme sentir que somos un gran equipo y, además, ahora que trabajamos juntos, sé que seremos la próxima pareja Curie.

A mi familia le agradezco su amor y la increíble paciencia que han tenido conmigo. En especial a mi madre que ha vivido durante todos los años de mi carrera universitaria mis alegrías y mis penas. Le agradezco haber sido mi psicóloga particular, mi consejera y por haber tenido una confianza absoluta e incondicional de que yo podía con todo. Sin ella, habría cometido el gran error de no aprender el valor que tiene luchar por lo que cada uno quiere. Muchas gracias mamá por haberme enseñado que es la generosidad, el amor desinteresado, y por siempre haber creído en mí. Has sido y serás un pilar fundamental para mí.

A mi padre le agradezco su apoyo, sus consejos y experiencias de vida que me han permitido madurar personal y profesionalmente más rápido. Gracias papá por no haber dudado en darme todos los medios necesarios para que me formara y llegara a ser lo que yo quisiera en la vida.

A mis hermanos, les agradezco ser una fuente de inspiración y ejemplo de vida. Es increíble que hayáis echo tan bien las labores de hermanos, padres, amigos y confidentes. Muchas gracias por no haberme dejado que me desviara de mi camino y haberme brindado siempre vuestra ayuda.

Mi agradecimiento a todos los que de una forma u otra me han ayudado a conseguir mis objetivos.

## PREFACIO

### ➤ Esquema de la disertación

La estructura de la presente tesis doctoral se divide en cinco capítulos: *Introducción, Objetivos, Materiales y Métodos, Resultados y Conclusiones*.

En la sección *Introducción* se contextualiza la investigación, se presenta el surgimiento de la bioimpresión 3D junto con el estado actual y se plantean los principales retos y el potencial de esta tecnología.

En la sección *Objetivos* se puntualizan el objetivo general y diferentes objetivos específicos necesarios para cumplir el objetivo final de la Tesis Doctoral.

En la sección *Materiales y Métodos* se especifican los materiales utilizados y las diferentes metodologías generales llevadas a cabo para el desarrollo de la Tesis Doctoral.

En la sección de *Resultados* se presentan de forma minuciosa los resultados obtenidos, organizados en 6 secciones correspondientes a cada uno de los logros conseguidos durante la realización de la Tesis Doctoral:

- 4 artículos aceptados en revista del primer cuartil
- 1 artículo en revisión en revista del segundo cuartil
- 1 capítulo de libro en la editorial CRC Press del grupo Routledge
- 1 modelo de utilidad en explotación

Por último, en la sección de *Conclusiones* se exponen las principales conclusiones de cada sección del apartado de *Resultados*, redactadas en inglés, siguiendo las directrices para optar a la mención de “Doctorado Internacional”.

## DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los logros generados a partir de la presente tesis doctoral se dividen en:

➤ Artículos científicos publicados

- Mendoza-Cerezo, L., Rodríguez-Rego, J.M., Macías-García, A., Díaz-Parralejo, A., & Marcos-Romero, A.C. (2023). Evolution of bioprinting and current applications. *International Journal of Bioprinting*, 9(2). doi:<http://dx.doi.org/10.18063/ijb.v9i2.667>. **Q1, Impact Factor: 7.422**
- Rodríguez-Rego, J.M., Mendoza-Cerezo, L., Macías-García, A., Carrasco-Amador, J.P. & Marcos-Romero, A.C. (2023). Methodology for characterizing the printability of hydrogels. *International Journal of Bioprinting*, 9(2). doi:<http://dx.doi.org/10.18063/ijb.v9i2.667>. **Q1, Impact Factor: 7.422**
- Rodríguez-Rego, J.M., Mendoza-Cerezo, L., Macías-García, A., Marcos-Romero, A.C., & Carrasco-Amador, J.P. (2023). Comparison of the potential for bioprinting of different 3D printing technologies. *International Journal of Bioprinting*, 9(3). doi:<http://dx.doi.org/10.18063/ijb.680>. **Q1, Impact Factor: 7.422**
- Sánchez-Sánchez, R., Rodríguez-Rego, J.M., Macías-García, A., Mendoza-Cerezo, L., & Díaz-Parralejo, A. (2023). Relationship between shear-thinning rheological properties of bioinks and bioprinting parameters. *International Journal of Bioprinting*, 9(2). doi:<http://dx.doi.org/10.18063/ijb.687>. **Q1, Impact Factor: 7.422**

➤ Capítulo de libro

- J. M. R. Rego, L. M. Cerezo, A. M. García, and A. C. M. Romero, "Analysis of the Use of Hydrogels in Bioprinting," in *3D Printing*, Boca Raton: CRC Press, 2023, pp. 437–452. doi: 10.1201/9781003296676-28.

➤ Modelo de utilidad

- Titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D. Número de solicitud U202300008. Año de publicación 2023. Invención en explotación.

➤ Artículos en revisión (publicado como PrePrint)

- Rodríguez Rego, J. M., Mendoza-Cerezo, L., Soriano-Carrera, A., Marcos-Romero, A.C., & Macías García, A. (2023). Fabrication and Characterisation of Bioglass and Hydroxyapatite-Filled Scaffolds. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/SSRN.4388787>. **Q2, Impact Factor: 4.042**

## RESUMEN

Las técnicas odontológicas actuales encaminadas a la regeneración o sustitución de piezas dentales se basan, en muchos casos, en la realización de implantes dentales mediante una o varias cirugías que permiten llevar a cabo la fijación de una pieza dental artificial en el hueso mandibular, simulando la inserción de la raíz de una pieza dental real. Esta fijación se lleva a cabo mediante la colocación de un tornillo en una perforación de la mandíbula, el cual suele estar compuesto de titanio puro, aleaciones de titanio con otros metales y zirconio.

Este tipo de cirugía, aunque normalmente cuenta con una alta tasa de éxito, no está exenta de riesgos, ya que al introducir un cuerpo extraño en el interior del hueso mandibular pueden producirse infecciones o daños en las estructuras circundantes, pudiendo llegar incluso a producirse lesiones en los nervios que ocasionen pérdidas de sensibilidad o movilidad facial en determinadas zonas.

El objetivo de esta tesis se basa en el estudio y desarrollo de aquellas técnicas que permitan desarrollar un procedimiento para lograr la corrección de defectos odontológicos y/o óseos, mediante la combinación de diferentes tecnologías novedosas como la fabricación aditiva o impresión 3D, bioimpresión 3D, escáner 3D y proliferación celular sobre scaffolds, que ayuden a mejorar la técnica actual de regeneración dental mediante la minimización de riesgos y aumento de la optimización, al emplear las células del propio paciente y evitar la inserción de cuerpos extraños.

Para ello se busca, en primer lugar, llevar a cabo una extensa revisión bibliográfica para obtener información esencial sobre la bioimpresión y los hidrogeles empleados en bioimpresión, así como sus aplicaciones y líneas futuras.

En segundo lugar, se busca determinar las propiedades mecánicas deseables en los hidrogeles para asegurar una correcta imprimibilidad y capacidad estructural, mediante el análisis de hidrogeles comerciales. El estudio de estas propiedades se lleva a cabo mediante la determinación de las propiedades reológicas de los hidrogeles y la aplicación de una metodología propia de caracterización de la imprimibilidad.

En tercer lugar, se busca realizar los estudios necesarios para llevar a cabo la comparación entre hidrogeles y termoplásticos biocompatibles, determinando las ventajas e inconvenientes de cada uno.

Todos estos esfuerzos se han encaminado al asentamiento de las bases que permitan obtener una nueva técnica para corregir defectos odontológicos y/o óseos mediante la combinación de las tecnologías anteriormente nombradas, para lograr, en un futuro, la reconstrucción ósea parcial o completa de un diente del paciente o abordar problemas más complejos como la pérdida de hueso maxilofacial.

**Palabras clave:** Odontología; diente; hueso maxilofacial; impresión 3D; bioimpresión 3D; Scanner 3D; hidrogeles; impresión aditiva; scaffold; regeneración ósea; adhesión.



## ABSTRACT

Current dental techniques aimed at the regeneration or replacement of dental pieces are based, in many cases, on dental implants by means of one or more surgeries that allow the fixation of an artificial dental piece in the mandibular bone, simulating the insertion of the root of a real dental piece. This fixation is carried out by placing a screw in a perforation of the jawbone, which is usually made of pure titanium, titanium alloys with other metals and zirconium.

This type of surgery, although it normally has a high success rate, is not without risk, as the introduction of a foreign body inside the mandibular bone can cause infections or damage to the surrounding structures and can even lead to nerve damage that can cause loss of sensitivity or facial mobility in certain areas.

The aim of this thesis is based on the study and development of techniques that allow the development of a procedure to achieve the correction of dental and/or bone defects, through the combination of different novel technologies such as additive manufacturing or 3D printing, 3D bioprinting, 3D scanning and cell proliferation on scaffolds, which help to improve the current technique of dental regeneration by minimising risks and increasing optimisation, by using the patient's own cells and avoiding the insertion of foreign bodies.

To this end, the first aim is to carry out an extensive literature review to obtain essential information on bioprinting and the hydrogels used in bioprinting, as well as their applications and future lines of research.

Secondly, the aim is to determine the desirable mechanical properties of hydrogels to ensure correct printability and structural capacity, through the analysis of commercial hydrogels. The study of these properties is carried out by determining the rheological properties of hydrogels and the application of a proprietary methodology for characterising printability.

Thirdly, the aim is to carry out the necessary studies to compare hydrogels and biocompatible thermoplastics, determining the advantages and disadvantages of each one.

All these efforts are aimed at laying the foundations for a new technique to correct dental and/or bone defects by combining the aforementioned technologies, in order to achieve, in the future, the partial or complete reconstruction of a patient's tooth or to tackle more complex problems such as maxillofacial bone loss.

**Keywords:** Dentistry; tooth; maxillofacial bone; 3D printing; 3D bioprinting; 3D scanner; hydrogels; additive printing; scaffold; bone regeneration; adhesion.



## ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

CAD (**computer-aided design**)

Fused Deposition Modeling (**FDM**)

Oficina Española de Patentes y Marcas (**OEPM**)

Acrilonitrilo butadieno estireno (**ABS**)

Ácido poliláctico (**PLA**)

Polipropileno (**PP**)

Acetato de polivinilo (**PVA**)

Polietilino de alta densidad (**HDPE**)

Tereftalato de polietileno (**PET**)

Standard Triangle Language (**STL**)

Rango Lineal Viscoso (**LVR**)

Tensiones superficiales del sólido ( $\gamma_S$ )

Tensiones superficiales del líquido ( $\gamma_L$ )

Interfaz sólido líquido ( $\gamma_S/L$ )

Módulo de deformación (**G**)

Módulo de pérdida (**G''**)

Módulo de almacenamiento (**G'**)

Tasa de deformación ( $\dot{\gamma}$ )

Viscosidad dinámica ( $\mu$ )

Tiempo (**s**)

Células mesenquimales (**MSC**)

Factor de crecimiento vascular endotelial (**VEGF**)

Factor de crecimiento de fibroblastos (**FGF**)

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (**PDGF**)

Plasma enriquecido con plaquetas (**PRP**)

Proteínas morfogenéticas óseas (**BMP**)

Hidroxiapatita (**HA**)

Proteínas morfogenéticas del hueso (**BMP**)

TNF- $\alpha$  (**factor de necrosis tumoral  $\alpha$** )

IL-1, 6, 11 y 18 (**Interleucinas**)

factor de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**)

TFG- $\beta$ 2 y TFG- $\beta$ 3 (**factores de crecimiento transformante**)

GDF-5 (**factor de crecimiento diferenciación 5**)

BMP-5 y -6 (**proteína morfogenética del hueso**)

Policaprolactona (**PCL**)

Células madre de la pulpa dental humana (**hDPSC**)

Colágeno con metacrilato (**COLMA**)

Hidróxido de Sodio (**NaOH**)

Gelatina con metacrilato liofilizado (**GeIMA**)

Ácido hialurónico con metacrilato (**HAMA**)

Fosfinato de litio (**LAP**)

Poli-óxido de etileno (**PEO**)

Poli-óxido de propileno (**PPO**)

Polihidroximetilmetacrilato (**pHEMA**)

Glucomanano de konjac (**KGM**)

Biotintas basadas en matriz extracelular descelularizada (**dECM**)

Polietilenglicol (**PEG**)

---

Ácido láctico coglicólico-PEG ( <b>PLGA-PEG</b> )	Tiempo de fraguado ( <b>TF</b> )
Poli N-isopropilacrilamida ( <b>PNIPAAm</b> )	Microscopio electrónico de barrido ( <b>SEM</b> )
Capacidad de impresión ( <b>Pr</b> )	hidroxiapatita carbonatada ( <b>HCA</b> )
Yoduro de propidio ( <b>PI</b> )	Microextrusión ( <b>μ-extrusión</b> )
Tumor murino de Engelbreth- Holm-Swarm ( <b>EHS</b> )	Índice de comportamiento ( <b>n</b> )
Tomografía axial computerizada ( <b>TAC</b> )	Índice de consistencia ( <b>k</b> )
vidrio bioactivo ( <b>BGP</b> )	Matriz extracelular nativa ( <b>MEC</b> )
Tiempo de cohesión ( <b>TC</b> )	Alcohol Polivinílico ( <b>PVA</b> )

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XXI
ÍNDICE DE TABLAS .....	XXVII
❖ <b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 Impresión 3D.....	4
1.1.1 Materiales utilizados en la impresión 3D .....	5
1.1.2 Limitaciones de la impresión 3D .....	6
1.2 Bioimpresión 3D.....	7
1.2.1 Técnicas de bioimpresión .....	9
1.2.2 Materiales usados en la bioimpresión 3D (biotintas).....	12
1.2.3 Caracterización de los hidrogeles. Imprimibilidad y propiedades reológicas .....	15
1.3 Medicina e impresión 3D. Ingeniería de tejidos .....	25
1.3.1 Regeneración del tejido óseo .....	26
1.3.2 Estructura y composición del hueso .....	26
1.3.3 Regeneración natural del tejido .....	29
1.3.4 Células mesenquimales estromales (MSC).....	33
1.3.5 Aplicaciones de las técnicas de fabricación aditiva en la medicina.....	34
❖ <b>OBJETIVOS DE LA TESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
❖ <b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>47</b>
3.1 Materiales de partida.....	47
3.1.1 ColMA liofilizado .....	47
3.1.2 Fotoiniciador LAP .....	47
3.1.3 Agente de reconstitución A y P .....	47
3.1.4 Tampón de colágeno.....	48
3.1.5 Hidróxido de Sodio (NaOH).....	48
3.1.6 GelMA liofilizado .....	48
3.1.7 Cellink Start .....	48
3.1.8 HAMA liofilizado .....	48
3.1.9 PLA .....	49
3.2 Equipos de laboratorio.....	51
3.2.1 Balanza Sartorius modelo BP61 S .....	51
3.2.2 Impresora 3D. Creality Ender 3 pro .....	52
3.2.3 Bioimpresora 3D. BIO X.....	54
3.2.4 Escáner 3D. Shining 3D SE.....	56
3.2.5 Reómetro .....	57
3.2.6 Medidor de pH GLP 21 .....	58
3.2.7 Agitador de laboratorio magnético digital (Benchmark).....	59

3.3	Metodología.....	60
3.3.1	Conformación de los hidrogeles .....	60
3.3.2	Digitalización, moldeado y (bio)fabricación de piezas .....	65
3.3.3	Protocolo para el escaneado de una estructura.....	66
❖	<b>CAPÍTULO: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>
❖	<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
4.1	Evolución de la bioimpresión y aplicaciones actuales .....	87
4.1.1	Introducción.....	88
4.1.2	Conclusiones .....	100
4.1.3	BIBLIOGRAFÍA.....	102
4.2	Análisis del uso de hidrogeles en la bioimpresión.....	112
4.2.1	Características de los hidrogeles.....	114
4.2.2	Propiedades reológicas de los hidrogeles.....	115
4.2.3	Composición de hidrogeles empleados en bioimpresión.....	116
4.2.4	Tipos de biotintas basadas en hidrogeles.....	117
4.2.5	Reticulación de los hidrogeles .....	120
4.2.6	Tecnologías de biofabricación .....	123
4.2.7	Conclusiones .....	127
4.2.8	Bibliografía .....	128
4.3	Metodología para caracterizar la imprimibilidad de hidrogeles .....	132
4.3.1	Introducción.....	133
4.3.2	Objetivos.....	136
4.3.3	Metodología.....	136
4.3.4	Discusión .....	144
4.3.5	Conclusiones .....	146
4.3.6	Bibliografía .....	147
4.4	Comparación del potencial para la bioimpresión de diferentes tecnologías de impresión 3D.....	150
4.4.1	Introducción.....	151
4.4.2	Materiales y métodos .....	153
4.4.3	Resultados.....	155
4.4.4	Conclusiones .....	169
4.4.5	BIBLIOGRAFÍA.....	170
4.5	Relación entre las propiedades reológicas de cizallamiento de las biotintas y los parámetros de bioimpresión .....	173
4.5.1	Introducción.....	174
4.5.2	Materiales y métodos .....	176
4.5.3	Resultados y discusión .....	179
4.5.4	Conclusiones .....	186
4.5.5	Bibliografía .....	187
4.6	Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D (U202300008).....	190
4.6.1	Objeto de la invención .....	190

4.6.2	Problema técnico a resolver y antecedentes de la invención .....	190
4.6.3	Descripción de la invención .....	192
4.6.4	Breve descripción de las figuras.....	193
4.6.5	Descripción detallada.....	195
4.6.6	Reivindicaciones.....	198
4.6.7	Figuras.....	201
4.7	Fabricación y caracterización de andamiajes rellenos de biovidrio e hidroxiapatita.....	204
4.7.1	Resumen .....	205
4.7.2	Introducción .....	205
4.7.3	Materiales y métodos .....	206
4.7.4	Resultados y discusión .....	212
4.7.5	Conclusiones .....	221
4.7.6	Referencias.....	222
❖	<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>229</b>
5	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>231</b>
5.1	Conclusiones .....	233
❖	<b>CAPÍTULO 6: FINANCIACIÓN OBTENIDA Y LÍNEAS FUTURAS .....</b>	<b>235</b>
6	<b>FINANCIACIÓN OBTENIDA Y LÍNEAS FUTURAS.....</b>	<b>237</b>
6.1	Coste de la investigación.....	237
6.2	Líneas futuras de investigación.....	238



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Número de solicitudes registradas en la OEPM [9].	5
Figura 1-2: Número de publicaciones publicadas acerca del PLA [14].	6
Figura 1-3: Importancia de la bioimpresión 3D. Integración celular para crear la biotinta y así conseguir una mejor adhesión celular [20].	8
Figura 1-4: Diferentes técnicas de bioimpresión. Fuente propia.	9
Figura 1-5: Imagen explicativa de las tres formas de impresión por extrusión [19].	10
Figura 1-6: Imagen explicativa de la impresión por gotas [19].	10
Figura 1-7: Técnica de bioimpresión por estereolitografía. Fuente propia.	11
Figura 1-8: Técnica de bioimpresión asistida por láser [19].	11
Figura 1-9: Ventana de imprimibilidad [18].	16
Figura 1-10: Si sometemos a una partícula fluida un esfuerzo cortante de valor $\tau$ en un plano, el ángulo $\delta\theta$ de la deformación aumentará continuamente [55].	16
Figura 1-11: Diferencia de comportamiento reológico de cuatro materiales no newtonianos y uno newtoniano. Relación del esfuerzo cortante y la velocidad de deformación en diferentes materiales viscosos [56].	17
Figura 1-12: En la primera figura se puede ver la sección de una gota esférica con las fuerzas de tensión superficial y en la segunda imagen la interfase con radios de curvatura $R_1$ y $R_2$ a lo largo de direcciones ortogonales. Hacen referencia a interfases curvadas [58].	17
Figura 1-13: a) Velocidad de corte laminar en la representación de capas de fluido. b) Modelo de placas paralelas donde $F$ es la fuerza aplicada, $A$ es el área de la placa, $S$ el desplazamiento de la placa, $v$ la velocidad y $h$ la distancia entre placas o gap. Fuente propia.	19
Figura 1-14: Comparación entre la deformación porcentual y tensión aplicada sobre un material elástico (con un desfase de $0^\circ$ ), viscoso (con un desfase de $90^\circ$ ) y viscoelástico, en función de $\omega$ . tiempo [61].	20
Figura 1-15: Módulos de pérdida y de almacenamiento vs. Frecuencia angular. Fuente propia.	20
Figura 1-16: Viscosidad $\mu$ de fluidos Newtonianos y no-Newtonianos vs. la tasa de deformación $\dot{\gamma}$ . Fuente propia.	21
Figura 1-17: Tipos de fluidos. Fuente propia.	22
Figura 1-18: Gráfica de la viscosidad ( $\mu$ ) vs. tasa de deformación ( $s^{-1}$ ) de un fluido no-Newtoniano con propiedad "shear thinning". Fuente propia.	23

---

Figura 1-19: Módulos de pérdida y de almacenamiento vs. Frecuencia angular. Fuente propia. ....	24
Figura 1-20: Comparación de la capacidad de amortiguación de las tintas. Fuente propia. ....	25
Figura 1-21: Respuesta inflamatoria aguda. Fuente propia. ....	31
Figura 1-22: Generación del callo cartilaginoso. Fuente propia. ....	31
Figura 1-23: Revascularización y neoangiogénesis. Fuente propia. ....	32
Figura 1-24: Remodelación ósea. Fuente propia. ....	32
Figura 1-25: Estructura del hueso [99]. ....	33
Figura 1-26: Esquema del proceso de la ingeniería de tejidos [103]. ....	34
Figura 1-27: Técnicas de fabricación de scaffolds [108]. ....	36
Figura 1-28: Aumento de la cresta alveolar mediante un andamio de tejido óseo fabricado con impresión 3D [109]. ....	36
Figura 1-29: Formación del nuevo hueso sin andamio, con andamio sin recubrimiento y con andamio recubierto de policaprolactona (PCL) y proteínas morfogenéticas del hueso (BMP-2) [126]. ....	38
Figura 1-30: Proceso de bioimpresión dentina-pulpa [129]. ....	39
Figura 3-1: Vías para la polimerización del ácido poliláctico [145]. ....	49
Figura 3-2: Esquema de funcionamiento [146]. ....	51
Figura 3-3: Impresora 3D Ender 3 Pro [147]. ....	52
Figura 3-4: Bioimpresora BIO X [148]. ....	54
Figura 3-5: Tipos de cabezales [150]. ....	55
Figura 3-6: Escáner 3D EINSCAN-SE [151]. ....	56
Figura 3-7: Kinexus pro+ [152]. ....	57
Figura 3-8: Medidor de pH GLP 21 [153]. ....	58
Figura 3-9: Especificaciones técnicas [153]. ....	58
Figura 3-10: Materiales necesarios para la conformación del hidrogel. ....	60
Figura 3-11: Paso previo a mezclar el PI con el agente de reconstitución P. ....	61
Figura 3-12: Proceso de calentado. ....	61
Figura 3-13: En el vial se calienta la mezcla con el PI, el agente y el material liofilizado. ....	62
Figura 3-14: Comprobación del pH. ....	63

Figura 3-15: Hidrogel conformado y almacenado. ....	64
Figura 3-16: Escáner 3D especializado en obtención de modelos 3D [157]. ....	66
Figura 3-17: Paso 1 del protocolo del escáner 3D. ....	66
Figura 3-18: Ajuste de los parámetros del software SHINING 3D. ....	66
Figura 3-19: Todas las imágenes que el escáner realiza para interpretarlas y proporcionar un modelo 3D. ....	67
Figura 3-20: Modelo 3D obtenido sin tratamiento digital. ....	67
Figura 3-21: Ajuste de la edición del modelo. ....	67
Figura 3-22: Ventana de selección del detalle. ....	68
Figura 3-23: Pieza final tras el proceso de escaneo. ....	68
Figura 3-24: Phantom digital obtenido en el proyecto. ....	68
Figura 3-25: Digitalización mediante el programa Meshmixer. ....	69
Figura 4-1: Diagrama de flujo PRISMA que muestra la búsqueda bibliográfica, el proceso de exclusión, los criterios de elegibilidad y los documentos finales incluidos. Se incluyeron 19 artículos sin restricción de fecha de publicación. ....	89
Figura 4-2: número de publicaciones estudiadas por fecha de publicación de las 119 publicaciones estudiadas. ....	90
Figura 4-3: Mapa representativo del número de publicaciones por cada país, en función de los 117 artículos elegidos. Se pueden observar: Estados Unidos (53), China (8), Alemania (8), Reino Unido (8), Países Bajos (7), Corea del Sur (6), Japón (5), India (2), Israel (2), Beirut (1), Sudáfrica (1), Canadá (1), Qatar (1), Rusia (1), Australia (1), Suecia (1), Bélgica (1), Francia (1), Irlanda (1), Italia (1), Tailandia (1), Taiwán (1), Letonia (1), Irán (1). ....	90
Figura 4-4: Hitos relevantes en la evolución de la bioimpresión. 1998: crecimiento celular sobre estructura tridimensional prefabricada. 2000: metodologías basadas en nanodeposiciones con jeringuillas. 2003: planteamiento de la unión de células con hidrogeles para formar órganos. 2004: aparición del término “bioimpresión”. 2006: encapsulación de células en hidrogeles. 2009: unión de fármacos y bioimpresión. 2012: bioimpresión de tejido cardíaco. 2013: bioimpresión de oreja humana con bobina. 2014: bioimpresión con células Hela para estudios tumorales. 2015: bioimpresión de estructuras similares al cerebro con neuronas primarias encapsuladas. 2016: desarrollo de bioimpresora integrada de órganos y tejidos. 2017: bioimpresión de glándula tiroides y tejido ovárico funcionales en ratones. 2019: bioimpresión de scaffolds biomiméticos que permiten la regeneración de axones dañados de la médula espinal de ratones. 2020: comienzo de la bioimpresión 4D, gracias a la cual los elementos bioimpresos pueden cambiar tras reaccionar con el entorno. Fuente propia. ....	97

Figura 4-5: Hitos relevantes en la evolución de la bioimpresión. 1998: crecimiento celular sobre estructura tridimensional prefabricada. 2000: metodologías basadas en nanodeposiciones con jeringuillas. 2003: planteamiento de la unión de células con hidrogeles para formar órganos. 2004: aparición del término “bioimpresión”. 2006: encapsulación de células en hidrogeles. 2009: unión de fármacos y bioimpresión. 2012: bioimpresión de tejido cardíaco. 2013: bioimpresión de oreja humana con bobina. 2014: bioimpresión con células Hela para estudios tumorales. 2015: bioimpresión de estructuras similares al cerebro con neuronas primarias encapsuladas. 2016: desarrollo de bioimpresora integrada de órganos y tejidos. 2017: bioimpresión de glándula tiroides y tejido ovárico funcionales en ratones. 2019: bioimpresión de scaffolds biomiméticos que permiten la regeneración de axones dañados de la médula espinal de ratones. 2020: comienzo de la bioimpresión 4D, gracias a la cual los elementos bioimpresos pueden cambiar tras reaccionar con el entorno. Fuente propia..... 113

Figura 4-6: Proceso de reticulación de un hidrogel. Fuente propia. .... 115

Figura 4-7: Efecto del esfuerzo de cizalla durante la bioimpresión en las células. Fuente propia.. 116

Figura 4-8: Proceso de reticulación de los hidrogeles junto con las células para la posterior formación de tejido. Fuente propia. .... 120

Figura 4-9: Bioimpresión de gotas bajo demanda: bioimpresión termal y bioimpresión piezoeléctrica. Fuente propia. .... 124

Figura 4-10: Bioimpresión por extrusión. Fuente propia. .... 125

Figura 4-11: Bioimpresión asistida por láser. Fuente propia..... 126

Figura 4-12: Bioimpresión por procesamiento de luz digital. Fuente propia..... 126

Figura 4-13: Ventana de biofabricación. En el eje Y mejoran la capacidad de impresión y la calidad del andamio bioimpreso, mientras que en el eje X mejoran la biocompatibilidad y la proliferación celular. Fuente: elaboración propia..... 134

Figura 4-14: Cámara generada para realizar el método de gota sécil utilizando un lecho no absorbente e iluminación adecuada. Fuente: elaboración propia..... 137

Figura 4-15: Ángulo de contacto en la interfaz sólido-aire. Fuente: elaboración propia..... 138

Figura 4-16: Cálculo del coeficiente de colapso sobre la base del real el área y el área teórica. Fuente: elaboración propia. .... 139

Figura 4-17: Plataforma diseñada para realizar el ensayo de colapso de los filamentos de hidrogel extruidos con la bioimpresora. Fuente: elaboración propia. .... 141

Figura 4-18: Visualización de un hidrogel con gelificación baja (A), gelificación perfecta (B) y gelificación excesiva (C). Fuente: elaboración propia..... 142

Figura 4-19: Cuadrícula o patrón de cuadrados y rectángulos de diferentes dimensiones. Fuente: elaboración propia. .... 143

Figura 4-20: Realización simultánea de la prueba de rejilla y evaluación cuantitativa del estado de gelificación. Fuente: elaboración propia.....	144
Figura 4-21: Cámara generada para aislar las gotas de los hidrogeles y permitir.....	156
Figura 4-22: Obtención del ángulo de contacto en la interfaz sólido-aire. ....	157
Figura 4-23: Diseño de plataforma para la prueba de colapso usando Inventor. Fuente de elaboración propia.....	159
Figura 4-24: Modelo final de la plataforma en forma de placa de Petri que se utilizará junto con una bioimpresora para realizar la prueba de colapso mediante el control de los diferentes parámetros influyentes en la bioimpresión 3D. Imagen obtenida con el software Inventor. Fuente: elaboración propia. ....	160
Figura 4-25: Medición del área colapsada. Fuente: elaboración propia. ....	160
Figura 4-26: Ensayo de colapso de filamentos. La imagen de la izquierda muestra el hidrogel estándar y la imagen de la derecha muestra el GelMA (5%). Fuente: elaboración propia. ....	161
Figura 4-27: Estudio comparativo de imprimibilidad. Fuente: elaboración propia.....	163
Figura 4-28: Matriz formada por cuadrados y rectángulos de diferentes dimensiones. Imagen obtenida con el software Inventor. Fuente: elaboración propia.....	163
Figura 4-29: Bioimpresión utilizando hidrogel GelMA al 5%. Fuente: elaboración propia. ....	168
Figura 4-30: Deformación del PCL bajo diferentes fuerzas aplicadas. ....	168
Figura 4-31: Diente impreso con PCL.....	169
Figura 4-32: (A) Modelo real. (B) La representación multifísica COMSOL.....	178
Figura 4-33: Respuesta del hidrogel de alginato al 4,0% (p/v) y CaCl <sub>2</sub> al 3,5% (p/v).....	180
Figura 4-34: Viscosidad frente a la velocidad de cizallamiento de los hidrogeles a base de alginato al 3,5%, 4,0% y 5,0% (p/v), todos ellos con un 3,5% de CaCl <sub>2</sub> .....	180
Figura 4-35: Fracción volumétrica en la zona de extrusión de la boquilla de los diferentes hidrogeles para diferentes presiones de entrada. El rojo oscuro representa el hidrogel y el azul oscuro la presencia de aire.....	181
Figura 4-36: Tiempo de extrusión para alcanzar la marca de 3 mm en muestras de hidrogel con 3,5% de alginato con CaCl <sub>2</sub> a una presión de entrada de 950 kPa (a), de hidrogel con 4% de alginato con CaCl <sub>2</sub> a una presión de entrada de 930 kPa (b), y de hidrogel con 5% de alginato con CaCl <sub>2</sub> a una presión de entrada de 750 kPa (c). ....	182
Figura 4-37: Relación entre la presión aplicada por la bioimpresora a la entrada del sistema y el índice de comportamiento al flujo, $n$ , presentado por los biomateriales estudiados. ....	183

Figura 4-38: Relación entre la presión aplicada por la bioimpresora a la entrada del sistema y el índice de consistencia de flujo, $k$ , presentado por los biomateriales estudiados. ....	184
Figura 4-39: Relación entre el tiempo de extrusión del hidrogel y el índice de consistencia, $k$ , presentado por los biomateriales estudiados. ....	185
Figura 4-40: Relación entre el tiempo de extrusión del hidrogel y el índice de comportamiento, $n$ , que presentan los biomateriales estudiados. ....	185
Figura 4-41: Vista 1 del dispositivo patentado titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D .....	201
Figura 4-42: Vista 2 del dispositivo patentado titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D .....	202
Figura 4-43: Vista 3 del dispositivo patentado titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D .....	202
Figura 4-44: Útil especialmente diseñado para la realización de las pruebas de colapso por el dispositivo de la invención. ....	203
Figura 4-45: Útil especialmente diseñado para la realización de las pruebas por el dispositivo de la invención. ....	203
Figura 4-46: Diseño de cubo para impresión 3D donde se aprecian los espacios que se rellenarán con las pastas estudiadas en este trabajo. ....	210
Figura 4-47: Pruebas para rellenar los cubos 3D con las distintas pastas. ....	211
Figura 4-48: Resultados de la difracción de rayos X (DRX) de los polvos de biovidrio .....	212
Figura 4-49: Difractograma FTIR de los polvos de biovidrio .....	213
Figura 4-50: Viscosidad de dos composiciones diferentes estudiadas. ....	214
Figura 4-51: Stress-strain of PLA hueco. ....	216
Figura 4-52: Tensión-deformación de PLA hueco + muestra 3. ....	217
Figura 4-53: Imagen SEM del andamio de referencia con ampliación 200x. ....	218
Figura 4-54: Imagen SEM del andamio SBF de 1 día con ampliación de 3000x. ....	219
Figura 4-55: Imagen SEM del andamio SBF de 3 días con ampliación de 3000x. ....	219
Figura 4-56: Imagen SEM del andamio SBF de 5 días con ampliación de 3000x. ....	220
Figura 4-57: Imagen SEM del andamio SBF de 7 días con ampliación de 3000x. ....	220

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Usos de la impresión 3D en las principales industrias. ....	4
Tabla 1-2: Revisión sobre diferentes tipos de hidrogeles [46]. ....	13
Tabla 1-3: Parámetros obtenidos con el modelo en régimen [60]. ....	19
Tabla 1-4: Elementos fundamentales de la Ingeniería de tejidos [75]. ....	26
Tabla 1-5: Aspectos esenciales de los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [75]. ....	28
Tabla 1-6: Fases de la regeneración ósea [75]. ....	30
Tabla 1-7: Propiedades fundamentales para la fabricación del scaffolds [101]. ....	34
Tabla 3-1: Características principales [154]. ....	59
Tabla 3-2: Tabla con los materiales y equipos necesarios para este paso. ....	60
Tabla 3-3: Concentración de PI según la masa seleccionada. ....	61
Tabla 3-4: Materiales y equipos utilizados en este paso. ....	62
Tabla 3-5: Concentración obtenida de GelMA según el volumen de agente + PI introducidos en el vial de GelMA. ....	62
Tabla 3-6: Concentración obtenida HAMA según el volumen de agente + PI introducidos en el vial de HAMA. ....	62
Tabla 3-7: Protocolo para regular el pH. ....	63
Tabla 3-8: Materiales y equipos utilizados en este paso. ....	63
Tabla 3-9: Materiales y equipos necesarios para este paso. ....	64
Tabla 3-10: Concentración objetivo-obtenida según el volumen de agente seleccionado. ....	64
Tabla 3-11: Materiales y equipos utilizados en este paso. ....	65
Tabla 4-1: Propiedades mecánicas y de regeneración requeridas de un hidrogel apto para estudios de bioimpresión. Fuente: elaboración propia. ....	135
Tabla 4-2: Ejemplo de caracterización de hidrogel utilizando el método de gota sécil. Fuente: elaboración propia. ....	138
Tabla 4-3: Tabla de ejemplo para la prueba de colapso del filamento para CELLINK START, con los datos obtenidos después de los cálculos para cada Cf. Fuente: elaboración propia. ....	140
Tabla 4-4: Caracterización de la imprimibilidad de HAMA 5% usando la evaluación cuantitativa de la prueba del estado de gelificación. Fuente: elaboración propia. ....	142

---

Tabla 4-5: Ejemplo de cálculo para la prueba de rejilla de impresión, donde el hidrogel utilizado fue GelMA 5%. En esta tabla, desde abajo (fila 1) hasta arriba (fila 5), se han incluido los datos de los cuadrados más grandes de la grilla (derecha). Fuente: elaboración propia .....	143
Tabla 4-6: Resultados del ángulo de contacto para hidrogeles estudiados. ....	158
Tabla 4-7: Prueba de colapso de filamentos probada en diferentes hidrogeles.....	161
Tabla 4-8: Resultados del estudio de imprimibilidad. ....	164
Tabla 4-9: Tabla resumen de la diferencia de los valores real y objetivo al realizar la prueba de rejilla. ....	165
Tabla 4-10: Tabla resumen de la diferencia de los valores real y objetivo al realizar la prueba de rejilla.....	167
Tabla 4-11: Prueba de colapso de filamentos probada en los diferentes hidrogeles. ....	167
Tabla 4-12: Composition and pH of the hydrogels used.....	177
Tabla 4-13: Densidad del hidrogel y parámetros de la ley de potencia (ecuación 1).....	180
Tabla 4-14: Parámetros relacionados con la bioimpresión de los hidrogeles.....	182
Tabla 4-15: Parámetros de dos composiciones diferentes estudiadas. ....	214
Tabla 4-16: Tiempos de fraguado de dos composiciones diferentes estudiadas.....	215
Tabla 4-17: Valores medios de las propiedades mecánicas estudiadas en los compuestos de PLA impresos en 3D rellenos de pasta inyectable. ....	216

## ❖ **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano se encuentra en una carrera constante para ampliar los límites de la ciencia y el conocimiento con el objetivo de obtener herramientas que le permitan superar las complicaciones de una forma más eficaz. Por este motivo, y causado por un avance en las tecnologías de fabricación, surgió la impresión 3D. Esta tecnología ha irrumpido en muchos sectores industriales, como en la industria automotriz, aeroespacial o en la medicina.

En el campo de la medicina, la impresión 3D ha supuesto un acercamiento a la generación de modelos con estructura compleja similares a los encontrados en los seres vivos como, por ejemplo:

- Órganos y tejidos.
- Prótesis.
- Implantes anatómicos.
- Dosificación de medicamentos.

El problema de la impresión 3D en la medicina es su limitación con respecto a los materiales usados, debido a que normalmente están fabricados de plásticos o materiales que necesitan ser calentados a temperaturas incompatibles con la viabilidad celular, por lo que su combinación con la Ingeniería de tejidos es compleja.

Debido a la necesidad de imprimir con materiales biocompatibles con la capacidad de albergar células que propicien la regeneración de estructuras biomiméticas, surgió la bioimpresión 3D. Esta tecnología ofrece soluciones muy interesantes para la obtención de tejidos y órganos para la medicina regenerativa, mediante la combinación de células, factores de crecimiento, biomateriales y la tecnología de impresión 3D para fabricar construcciones biológicas con la forma deseada.

La bioimpresión 3D se basa en la deposición de biotintas controlando diferentes factores externos para obtener y propiciar la mayor viabilidad celular posible.

Tras el desarrollo de las tecnologías de impresión aditiva, el sector de la odontología comenzó a utilizarlas de forma asidua en los últimos años. La Federación Dental Internacional (FDI) asegura que la salud oral es primordial para el mantenimiento de la salud general y el bienestar. Una dentición sana y funcional es un indicador clave de la calidad de vida.

En este proyecto hemos dirigido nuestros esfuerzos a estudiar y descubrir el potencial de las tecnologías de impresión aditiva en combinación con programas de cómputo especializados de tipo computer-aided design (CAD) para fabricar estructuras tridimensionales biomiméticas. Se ha desarrollado una nueva metodología de caracterización de hidrogeles en base a sus propiedades biológicas y a su capacidad de generar estructuras biomiméticas aplicada al sector sanitario para solventar problemas cotidianos pero que a la vez que empeoran en gran medida la calidad de vida de las personas. Con este objetivo se ha estudiado un método desarrollado de impresión 3D de diferentes materiales sintéticos simulando la fabricación de un scaffold con forma de diente. Posteriormente, se han fabricado y caracterizado diversos hidrogeles híbridos para, combinándolos con la tecnología de fabricación de scaffold, obtener bioimpresiones que favorezcan la regeneración

del hueso, con la finalidad de lograr la reconstrucción de un diente o formas más complejas que solventen problemas tales como la pérdida del hueso maxilofacial.

## 1.1 Impresión 3D

El término de impresión 3D apareció en el año 1984 con la aparición de la impresora 3D. Se basa en una tecnología de fabricación por adición, lo que permite crear objetos tridimensionales sólidos partiendo de un modelo digital [1].

El 16 de julio de ese año, Alain Le Méhauté, Oliver de Witte y Jean Claude André presentaron una patente para el proceso de estereolitografía que les permitió conseguir piezas de resina epoxi.

Años más tarde, S. Scott Crump desarrolló la técnica denominada Fused Deposition Modeling (FDM), que consiste en la creación de objetos 3D por la superposición de capas de material fundido. Este método, sumado a que en el año 2005 el Dr Bowyer creó la primera máquina de impresión 3D, permitió la evolución y desarrollo de esta tecnología, al reducir los costes y situarla como una técnica puntera y con un potencial de evolución increíble en muchos campos diferentes.

La principal diferencia entre la fabricación tradicional y la impresión 3D es cómo se forman los objetos. La fabricación tradicional se basa en el procedimiento de forjado de los componentes y montaje, lo que conlleva gran esfuerzo, tiempo, energía y en algunos casos un coste sustancial.

Los métodos de impresión 3D actuales pueden producir piezas en una sola operación, fabricándolas totalmente montadas o, en su defecto, facilitando el proceso de montaje posterior[2]. Además, los objetos quedan modelados e impresos con un alto grado de control estructural y espacial, creando y optimizando estructuras que no se puedan construir con los procesos tradicionales.

Debido a sus excepcionales capacidades de fabricación, esta tecnología tiene amplias aplicaciones en diferentes campos [3], [4]:

Tabla 1-1: Usos de la impresión 3D en las principales industrias.

SECTOR DE LA INDUSTRIA	USOS DE LA IMPRESIÓN 3D
Automotriz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producir piezas de repuestos</li> <li>• Crear mecanismos de producción</li> </ul>
Aeroespacial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crear piezas complejas</li> </ul>
Salud	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Planificación de operaciones</li> <li>• Desarrollo de implantes y prótesis</li> <li>• Bioimpresión de tejidos</li> <li>• Formación médica</li> </ul>
Venta minorista	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Juguetes personalizados</li> <li>• Uso en reparaciones sencillas</li> </ul>

En la actualidad se está extendiendo su uso en la fabricación de prótesis médicas por la alta adaptabilidad de cada pieza creada a las características exactas del paciente [5]. La integración de la impresión 3D y el biomimetismo promueven mejoras en la fabricación de materiales y estructuras funcionales, lo que conducirá a diversos avances en aplicaciones de la industria biomédica [6], [7].

### 1.1.1 Materiales utilizados en la impresión 3D

Aunque la impresión 3D se encuentre en una etapa de desarrollo y evolución, ha permitido un gran avance en la ciencia, ofreciendo una herramienta relativamente fácil de usar que permite el desarrollo de artículos de carácter científico, e incluso de prototipos y patentes. Las impresoras 3D son capaces de imprimir objetos o herramientas de forma rápida y sin prácticamente limitaciones de forma. Curiosamente, desde el surgimiento de la primera impresora 3D en el año 2005, se ha conseguido un aumento del 7% de solicitudes en la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) con respecto al año anterior, es decir, un incremento del 2,3 % sobre el índice medio anual de aumento en el total de solicitudes de patentes presentadas desde 1995 [8].

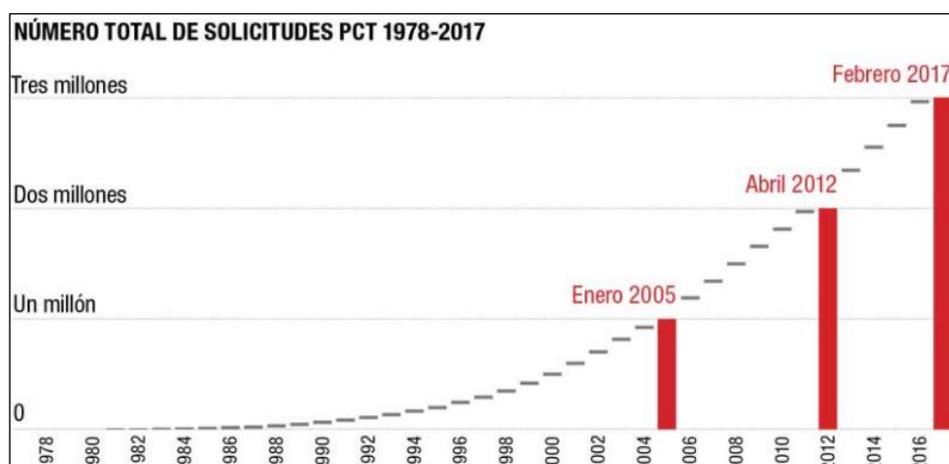


Figura 1-1: Número de solicitudes registradas en la OEPM [9].

Una de las principales posibilidades que plantea la impresión 3D es su uso con multitud de materiales, de los cuales los más comunes son los siguientes:

- Acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). Es un material compuesto derivado del petróleo con elevada resistencia y dureza. Es un copolímero obtenido de la polimerización del estireno y el acrilonitrilo en presencia de polibutadieno, resultando de la combinación de los tres monómeros, y originando un plástico que se presenta en una gran variedad de grados que dependen de las proporciones utilizadas de cada uno. Además, presenta estabilidad a altas temperaturas y resistencia a ataques químicos. Es reciclable pero no biodegradable [10].
- Ácido poliláctico (PLA). Polímero biodegradable derivado del ácido láctico producido mediante biotecnología bacteriana, resultando en un compuesto inodoro, claro y brillante. Se crea a partir de recursos naturales renovables. Se puede formular para ser rígido o flexible, y puede ser copolimerizado con otros materiales. Es muy utilizado en la medicina, pues es muy bien asimilado por el organismo [11].
- Polipropileno (PP). Ampliamente utilizado para la producción de plásticos moldeados debido a la excelente combinación de propiedades que presenta como peso ligero, resistencia al impacto y capacidad para ser biocompatible, por lo que se usa en medicina e ingeniería tisular [12].

- Polipropileno fumarato (PPF). Es usado para la formación de scaffolds por su capacidad para crear andamios fuertes o flexibles según demanda para su combinación con células [13].

En este trabajo nos centraremos en el uso del PLA por su biocompatibilidad con el organismo.

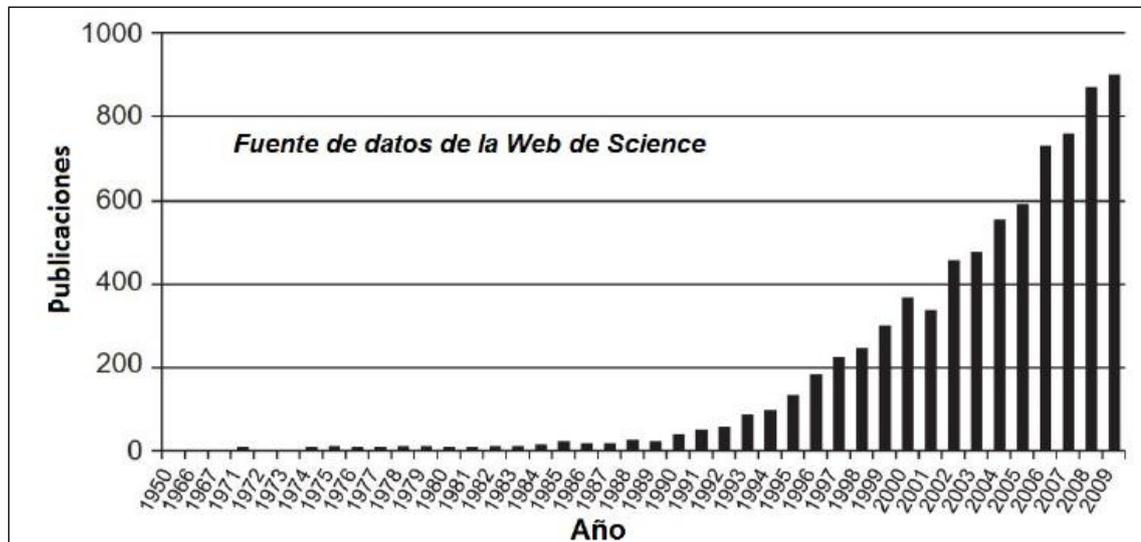


Figura 1-2: Número de publicaciones publicadas acerca del PLA [14].

Existe una variedad más amplia de materiales que pueden ser procesados mediante impresión 3D, pero son menos extendidos:

- Acetato de polivinilo (PVA). Plástico biodegradable que se disuelve en agua y es propenso a absorberla.
- Polietileno de alta densidad (HDPE). No es reciclable.
- Tereftalato de polietileno (PET). Permite su cristalización formando piezas transparentes y muy resistentes.
- Filamentos elásticos como pueden ser FILAFLEX (requiere velocidad de impresión muy baja), SOFT PLA (filamento muy gomoso usado para elaborar calzados) o BENDLAY (además de ser flexible es transparente y puede estar en contacto con productos alimenticios).
- Filamentos constituidos de materiales básicos, como pueden ser madera, cerámica, acero, oro...

### 1.1.2 Limitaciones de la impresión 3D

Las principales limitaciones que actualmente tiene la impresión 3D y que frenan un poco su desarrollo y aplicación en algunos sectores como puede ser el industrial para la fabricación en serie son:

- Precio: se está viendo en los últimos años un incremento de fabricantes que ofertan impresoras 3D a un precio menor de los 1.000 euros, pero aún se considera una tecnología cara para las prestaciones que ofrecen [15].

- Tiempo de fabricación: el tiempo de impresión o el tiempo de fabricación a nivel industrial es muy elevado, incompatible con los tiempos de fabricación del mercado [15]. Aunque también es cierto que en su origen la impresión 3D no ha surgido para la producción en serie, por lo que debe desarrollarse y evolucionar.
- Conocimiento: al tratarse de una tecnología tan nueva, presenta limitaciones en el conocimiento de los usuarios respecto a programas informáticos de diseño 3D.

Otros autores, además de las anteriores limitaciones, exponen otras como pueden ser las geométricas o de espacio de impresión, costes de fabricación, materiales y limitaciones éticas [16], [17].

## 1.2 Bioimpresión 3D

Como forma de la tecnología de impresión 3D, la bioimpresión fabrica piezas biomédicas con células, tejidos, factores de crecimiento, biomateriales y otros materiales relacionados con la biología.

La bioimpresión 3D es un proceso de fabricación de tejidos funcionales y órganos a partir de biomateriales por medio de un software computarizado que genera un modelo 3D. El proceso consiste en la adición de capas sucesivas de biomaterial, con la dificultad añadida de que, al contener células vivas en su matriz, dicha adición de capas debe realizarse en unas condiciones que aseguren la supervivencia y proliferación de las células [18].

En 2008 surgió la primera bioimpresora que constaba de dos cabezales, de los cuales uno de ellos se encargaba de depositar el hidrogel cargado de células del tejido a fabricar y el otro fabricaba el soporte o andamio. Aunque hoy en día la técnica se ha mejorado, la base en la que se fundamenta la tecnología actual es la misma: dejar que las células se vayan proliferando en el interior del hidrogel bioimpreso para crear el tejido deseado.

Esta técnica ofrece multitud de mejoras respecto a la ingeniería de tejidos, ya que permite fabricar estructuras tisulares de geometrías complejas con elevada precisión y diversidad de materiales. En general, el objetivo final de la bioimpresión de hidrogeles cargados de células es conseguir un tejido vascularizado con funciones biológicas intactas, con el fin de reparar con precisión lesiones o sustituir tejidos y órganos envejecidos humanos [19].

El proceso de bioimpresión es similar al de impresión 3D con ciertas modificaciones. En primer lugar, se digitaliza el tejido u órgano utilizando alguna tecnología de procesamiento de imágenes (resonancia magnética, ultrasonido...) con el objetivo de generar un modelo 3D. Posteriormente, se convierte ese modelo digital en un archivo con formato Standard Triangle Language (STL) o, en su defecto, el tipo de archivo que lea la bioimpresora que vayamos a usar.

Por último, la parte biológica consiste en obtener y cultivar las células. Este paso es clave, ya que requiere escoger las biotintas adecuadas para emular el tejido que se va a fabricar. Más adelante se hablará de la importancia de las biotintas tanto en su selección a nivel biológico como estructural.

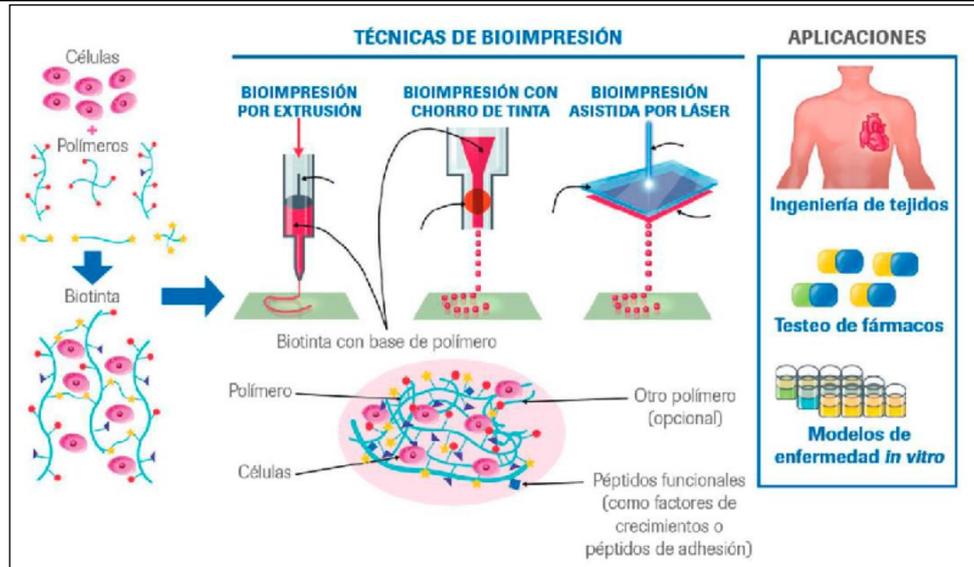


Figura 1-3: Importancia de la bioimpresión 3D. Integración celular para crear la biotinta y así conseguir una mejor adhesión celular [20].

Una vez terminada la impresión del tejido o del órgano se mantiene en la bioimpresora para su maduración antes de poder ser utilizado o estudiado [21]. Algunos autores se centran en el uso de cámaras climáticas, ya que, como exponen en sus trabajos, uno de los principales retos científicos es la generación de materiales que mantengan un equilibrio entre las condiciones para imprimir células con una baja tasa de mortalidad y la generación de estructuras lo suficientemente fuertes [22], [23]. Para ello se utilizan cámaras climáticas que permiten conseguir ambientes propicios para la viabilidad celular post-impresión, consiguiendo ambientes estériles, estancos y con unas condiciones climáticas idóneas (estabilización de la temperatura a 37°C, humedad relativa del 95% y 5000 ppm de CO<sub>2</sub>) [23].

Para entender la tecnología de bioimpresión se hace necesario abordar los conceptos de biomateriales, biocompatibilidad y biofabricación.

Un biomaterial es un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar un tejido u órgano, además de alguna función del cuerpo [24]. Los biomateriales son fundamentales para la ingeniería de tejidos, por ser los materiales estructurales de los andamios [25].

La biocompatibilidad hace referencia a la capacidad del material para responder de forma adecuada al medio biológico en el cual es utilizado [26]–[29]. Refleja la naturaleza y el grado de interacción entre los biomateriales y el tejido huésped [30], [31].

La evaluación de la biocompatibilidad y biofuncionalidad de los materiales se realiza mediante métodos basados en la evaluación de la citotoxicidad, mutagénesis y / o carcinogénesis y función celular [28].

La biofabricación es la generación automatizada de productos biológicamente funcionales con organizaciones estructurales a partir de células vivas, moléculas bioactivas, biomateriales, agregados celulares y células [32]. El término de biofabricación se introdujo en 1994 [33], y se utiliza

en muchas tecnologías como la biotecnología o la biología sintética. A diferencia de la ingeniería tisular clásica, la biofabricación consiste en construir elementos tridimensionales capa por capa.

Los avances en las técnicas de bioimpresión hacen que podamos vislumbrar en un futuro cercano la impresión en vivo de órganos totalmente funcionales. En marzo de 2011 Anthony Atala demostró que no estamos tan lejos de ese futuro, ya que consiguió en una conferencia bioimprimir un órgano, concretamente un riñón en vivo y en directo. Aunque no era funcional, estaba fabricado de tejido humano.

Por lo tanto, nos encontramos ante el reto de investigar nuevas metodologías, biotintas y técnicas de impresión eficaces.

### 1.2.1 Técnicas de bioimpresión

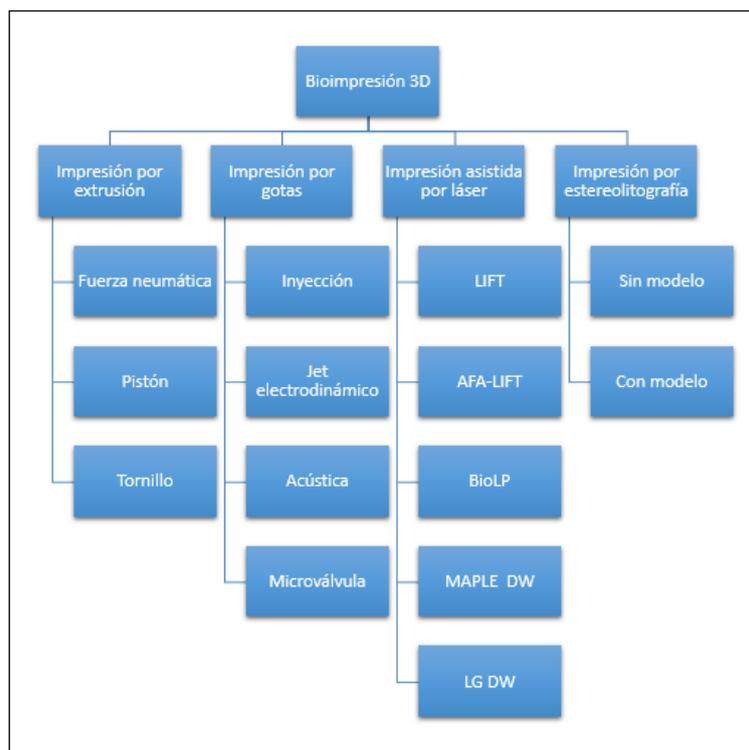


Figura 1-4: Diferentes técnicas de bioimpresión. Fuente propia.

- Impresión por extrusión [18]: técnica más estudiada y empleada hasta la fecha, con una viabilidad celular entre el 40%-95%. Una jeringa con la biotinta en el interior se carga en un orificio estéril donde una fuerza neumática o mecánica hacen que se transfiera el material como un flujo continuo.

Esta técnica presenta múltiples ventajas como es la escalabilidad, y es muy adecuada para biotintas de alta viscosidad y con una alta concentración celular.

El principal inconveniente es que la variabilidad de biotintas que se pueden utilizar es baja, ya que estas deben tener la propiedad de adelgazamiento por cizalladura.

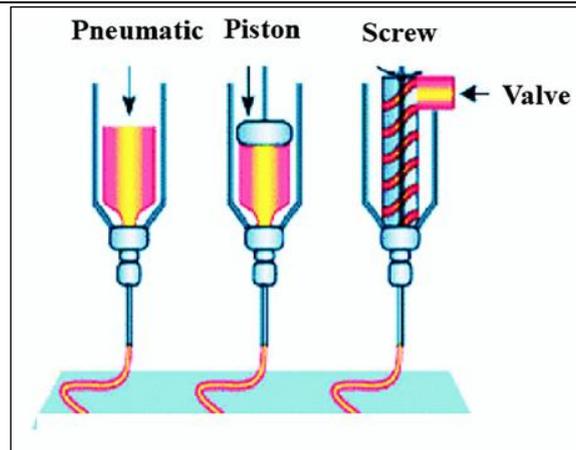


Figura 1-5: Imagen explicativa de las tres formas de impresión por extrusión [19].

- Bioimpresión por gotas [34]: esta técnica se basa en la transferencia del material en forma de gotas sobre un sustrato. Se utilizan materiales de baja densidad, y en general el proceso de impresión es de bajo costo, alta viabilidad celular y velocidad. La más interesante para nuestro trabajo es la denominada por inyección de tinta.
  - Bioimpresión por inyección: técnica de escala microscópica y que no necesita contacto, en la que se sustituyen los cartuchos de tinta por biotintas con células suspendidas en su interior. Es la que más se emplea en aplicaciones médicas.

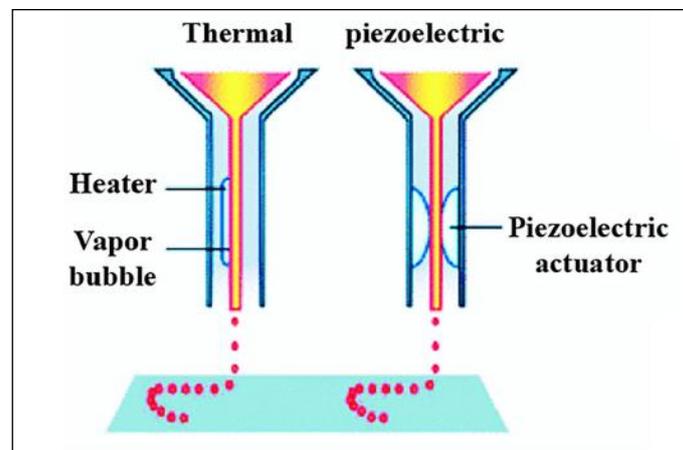


Figura 1-6: Imagen explicativa de la impresión por gotas [19].

- Impresión por estereolitografía [6], [35]: es una de las técnicas que más tiene que evolucionar, ya que es de las más recientes. Consiste en una resina de fotopolímeros que son irradiados por luz, generalmente ultravioleta, controlada por ordenador. Estos fotopolímeros sensibles a la luz, al ser irradiados, absorben fotones y se excitan polimerizando capa a capa. Gracias a esta tecnología se consigue obtener la máxima resolución dentro de la bioimpresión sin necesidad de boquillas.

Presenta dificultades al usar radiación ultravioleta, ya que puede provocar lisis celular debido al daño generado en el ADN.

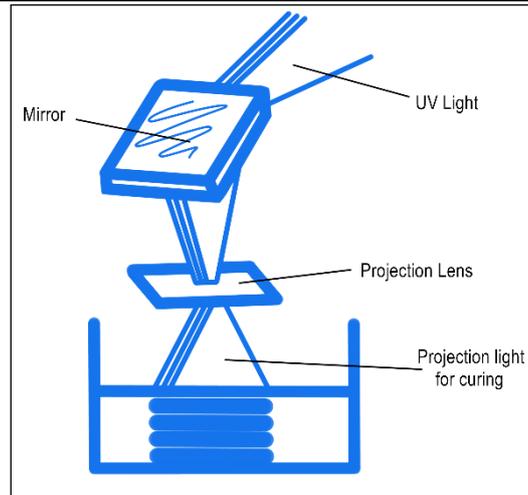


Figura 1-7: Técnica de bioimpresión por estereolitografía. Fuente propia.

- Bioimpresión asistida por láser [18], [36], [37]: en los últimos años y, tras diversos avances, se está introduciendo su aplicación en el campo de la ingeniería tisular mediante el empleo de materiales biocompatibles.

Es un proceso sin contacto del material que emplea la energía de un láser junto con biotintas con células suspendidas, y es controlado por diseño computacional. Se basa en una fuente láser con un haz pulsado o continuo, un sistema de enfoque y dos sustratos coplanarios. En función de la fuente láser y de los materiales empleados existen diferentes técnicas de impresión.

Posee la ventaja de tener una boquilla con estructura abierta que genera menos daño a las células, consiguiendo tasas de supervivencia celular superior al 95%.

Las limitaciones que tiene es su elevado coste y tiempo de impresión.

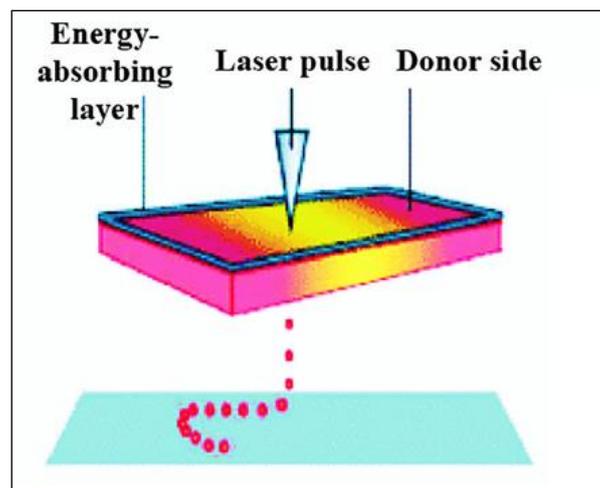


Figura 1-8: Técnica de bioimpresión asistida por láser [19].

## 1.2.2 Materiales usados en la bioimpresión 3D (biotintas)

Todos los materiales usados en bioimpresión deben ser biocompatibles y capaces de unirse al tejido adyacente (bioactivo) [38]. Las características más importantes a tener en cuenta son, por una parte, la biodegradación y posterior reabsorción por parte del organismo, ya que esto va a provocar que el tejido óseo se forme y reemplace al biomaterial, y, por otro lado, la capacidad del biomaterial para estimular y guiar a las células progenitoras a su diferenciación en osteoblastos, facilitando de esta manera la formación de hueso nuevo [39].

Los materiales imprimibles que cumplen las condiciones nombradas reciben el nombre de biotintas, las cuales deben tener unas características concretas para lograr buenos resultados en el proceso de bioimpresión [18]:

- Características reológicas de pseudoplasticidad que favorecen la imprimibilidad.
- Viscoelasticidad que ayuda a proteger a las células de los esfuerzos cortantes.
- Hidratación para favorecer la difusión de nutrientes.
- Capacidad de gelificación rápida para lograr estructuras firmes.
- Viscosidad para facilitar la encapsulación celular
- Biocompatibilidad mediante el aporte de los factores y nutrientes necesarios para asegurar una elevada viabilidad celular.

Las biotintas pueden clasificarse, en términos generales, en materiales basados en andamios y materiales sin andamios [40], [41].

➤ Materiales basadas en andamios:

- Hidrogeles: material más utilizado en las tecnologías de bioimpresión de inyección de tinta, asistida por láser y de extrusión. El concepto de hidrogel ha atraído más atención en los últimos años en el campo de la ingeniería tisular por su capacidad para crear microambientes de cultivo celular 3D, consiguiendo múltiples ventajas relacionadas con su similitud estructural con la matriz extracelular natural (MEC). En este trabajo usaremos los hidrogeles por su creciente uso en investigación y por las ventajas que presentan [42], [43].
- Biotinta basada en una matriz descelularizada: se emplea en la bioimpresión basada en extrusión. Se pueden fabricar construcciones personalizadas específicas para cada tejido, pero resulta bastante costoso y suele tener poca resistencia mecánica [44].
- Microportadores: construcciones porosas de materiales naturales o sintéticos utilizados en la bioimpresión basada en la extrusión. Facilitan la adhesión, el crecimiento y la maduración de las células con una resistencia mecánica aceptable. Suele dar problemas de imprimibilidad [45].

Tabla 1-2: Revisión sobre diferentes tipos de hidrogeles [46].

Hidrogel	Ventajas	Desventajas	Tipo de célula utilizada
Agarosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Buena resistencia mecánica</li> <li>Económico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pobre adhesión celular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células madre neurales humanas</li> </ul>
Chitosán	<ul style="list-style-type: none"> <li>Propiedades antibacterianas y antimicóticas altamente biocompatibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pequeñas construcciones</li> <li>Gelificación retardada</li> <li>Propiedades mecánicas pobres</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células madre neurales humanas</li> <li>Célula madre mesenquimales derivadas de adipocitos humanos</li> </ul>
Alginato	<ul style="list-style-type: none"> <li>Buenas características de resistencia</li> <li>Rápida gelificación</li> <li>Económicas</li> <li>Estabilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mala adhesión celular</li> <li>Problemas de obstrucción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células madre neurales humana</li> </ul>
Colágeno 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fácil adhesión celular</li> <li>Buena imprimibilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proceso de gelificación lento</li> <li>Propiedades mecánicas deficientes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células madre derivadas de hueso humano y líquido amniótico</li> <li>Células madre mesenquimales</li> </ul>
Fibrina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promueve la angiogénesis</li> <li>Propiedades de gelificación favorables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Preocupaciones inmunológicas</li> <li>Riesgo de contaminación microbiana</li> <li>Estabilidad mecánica deficiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células epiteliales humanas</li> </ul>
Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promueve la adhesión celular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Propiedades mecánicas inestables/frágiles/débiles, pocas capacidades sin combinar con otros materiales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células progenitoras cardíacas humanas</li> </ul>
Ácido hialurónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vital para el desarrollo de la MEC</li> <li>Promueve la angiogénesis y la proliferación celular</li> <li>Rápida gelificación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rápida degradación biológica</li> <li>Poca estabilidad mecánica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células progenitoras cardíacas humanas</li> <li>BMSCs humanas</li> </ul>
Matrigel	<ul style="list-style-type: none"> <li>Produce construcciones mecánicamente fuertes con alta vitalidad celular</li> <li>promueve la diferenciación celular y la integración con el tejido del huésped</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cuestiones de obstrucción hechas a partir de células tumorales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células epiteliales humanas</li> </ul>

- Materiales sin andamios: se utilizan para imprimir construcciones celulares muy densas sin ningún tipo de hidrogel o matriz de soporte. Se usa la bioimpresión basada en la extrusión en medios de crecimiento adecuados que facilitan las interacciones celulares y la deposición de la matriz extracelular. El proceso es complejo y dificulta la extracción de agregados celulares [47], [48].

### 1.2.2.1 Hidrogeles

Un hidrogel es una matriz polimérica tridimensional hidrófila con la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y simular tejidos biológicos [49].

Las propiedades fisicoquímicas de los polímeros ayudan a determinar las posibles funciones y características de los hidrogeles. Esas propiedades se basan en varios factores [50]:

- Naturaleza química del monómero.
- Método de síntesis de polímeros.
- Peso molecular.
- Entorno de reacción.
- Estructura macromolecular.
- Fuerza de los enlaces covalentes.
- Rigidez.
- Fuerza intermolecular dentro de la cadena del polímero.

Los hidrogeles más usados se pueden dividir en [51]:

- Hidrogeles naturales: tienen origen natural, como la gelatina y el colágeno.
- Hidrogeles sintéticos: derivan de polímeros sintéticos, como las poliamidas y el polietilenglicol. El número de investigaciones que usan este tipo de materiales ha ido incrementando en los últimos años, aunque están cobrando mucha importancia las hibridaciones, con mayor vida útil, resistencia del gel y capacidad de absorción del agua, como pueden ser el GELMA (gelatina con metacrilato) o el ColMA (colágeno con metacrilato).

Son materiales osteoconductivos, y facilitan la adhesión celular, la integración matricial y la angiogénesis, además de ser reabsorbibles.

Deben presentar una serie de propiedades para que sean aptos para la regeneración [52], [53]:

- No citotóxicos y no inmunogénicos.
- Osteoinductivos, osteoconductivos, osteogénicos y osteocompatibles.
- Mimetizar la matriz extracelular para conseguir la adhesión celular, la propagación y la diferenciación osteogénica en el lugar donde se implante.

- 
- Degradables o hidrolizables por las enzimas endógenas.
  - Estables estructuralmente y con fuerza mecánica.
  - Con porosidad adecuada (con el objetivo de permitir la interacción celular, el control de la liberación de factores bioactivos y el intercambio nutricional y de oxígeno).

Dentro de las propiedades a modular en los hidrogeles encontramos:

- Propiedades mecánicas: si la densidad se vuelve muy alta provoca que la velocidad de difusión disminuya.
- Porosidad: factor importante para asegurar el transporte de nutrientes y oxígeno. A mayor rigidez conseguiremos menos niveles de porosidad.
- Estabilidad: factor relevante para mantener la función y estructuras originales hasta que se consigue la regeneración tisular.
- Adhesión celular: factor clave para que las células se diseminen, proliferen y se diferencien para generar la arquitectura del tejido.
- pH y temperatura.
- Degradación: la degradación puede proporcionar espacio para mejorar la proliferación celular y para que los vasos sanguíneos se infiltren, provocando una mejor regeneración tisular. Este factor depende a su vez de la densidad de reticulación, difusividad del líquido, pH, temperatura...

### **1.2.3 Caracterización de los hidrogeles. Imprimibilidad y propiedades reológicas**

La reología se basa en el estudio del flujo, es decir, de la deformación y el movimiento, en nuestro caso de fluidos no newtonianos. Es una propiedad a tener en cuenta, ya que indica la deformación que tiene el fluido al momento que se le aplica una fuerza [54].

Un fluido no-newtoniano es aquel que no muestra una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de cizalladura. La viscosidad varía con el gradiente de velocidad aplicado [54].

La reología es ampliamente utilizada como método de análisis y herramienta de control de calidad. Para ello se utiliza el índice de fluidez, la viscosidad y la tensión superficial. Además, gracias a los valores que proporciona este estudio, se pueden obtener números adimensionales muy importantes para caracterizar un fluido y poder fijar patrones de flujo como la temperatura, velocidad y presión.

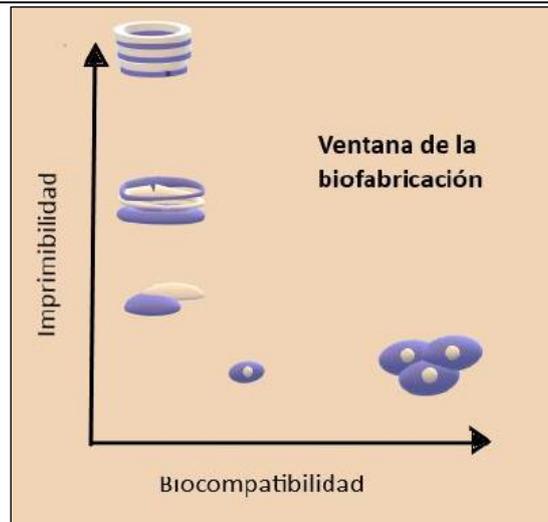


Figura 1-9: Ventana de imprimibilidad [18].

- **Índice de fluidez (MFI):** propiedad reológica utilizada para caracterizar la calidad de un polímero en estado fluido.
- **Viscosidad:** medida cuantitativa de la resistencia de un fluido al movimiento. Determina la velocidad de deformación del fluido que se produce cuando se le aplica un esfuerzo cortante [55].

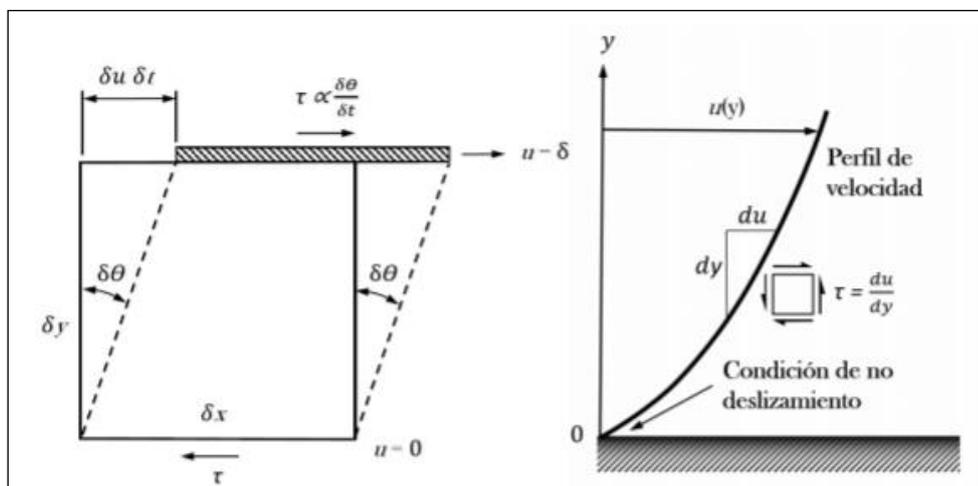


Figura 1-10: Si sometemos a una partícula fluida un esfuerzo cortante de valor  $\tau$  en un plano, el ángulo  $\delta\theta$  de la deformación aumentará continuamente [55].

Los fluidos no newtonianos se caracterizan porque la resistencia a la deformación varía con el esfuerzo cortante.

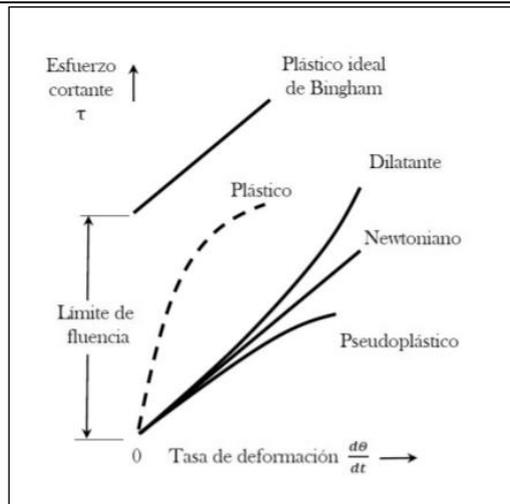


Figura 1-11: Diferencia de comportamiento reológico de cuatro materiales no newtonianos y uno newtoniano. Relación del esfuerzo cortante y la velocidad de deformación en diferentes materiales viscosos [56].

- **Tensión superficial:** un líquido formará una interfase con un segundo líquido o un gas al no ser capaz de expandirse libremente. La magnitud de la fuerza de tensión por unidad de longitud de una línea en la interfase se llama tensión superficial y se mide en N/m. Se puede definir como la energía necesaria para reducir el área de una superficie de fluido [55], [57].

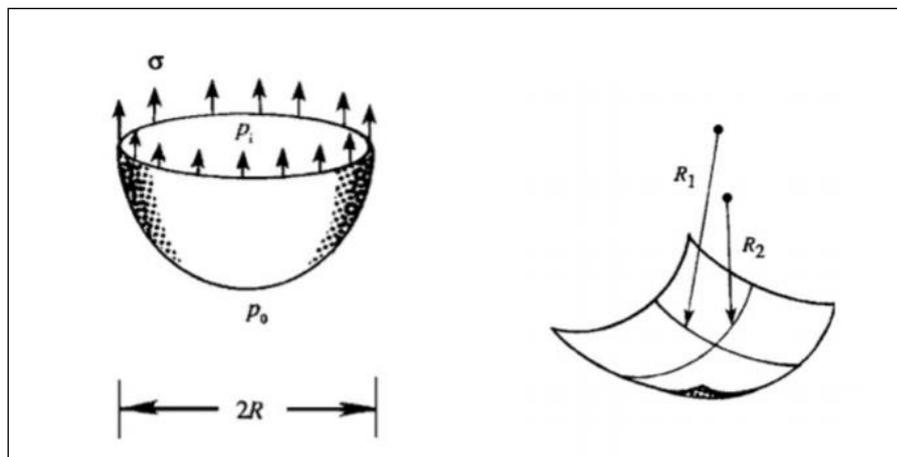


Figura 1-12: En la primera figura se puede ver la sección de una gota esférica con las fuerzas de tensión superficial y en la segunda imagen la interfase con radios de curvatura  $R_1$  y  $R_2$  a lo largo de direcciones ortogonales. Hacen referencia a interfaces curvadas [58].

- **Números adimensionales:** se utilizan para comparar fenómenos físicos donde intervienen magnitudes ya mencionadas como la velocidad ( $v$ ), la densidad ( $\rho$ ), la longitud ( $d$ ), la viscosidad ( $\mu$ ) o la tensión superficial ( $\gamma$ ).
  - **Número de Reynolds:** estudia el comportamiento viscoso de un fluido y depende de la geometría del flujo.

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (1)$$

- **Número de Weber:** representa el cociente entre las fuerzas inerciales y las fuerzas de tensión superficial de un fluido [58]. Si el valor es pequeño, la tensión superficial es muy importante en la caracterización del material.

$$We = \frac{\rho v^2 d}{\gamma}$$

(2)

- **Número de Ohnesorge:** relaciona las propiedades físicas del líquido y el tamaño de la gota de forma independiente a la velocidad. Si el valor obtenido es muy grande entonces nos indica que las fuerzas de viscosidad son tan elevadas que impedirán la separación de una gota del resto del líquido [55].

$$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re} \quad (3)$$

- **Número de Bond:** relaciona las fuerzas gravitatorias con las de la tensión superficial. Si este número adimensional es elevado, los efectos que produce la tensión superficial son despreciable [55].

$$Bo = \frac{\Delta \rho g d^2}{\gamma} \quad (4)$$

- **Número de Worthington:** relaciona el volumen de una gota que sobresale de una aguja con el volumen teórico que puede ser sostenido por esa aguja. Es utilizado para analizar los resultados de la medida de la tensión superficial [59].

$$Wo = \frac{\Delta \rho g V_d}{\pi \gamma D_n} \quad (5)$$

Donde:

$D_n$  es el diámetro de la aguja y  $V_d$  es el diámetro de la gota.

Para definir los parámetros fundamentales de la reología se usa el modelo de placas paralelas que se muestra en la Figura 13. Las placas están separadas por una distancia  $h$  (gap) y entre ambas placas se encuentra la muestra.

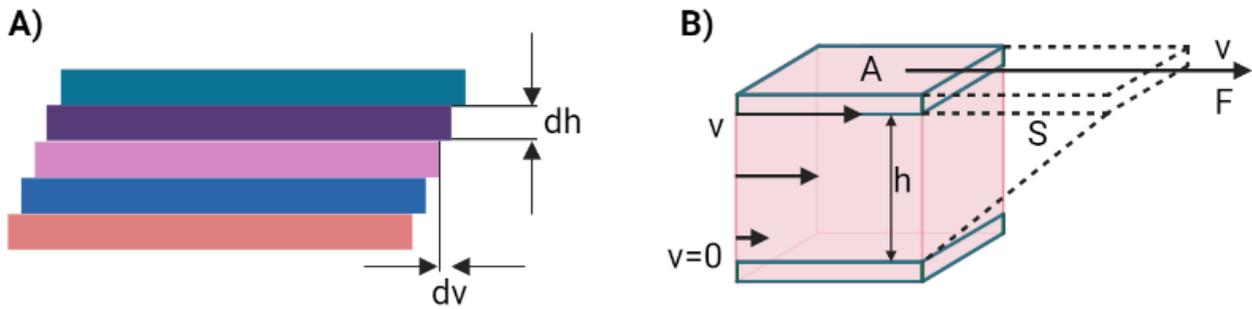


Figura 1-13: a) Velocidad de corte laminar en la representación de capas de fluido. b) Modelo de placas paralelas donde F es la fuerza aplicada, A es el área de la placa, S el desplazamiento de la placa, v la velocidad y h la distancia entre placas o gap. Fuente propia.

Tabla 1-3: Parámetros obtenidos con el modelo en régimen [60].

Tensión de corte [Pa]:	$\tau = \frac{F}{A}$
Deformación de corte [%]:	$\gamma = \frac{S}{h}$
Velocidad de corte [1/s]:	$\dot{\gamma} = \frac{dy}{dt} = \frac{v}{h}$

Para determinar los parámetros del modelo que ajuste el comportamiento reológico de un determinado material se puede aplicar una deformación de corte oscilatorio y analizar la evolución de la resistencia al movimiento de rotación.

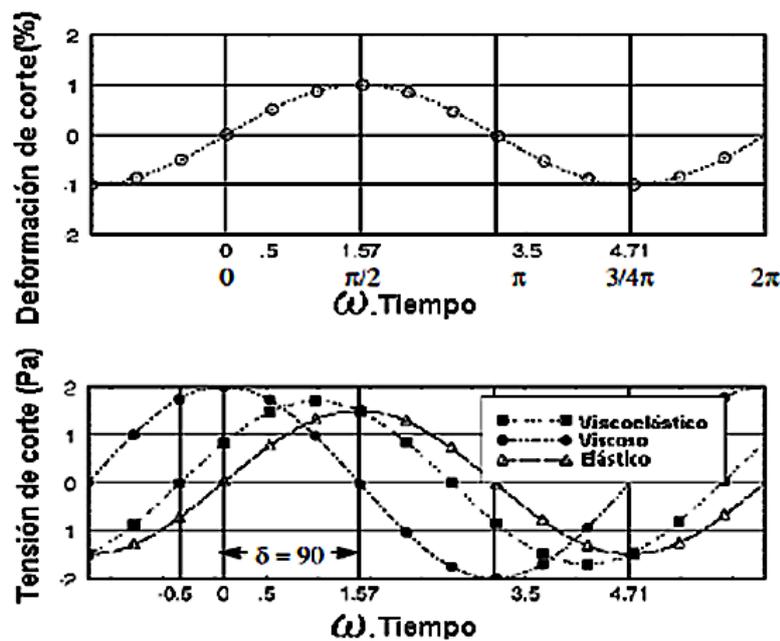


Figura 1-14: Comparación entre la deformación porcentual y tensión aplicada sobre un material elástico (con un desfase de 0º), viscoso (con un desfase de 90º) y viscoelástico, en función de  $\omega$ .tiempo [61].

De esta forma, si representamos módulo de almacenamiento  $G'$  y el módulo de pérdida  $G''$  en función de la frecuencia, se puede distinguir entre diferentes comportamientos de material, como se muestra en la Figura 15 [62].

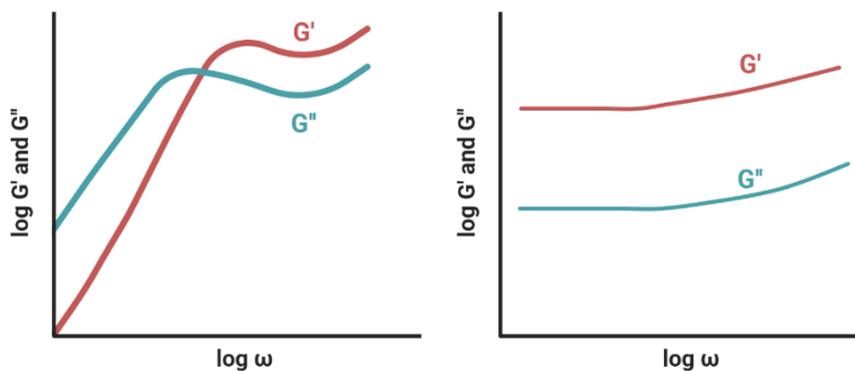


Figura 1-15: Módulos de pérdida y de almacenamiento vs. Frecuencia angular. Fuente propia.

Como se ha indicado en la bioimpresión 3D y, más concretamente, en la elección de los hidrogeles, los dos parámetros claves que deben estar en equilibrio son la imprimibilidad y la biocompatibilidad. En muchas ocasiones estas variables se influyen una a la otra debido a que formular un hidrogel replicando la viscosidad del tejido origen limita en muchas ocasiones la actividad biológica [63]

Algunos de los parámetros más estudiados que juegan un papel clave en la viabilidad celular y dependen directamente de la imprimibilidad deseada son la viscosidad del material (oposición del material al fluir por el tubo) y el tamaño de la boquilla de impresión [64]

En el estudio de la viscosidad, un comportamiento ideal y, por lo tanto, buscado para un hidrogel empleado en bioimpresión, es el denominado comportamiento *shear thinning* o, lo que es lo mismo,

que el fluido sea no-Newtoniano y presente una viscosidad no constante y que disminuye conforme aumenta la tasa de deformación  $\dot{\gamma}$ . De esta forma, se favorece la viabilidad celular durante el proceso de bioimpresión.

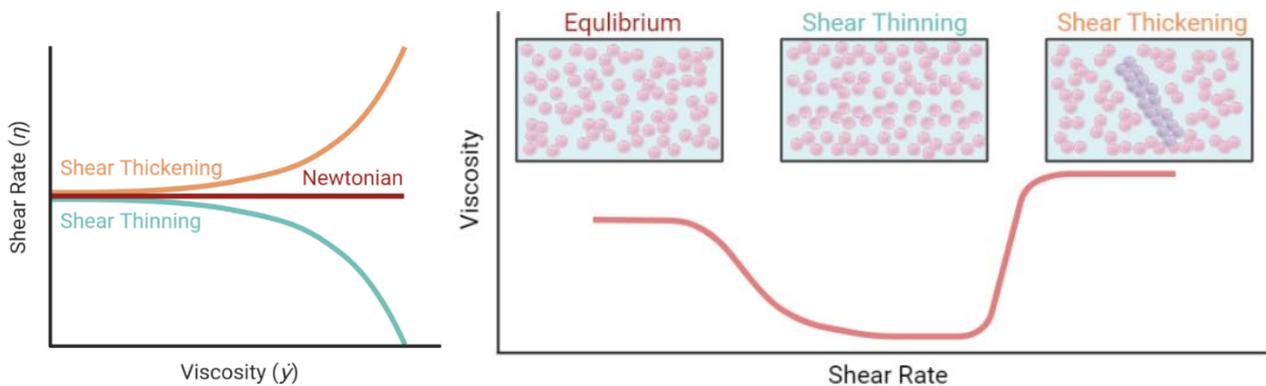


Figura 1-16: Viscosidad  $\mu$  de fluidos Newtonianos y no-Newtonianos vs. la tasa de deformación  $\dot{\gamma}$ . Fuente propia.

### 1.2.3.1 Medidas del ángulo de contacto

Es un parámetro muy utilizado para caracterizar las propiedades de hidrofiliicidad, humectación y biocompatibilidad de los materiales. Consiste en realizar pruebas de tensión superficial sobre las matrices, a partir de mediciones del ángulo de contacto de la gota del material a medir y la superficie de apoyo. La expresión que liga el ángulo de contacto de un líquido sobre un sólido es:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_S - \gamma_{S/L}}{\gamma_L} \quad (6)$$

Donde:

( $\gamma_S$ ) es la tensión superficial del sólido, ( $\gamma_L$ ) es la tensión superficial del líquido y ( $\gamma_{S/L}$ ) es la tensión superficial de la interfaz sólido-líquido.

Mediante la expresión anterior se interpreta que una disminución del ángulo de contacto ( $\cos \Theta$  aumenta, aumentando la humectación) puede conseguirse con un aumento de la tensión superficial del sólido ( $\gamma_S$ ), con una disminución de la tensión superficial del líquido ( $\gamma_L$ ), con una disminución de la tensión interfacial sólido/líquido ( $\gamma_{S/L}$ ), o con una adecuada combinación entre estas.

El ángulo de contacto es una medida de la capacidad de un líquido para mojar la superficie de un sólido o la capacidad de cohesión de las moléculas del líquido. Según el ángulo que forme con la superficie se puede clasificar en mojante (ángulo mayor a  $90^\circ$ ) y no mojante (ángulo menor a  $90^\circ$ ).

### 1.2.3.2 Rango Lineal Viscoso (LVR)

El Rango Lineal Viscoso (LVR) es una medida inicial que estudia el rango útil al que se puede someter la muestra antes de destruir la estructura interna y sea irrecuperable.

Se aplica un rango de tasa de deformación desde  $0,5-10^3 \text{ s}^{-1}$  para determinar el rango lineal viscoso en términos de los módulos de deformación (G) frente a la tasa de deformación (*shear rate* ( $\dot{\gamma}$ )).

Si se cumple que  $G' > G''$  se puede afirmar que la consistencia del material es más próxima a la de un sólido tipo gel.

De esta forma, podemos establecer el LVR dentro de la zona donde el valor de módulo de deformación se mantiene constante, y se selecciona un valor intermedio en dicha zona.

### 1.2.3.3 Curvas de flujo

Las curvas de flujo se utilizan para clasificar a los fluidos dependiendo de su fluidez y su estructura.

Los fluidos se clasifican de manera general en fluidos newtonianos y no newtonianos. Un fluido newtoniano es aquel en el cual se cumple que el esfuerzo de cizalla es proporcional a la velocidad de deformación.

Por el contrario, un fluido no newtoniano presenta una curva de velocidad de deformación frente al esfuerzo cortante no lineal.

Teniendo en cuenta la estructura, los fluidos se clasifican en simples o estructurados. Los materiales fluidos por definición son sistemas que fluyen cuando se les aplica una tensión, mientras que los fluidos estructurados contienen partículas o gotas de un fluido en un líquido inmiscible suspendido en un fluido portador.

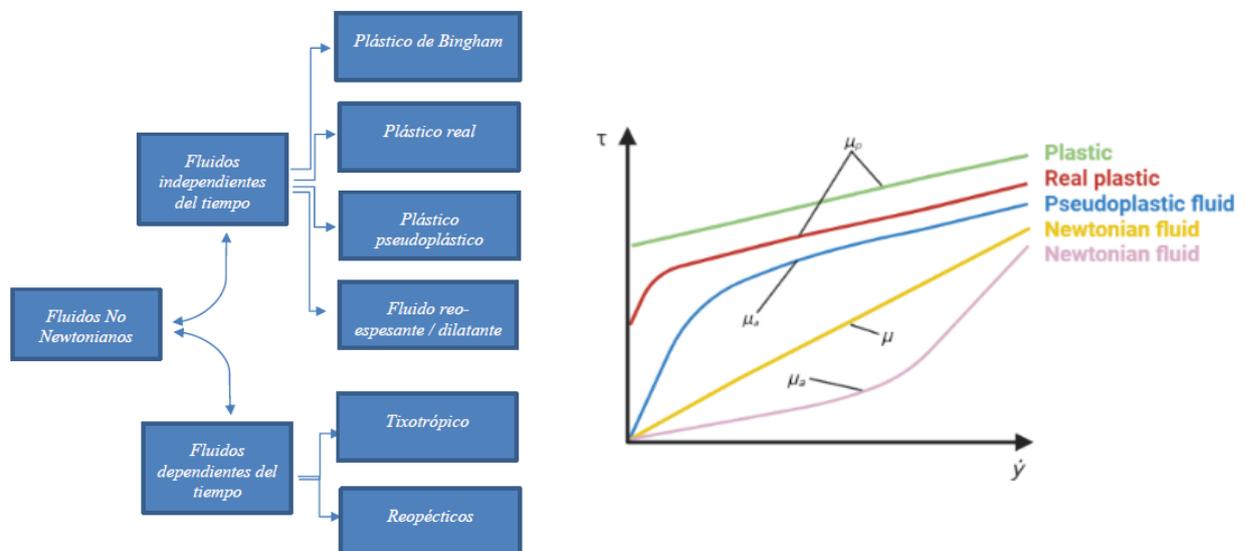


Figura 1-17: Tipos de fluidos. Fuente propia.

Si representamos la viscosidad dinámica ( $\mu$ ) frente a la tasa de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) podemos ver si el hidrogel a estudiar presenta un comportamiento *shear thinning*. Este comportamiento permite no perjudicar la viabilidad celular mientras se bioimprime el hidrogel.

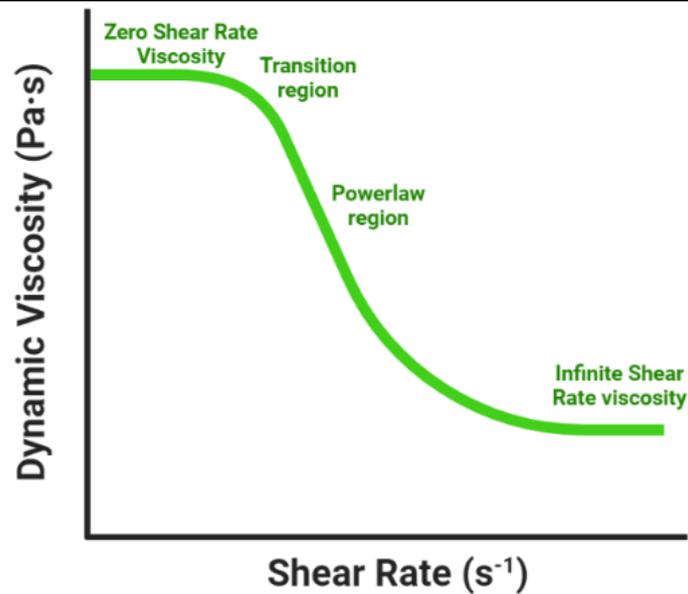


Figura 1-18: Gráfica de la viscosidad ( $\mu$ ) vs. tasa de deformación ( $s^{-1}$ ) de un fluido no-Newtoniano con propiedad "shear thinning". Fuente propia.

Para determinar la gráfica anterior se obtiene la viscosidad a través de barridos de frecuencia entre  $10^{-2}$  a  $10^2$  Hz con un torque de valor constante, dentro del Rango Lineal Viscoso (LVR).

#### 1.2.3.4 Ensayos de reometría de tipo oscilatorio. Barridos de frecuencia.

En este tipo de ensayos se somete a los hidrogeles a una deformación sinusoidal, lo que da lugar a dividir el comportamiento del material en dos componentes: uno en fase y otro fuera de fase.

$$G^* = G' + iG'' \quad (7)$$

La parte real (en fase), denominada módulo de almacenamiento elástico y representada por  $G'$ , marca la respuesta elástica del material. La parte imaginaria (fuera de fase), denominada módulo de pérdida y representada por  $G''$ , hace referencia al comportamiento viscoso del material.

- Módulo de pérdida ( $G''$ ): energía usada para inicial flujo.
- Módulo de almacenamiento ( $G'$ ): energía mecánica que se almacena temporalmente durante la torsión y que se puede recuperar.

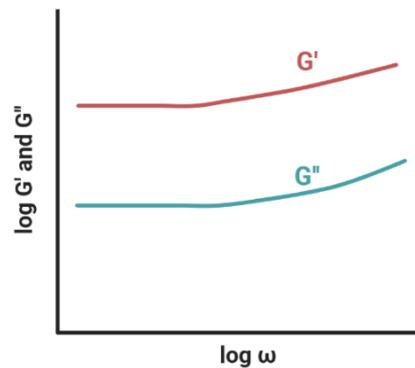


Figura 1-19: Módulos de pérdida y de almacenamiento vs. Frecuencia angular. Fuente propia.

Podemos graficar  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia, permitiendo distinguir entre diferentes tipos de materiales y, por lo tanto, de comportamientos. En el caso de la figura 1-19 se observa un comportamiento constante típico de hidrogeles con conductas elásticas, debido a que la componente elástica  $G'$  predomina sobre la componente viscosa  $G''$ .

### 1.2.3.5 Barrido de temperatura.

Este ensayo se basa en un barrido de temperatura para buscar la temperatura, si la existiera, donde el hidrogel gelifica. Para ello medimos los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) a diferentes temperaturas, con una velocidad de enfriamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (simulando las condiciones que ocurrirán en la bioimpresora).

A temperaturas altas  $G'$  es menor que  $G''$ , y a temperaturas bajas  $G'$  es mayor que  $G''$ , siendo el punto de intersección de las curvas el denominado punto de la temperatura de gelación.

- Zona donde  $G'$  es menor que  $G''$  → El hidrogel presenta un comportamiento viscoso.
- Zona donde  $G'$  es mayor que  $G''$  → El hidrogel presenta un comportamiento más elástico.

### 1.2.3.6 Capacidad de amortiguación de las tintas.

Otro factor importante y que se puede estudiar con la reología es la tasa de recuperación. Una vez que la biotinta sale por la boquilla del dispensador debe recuperar las propiedades mecánicas que tiene en estado estático.

Todas las biotintas se recuperan en mayor o menor medida, pero es necesario determinar el tiempo y el grado de recuperación debido a que estas variables marcarán sustancialmente la integridad estructural del material [65]

Este ensayo muestra la capacidad de un hidrogel para recuperar las propiedades viscoelásticas. Una vez estudiado el rango LVR y, por lo tanto, el punto máximo de fuerza a la que se puede someter a la biotinta antes de que se produzca un cambio irreversible, se selecciona un valor dentro del rango LVR y se grafica la viscosidad ( $\mu$ ) frente al tiempo (s) con la anterior fuerza aplicada.

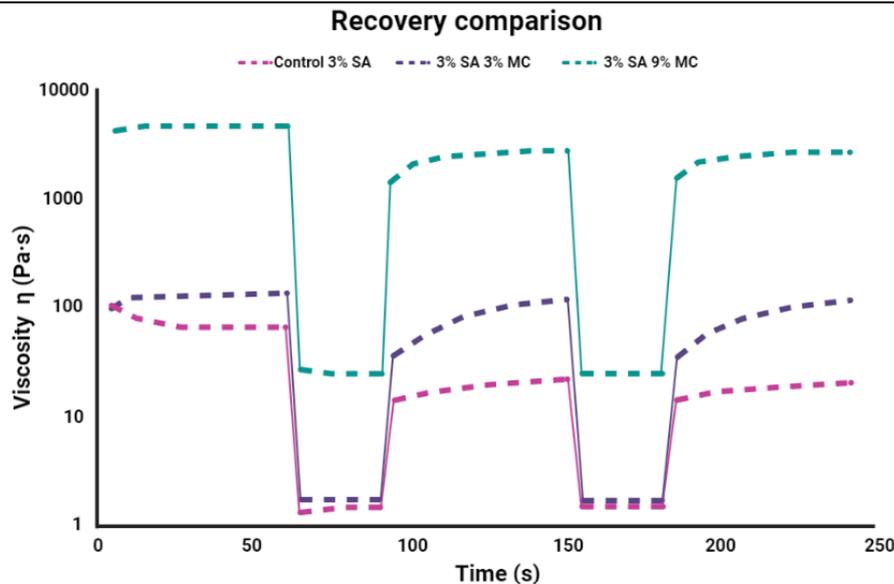


Figura 1-20: Comparación de la capacidad de amortiguación de las tintas. Fuente propia.

### 1.3 Medicina e impresión 3D. Ingeniería de tejidos

El uso terapéutico de los tejidos artificiales fue objeto de interés a partir de los años noventa del pasado siglo, al generar grandes expectativas con las que abordar problemas médicos con muy limitada respuesta terapéutica o sin solución viable [66]–[68].

La impresión 3D ha irrumpido en el mundo de la medicina por sus posibilidades y los avances que está produciendo en la ingeniería de tejidos y en la creación de prótesis dentales y huesos.

Los modelos 3D pueden emplearse con fines educativos o médicos, sirviendo a cirujanos en fase de aprendizaje para comprender mejor la problemática a la que se van a enfrentar. Esto puede aumentar la calidad en la diagnosis y plantear más eficientemente la planificación prequirúrgica, como se ha demostrado en la cirugía cráneo facial y maxilofacial [69]–[72].

La técnica empleada para la creación de prótesis y su posterior incorporación en el organismo, comienza con la impresión de una base de un material que posteriormente permita a las células generar los huesos. El material que hace las funciones de base acabará por disolverse sin afectar al organismo.

En el campo de los implantes dentales es donde más publicaciones y trabajos se encuentran de impresión 3D o bioimpresión, muchos de ellos en combinación con la tecnología de escáner 3D, permitiendo crear prótesis a medida.

La ingeniería de tejidos se puede definir como la aplicación de principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida para la comprensión de las relaciones estructura-función en tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para recuperar, mantener o mejorar la función, siendo uno de los campos de la medicina regenerativa [73]. Este campo de la medicina usa las capacidades del cuerpo humano para auto regenerarse, es decir, promover el crecimiento celular mediante el uso de biomateriales, que permiten el crecimiento controlado en tipos específicos de tejidos. Las estructuras que se forman reciben el nombre de andamios, y tienen propiedades específicas para lograr la adhesión celular y la formación de un nuevo tejido [74].

Tabla 1-4: Elementos fundamentales de la Ingeniería de tejidos [75].

Matrices tridimensionales	Células mesenquimales (MSC)	Factores de crecimiento
Actúan como soporte para el proceso regenerativo.	Tienen la capacidad para auto renovarse y diferenciarse en distintas estirpes celulares.	Proteínas capaces de estimular el crecimiento celular, su migración, proliferación y diferenciación.
Tipos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Origen biológico.</li> <li>• Origen sintético.</li> </ul>	Presentan múltiples alternativas futuras en la medicina en uso conjunto con la bioimpresión 3D.	Benefician a la bioingeniería.
Funciones principales: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estructura que conecta células y tejidos</li> <li>• Soporte y transporte</li> <li>• Liberación constante de factores osteoconductivos</li> <li>• Contribuye a la proliferación, diferenciación y metabolismo del hueso</li> <li>• Hace que las células se identifiquen y adhieran selectivamente</li> </ul>		Los más importantes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial</li> <li>• FGF: factor de crecimiento de fibroblastos</li> <li>• PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas</li> <li>• PRP: plasma enriquecido con plaquetas</li> <li>• BMP: proteínas morfogenéticas óseas</li> </ul>

### 1.3.1 Regeneración del tejido óseo

El hueso es tejido conjuntivo mineralizado, muy estable, que da soporte a las partes blandas del cuerpo. Está muy vascularizado e innervado, y se estructura en laminillas de matriz osteoide calcificada [76].

### 1.3.2 Estructura y composición del hueso

El hueso es un tejido que se encuentra en constante remodelación, y perdura durante toda la vida [77]. La composición del hueso se divide principalmente en tres partes: periostio, hueso y médula ósea. Además, se compone principalmente de dos tipos de tejidos: el hueso trabecular o esponjoso y el hueso cortical o compacto [78].

La estructura ósea compacta es densa y su resistencia a la presión es considerable. Se encuentra en la parte más externa y posee unos conductos longitudinales llamados conductos de Havers, por donde el hueso recibe los nutrientes.

El hueso esponjoso se encuentra en el interior del tejido óseo, donde la estructura está suelta y la resistencia a la presión es pequeña. Alberga en su interior numerosos vasos sanguíneos, médula ósea y otros componentes. La médula ósea del cuerpo humano se compone de médula ósea roja y médula ósea amarilla [79], [80].

La composición del hueso consiste principalmente en una variedad de células y estroma celular calcificado [81]. Se puede observar una gran cantidad de osteocitos en el hueso, que se encarga de generar nuevas matrices.

Los osteoblastos (células osteogénicas) se encuentran en el periostio, y se distribuyen principalmente en la superficie del tejido óseo. Se pueden transformar en osteocitos en determinadas condiciones. Cuando los osteoblastos se incrustan en el osteoide (formado por colágeno I (90%) y otras proteínas no colágenas) se convierten en osteocitos maduros. La función de los osteoclastos es disolver y absorber la matriz ósea.

Tabla 1-5: Aspectos esenciales de los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [75].

<i>Osteoblastos</i>	<i>Osteocitos</i>	<i>Osteoclastos</i>
<p>Células inmaduras, derivadas de MSC (origen: MO).</p> <p>Se diferenciarán en osteocitos o en células limitantes que forman el endostio, capa que protege al hueso.</p>	<p>Los osteoblastos que quedan rodeados de matriz mineralizada en las "lagunas óseas", pasan a ser osteocitos, <i>células maduras</i>. Las <i>más abundantes en hueso maduro</i> y el <i>estadio final</i> de la línea osteoblástica.</p>	<p>Células multinucleadas de <i>mayor tamaño</i>.</p>
<p>Especializadas en la <i>síntesis de matriz ósea</i>; y la remodelación y crecimiento óseo.</p>	<p>Su función principal es <i>controlar el remodelado óseo</i> y mantener la matriz ósea.</p>	<p>Se encargan de la <i>destrucción de tejido óseo</i> y de su <i>reabsorción</i>.</p>
<p>Sintetizan <i>proteínas colágenas</i> y <i>no colágenas</i> de la matriz orgánica del hueso.</p>	<p>Se sitúan en la parte <i>más interna</i> del hueso.</p>	<p>Son ricas en <i>mitocondrias</i> y <i>vacuolas</i>.</p>
<p>Dirigen la <i>disposición de las fibrillas</i> en la matriz extracelular y cuando se alinean forman una fina capa de matriz ósea sin mineralizar, el <i>osteóide</i>, que madura cuando se depositan sobre ella sales de calcio.</p>	<p>Se comunican con los osteoblastos a través de <i>proteínas transmembrana</i> (permiten el paso de calcio, citoquinas o prostaglandinas).</p>	<p>Su origen sí es <i>hematopoyético</i>, surgen a partir de las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (<i>CFU-GM</i>).</p>
<p>Contribuyen en la <i>mineralización de la sustancia osteoide</i> gracias a la fosfatasa alcalina (ALP).</p>	<p>Tienen forma estrellada y sus prolongaciones (<i>canaliculos óseos</i>) discurren por la matriz y nutren al hueso, transportando metabolitos desde los capilares.</p>	<p>Contienen <i>fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)</i> que es la que permite la desfosforilación de las proteínas.</p>
<p><i>Median en la reabsorción</i> por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas.</p>	<p>Sus prolongaciones forman una <i>red de interconexiones</i> con gran superficie de contacto.</p>	<p><i>Marcadores</i>: identificamos estas células midiendo la actividad de TRAP <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.</p>
<p>Sintetizan <i>factores de crecimiento</i>.</p>	<p>Cuando se produce un trauma, se produce <i>hipoxia</i> y <i>necrosis</i> de los osteocitos que estén a más de 0,1 mm de cualquier capilar</p>	
<p><i>Marcadores</i>: Cbfa1 o Runx2 (el primero indica diferenciación osteogénica en preosteoblastos), osteopontina (OPN), colágeno I, fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP), los dos últimos aparecen con la mineralización. Las células limitantes expresan a veces el receptor de parathormona (PTH).</p>	<p><i>Marcadores</i>: igual que los osteoblastos y específicamente CD44 (ausente en osteoblastos, y células limitantes).</p>	

La matriz ósea actúa como un andamio del tejido óseo, que se transforma a partir del estroma celular calcificado. Está compuesta por componentes orgánicos e inorgánicos:

- La fuente de componentes orgánicos es principalmente una gran cantidad de fibras de colágeno secretadas por los osteoblastos, así como una pequeña cantidad de matriz amorfa.
- El componente inorgánico del tejido óseo está compuesto principalmente por cristales de hidroxiapatita (HA), también conocida como sal de hueso (mineral de hueso). Los componentes orgánicos e inorgánicos del tejido óseo están ordenados y combinados cuidadosamente, lo que hace que el tejido óseo sea muy duro.

### 1.3.3 Regeneración natural del tejido

Existen dos procesos fundamentales de generación del hueso:

- Osificación endocondral
- Osificación intramembranal

Ambos procesos se inician a partir de células madre mesenquimales (MSC). Los osteoblastos proceden de estas células madre progenitoras, y su diferenciación es inducida por algunas sustancias como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) [78].

Los osteoblastos secretan sustancias que estimulan la formación del tejido. Una de las sustancias más importantes que secretan es el colágeno tipo I.

La curación de las fracturas óseas puede producirse mediante curación directa o indirecta. En este caso interesa la curación indirecta, ya que es la que se produce en caso de regeneración del hueso intermembranoso, el cual es el que conforma los huesos de la cara [82].

La curación indirecta del hueso ocurre típicamente en el tratamiento de fracturas no quirúrgicas y en ciertos tratamientos quirúrgicos en los que se produce algún movimiento en el sitio de la fractura, como el clavado intramedular, la fijación externa o la fijación interna de fracturas conminutas complicadas [83].

Las fases del proceso de regeneración ósea se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1-6: Fases de la regeneración ósea [75].

Fases	Procesos que se ponen en marcha en cada fase
Formación del coagulo	Tras un traumatismo, se liberan mediadores inflamatorios y se genera un coágulo compuesto por fibrina que tiene una función homeostática y, además, sus plaquetas liberan: factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento insulínico.
Proliferación y diferenciación celular	Entre el 3° y 5° día se desarrolla un tejido de granulación formado por fibroblastos y macrófagos; colágeno y vasos sanguíneos de nueva formación. Invaden el coágulo aportando nutrientes y células indiferenciadas capaces de evolucionar a osteoblastos bajo la influencia de factores morfodiferenciadores como los BMP. Se comienza a generar hueso desorganizado y poco estable durante 4 semanas.
Remodelación ósea	El hueso desorganizado pasa a ser una estructura estable, por acción de factores como el IGF-1 y las BMP; y de osteoblastos y osteoclastos. Aquí tienen lugar tres procesos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Osteogénesis: Formación de nuevo hueso</li> <li>• Osteoinducción: Estimulación de la osteogénesis por acción de determinados factores</li> <li>• Osteoconducción: Desarrollo de la matriz tridimensional que dará soporte al nuevo hueso.</li> </ul>

Hay que resaltar la importancia de las cascadas de señalización que tienen lugar durante cada una de las fases de regeneración ósea, ya que tener en cuenta su mecanismo de acción podría permitir mejorar el proceso de regeneración dental a través de la adición al medio de cultivo celular de algunas de las moléculas que intervienen.

- Durante la respuesta inflamatoria aguda se secretan los factores **TNF- $\alpha$**  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) y las interleucinas **IL-1, 6, 11 y 18** (regulan el sistema inmunitario [84], ya que reclutan a células inflamatorias y promueven la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) [85]). Se ha demostrado que el factor **TNF- $\alpha$**  induce *in vitro* la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales [86]. Entre las interleucinas, las más importantes

son **IL-1** e **IL-6**. IL-1 induce la producción de IL-6, la formación del callo cartilaginoso primario y promueve la angiogénesis [87]. Por otra parte, la IL-6 estimula la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la diferenciación de los osteoblastos y osteoclastos [88].

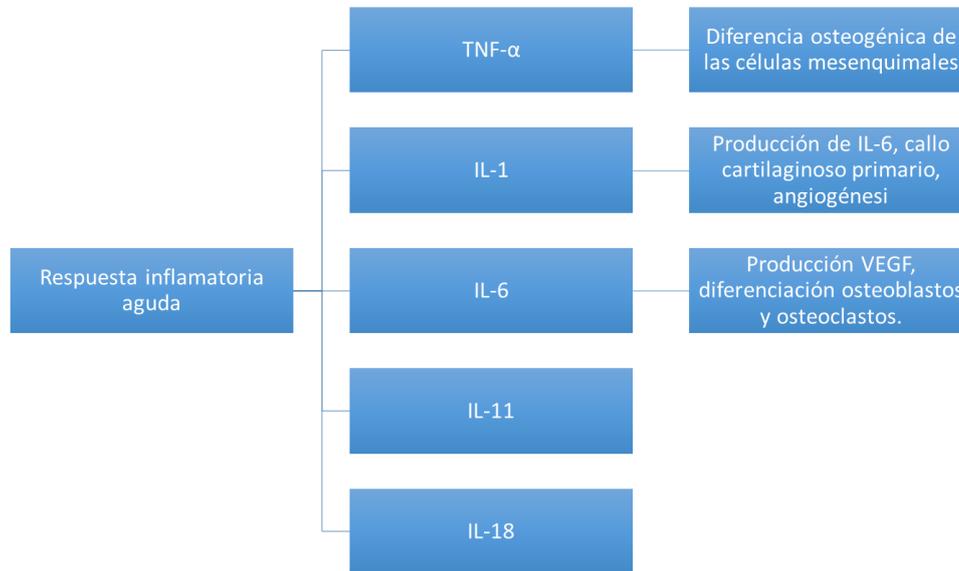


Figura 1-21: Respuesta inflamatoria aguda. Fuente propia.

- En la generación del callo óseo cartilaginoso que posteriormente será mineralizado y reemplazado con hueso son importantes los factores **TFG-β2** y **TFG-β3** (factores de crecimiento transformante), que junto a **GDF-5** (factor de crecimiento diferenciación 5) están implicados en la condrogénesis y la osificación endocondral, mientras que se ha sugerido que **BMP-5 y -6** (proteína morfogenética del hueso) inducen la proliferación celular en la osificación intramembranosa en los sitios periósticos [89].

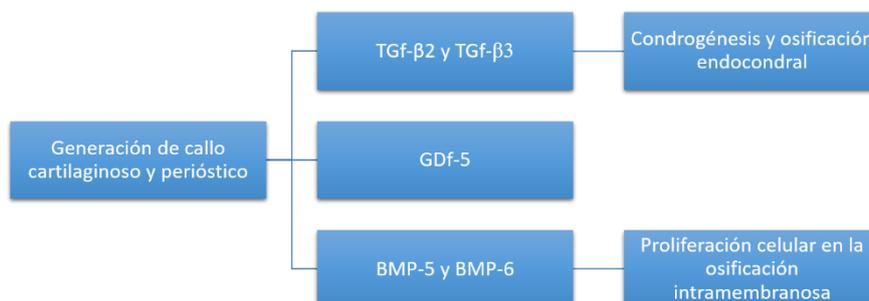


Figura 1-22: Generación del callo cartilaginoso. Fuente propia.

- El proceso de revascularización y neoangiogénesis está regulado por una vía dependiente de **angiopoyetina** (factor de crecimiento vascular) y otra dependiente de **VEGF** [90], el cual promueve tanto la vasculogénesis como la angiogénesis [91].

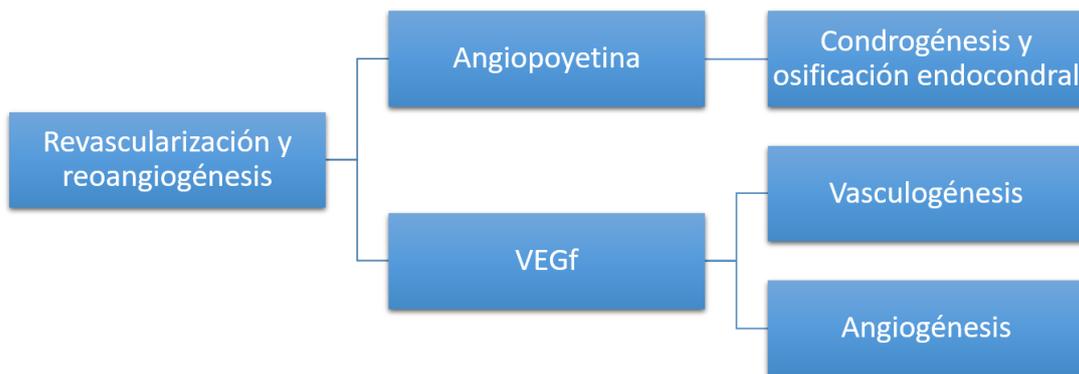


Figura 1-23: Revascularización y neoangiogénesis. Fuente propia.

- Cuando se produce la remodelación ósea, intervienen fundamentalmente el factor **TNF- $\alpha$**  e **IL-1**, mediante un equilibrio entre la reabsorción de callos duros por los osteoclastos y el depósito de hueso laminar por los osteoblastos [92].

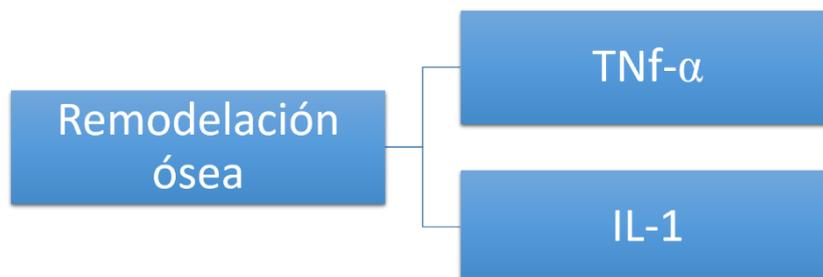


Figura 1-24:Remodelación ósea. Fuente propia.

### 1.3.4 Células mesenquimales estromales (MSC)

Las MSC son células madre adultas que se obtienen de una fuente humana o animal con la capacidad de auto renovarse y diferenciarse en diferentes tipos de células como las mesodérmicas, ectodérmicas o endodérmicas [93].

El uso de las MSC ha ido en exponencial aumento desde los años 50 hasta convertirse en la fuente habitual de terapia celular, medicina regenerativa y reparación de tejidos en la actualidad.

La mayor población de MSC está en la médula ósea (MO), pero también se encuentra en tejido adiposo, pulpa dental, endometrio, placenta o sangre periférica. Se ha podido comprobar cómo existe una tendencia al alza de obtener las MSC del material pulpar, ya que es más accesible y los dientes presentan la característica de ser desechos biológicos con elevado número de donantes [94]–[97].

Las células madre de la pulpa dental (DPSC) son pluripotenciales y capaces de diferenciarse en tipos celulares como condrocitos, adipocitos o hepatocitos, y presentan capacidad inmunomoduladora [97].

El objetivo de las investigaciones con MSC es conseguir el control de la actividad celular sobre los diferentes scaffolds disponibles y dar con una combinación ideal.

El establecimiento de un procedimiento completo para el aislamiento, caracterización y expansión de las MSC es la clave del éxito para el uso de estas células como una buena fuente para la medicina regenerativa [98]. En multitud de artículos se exponen formas y procedimientos ampliamente estudiados [93].

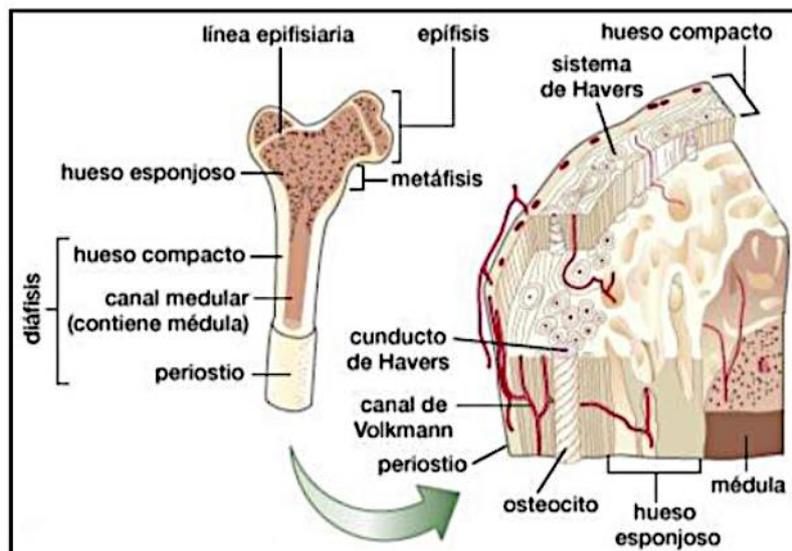


Figura 1-25: Estructura del hueso [99].

### 1.3.5 Aplicaciones de las técnicas de fabricación aditiva en la medicina

#### 1.3.5.1 Uso del Scaffold para la regeneración ósea

Aunque el tejido de los huesos es el que presenta mayor capacidad para regenerarse por sí solo, los profesionales de la salud se enfrentan a retos importantes cuando aparecen traumatismos graves, defectos óseos, fracturas que no tienen unión o incluso enfermedades como la osteoporosis.

En algunas ocasiones el hueso no tiene la capacidad de curarse y regenerarse y necesita de ayuda. Es aquí donde los *scaffolds* han revolucionado las técnicas de curación [100].

Los *scaffolds* son unas estructuras de sujeción que favorecen la regeneración y proliferación celular en tejidos tridimensionales complejos. Por lo general se diseñan con software de modelado 3D y se fabrican mediante técnicas de impresión 3D, las cuales proporcionan las propiedades físicas y mecánicas idóneas para el crecimiento celular.

Algunos estudios coinciden en que para que las características de un *scaffold* sean idóneas éste debe tener una buena macroestructura que promueva la proliferación celular, una superficie porosa suficientemente óptima (más del 90%) tanto para favorecer esta regeneración del tejido como para evitar la oclusión de ciertos poros y, por último, una morfología que permita que estas células se asienten sin ningún tipo de problema [101], [102].

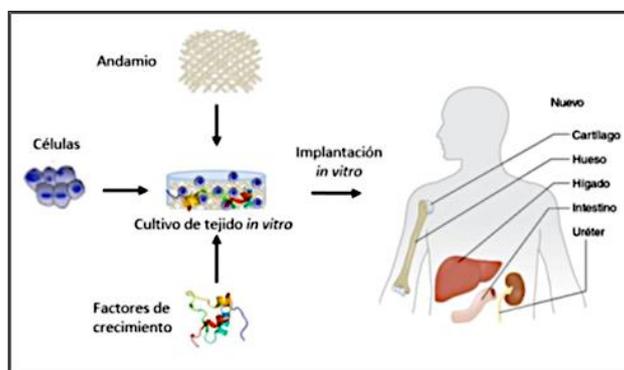


Figura 1-26: Esquema del proceso de la ingeniería de tejidos [103].

La calidad de los scaffolds, que generalmente tendrán formas circulares o hexagonales, se medirá por su porosidad, estos poros deberán medir entre 0.5 mm y 1 mm [104].

Tabla 1-7: Propiedades fundamentales para la fabricación del scaffolds [101].

PROPIEDADES	VALOR
Porosidad	90%
Tamaño de poro	10-500 $\mu\text{m}$
Fuerza	100-200 MPa
Dureza	2-12 Mpam <sup>1/2</sup>
Módulo	15-20 GPa

Si se ajustan correctamente los parámetros indicados en la tabla 6, se debería conseguir un buen soporte estructural y biocompatibilidad, además de biodegradabilidad controlable y una aceptable osteoconducción.

Existen multitud de técnicas para la fabricación adecuada de *scaffolds*:

- Gel casting: con esta técnica se obtienen *scaffolds* con porosidad regular y tamaño de poro y composición controladas [105].
- Espuma de gas: es una técnica por moldeo que elimina el uso de solventes químicos, pero impide incluir células y moléculas bioactivas en los andamios [106].
- Gelificación criotrópica: una solución polimérica suspendida en agua es vertida en la forma deseada del andamio y congelada. Al descongelarse, los cristales de agua que están dentro del gel polimerizado crean una estructura porosa. Impide el uso de moléculas bioactivas o células durante la fabricación y presentan tamaño de poro irregular [106].
- Electrospinning: se conecta la fuente del material y la plataforma del colector de fibra a unos terminales de potencial eléctrico opuesto. La diferencia de potencial induce la reducción del diámetro original del material y lo deposita en el suelo del colector. El material líquido se exprime en forma de gota y se expone al campo electrostático entre la hilera y el colector. Finalmente se produce una acumulación de material en forma de espiga que apunta hacia el suelo del colector. Presenta múltiples ventajas, como una gran adhesión celular y simplicidad y bajo coste, pero las propiedades mecánicas del material bioimpreso son limitadas [101], [106].
- Impresión 3D: los andamios se consiguen mediante una impresora de inyección de tinta de polímero. Presenta como ventaja la obtención de formas 3D de alta resolución, complejas, con tamaño apropiado, morfología de poro adecuada y estructura interna controlada. Con esta técnica se ha conseguido mejorar la capacidad para incorporar estructuras vasculares e incluso se pueden añadir células en altas concentraciones directamente en los andamios [101], [107].

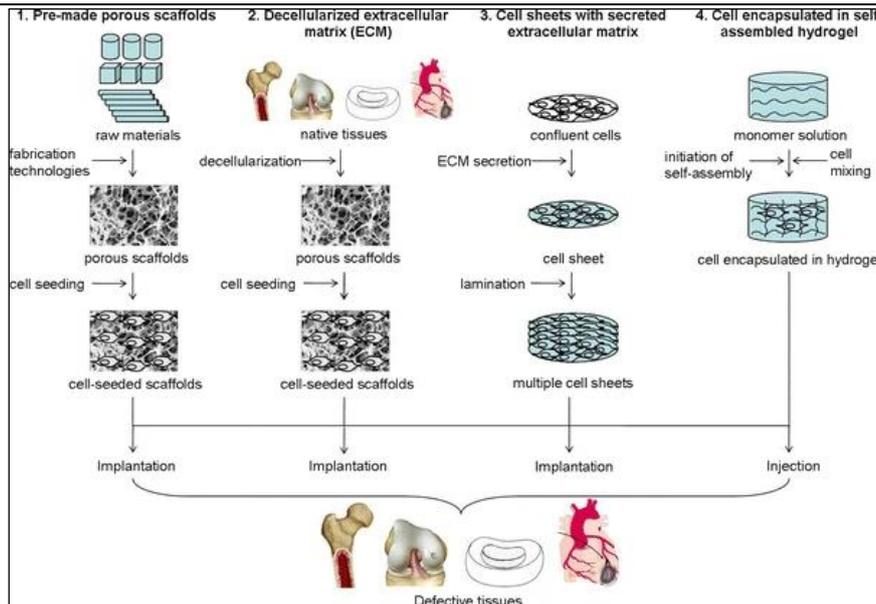


Figura 1-27: Técnicas de fabricación de scaffolds [108].

Estas técnicas han sido usadas en odontología combinándolas con métodos tradicionales, mejorando en gran medida el proceso de recuperación del paciente.

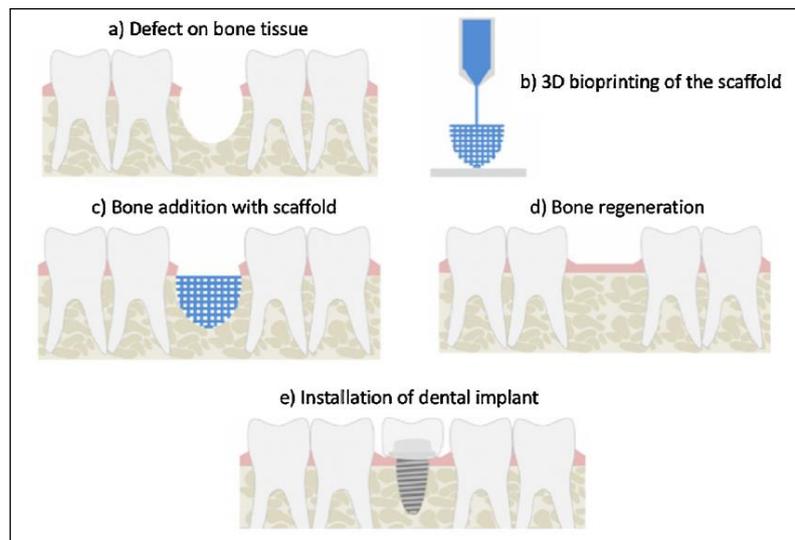


Figura 1-28: Aumento de la cresta alveolar mediante un andamio de tejido óseo fabricado con impresión 3D [109].

Además de las técnicas anteriormente nombradas se ha estudiado el uso de una amplia variedad de materiales. Podemos encontrar muchos trabajos que nos muestran sus múltiples propiedades y idoneidad en combinación con el uso de scaffolds [110]–[114]:

- Metales
- Biocerámicas como la hidroxiapatita (material osteoconductor biocompatible con ausencia de citotoxicidad y con capacidad de unión ósea).
- Vidrios bioactivos

- Polímeros naturales
  - Colágeno tipo I: biocompatible y biodegradable con la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación celular. Presenta baja resistencia mecánica.
  - Chitosán: material biocompatible, biodegradable y osteoconductor.
  - Ácido hialurónico: material biodegradable, biocompatible y viscoelástico que contribuye a la proliferación y migración celular.
- Polímeros sintéticos: dentro de este grupo se encuentran algunos muy interesantes por ser biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y ofrecer una gran facilidad de uso.
  - PLA
  - PCL (policaprolactona)

Los enfoques basados en andamios no eran adecuados para la regeneración de tejidos compuestos similares a los dientes porque este enfoque no podía colocar con precisión múltiples tipos de células de una manera predefinida.

### 1.3.5.2 Bioimpresión de tejido

En la bioimpresión de tejido óseo han surgido enfoques basados en andamios utilizando diversos biomateriales, los cuales hacen las funciones de núcleo para la síntesis de tejidos que permiten la división, el crecimiento de las células y la diferenciación celular por sus propiedades.

Debido a la microestructura fisiológica única del hueso natural y la guía para el desarrollo óseo y la regeneración fisiológica, un número cada vez mayor de materiales sintéticos están diseñados para imitar la microestructura ósea [79], [115], [116], como mejores cerámicas osteoconductoras [117] y polímeros sintéticos biodegradables [118]. Las biocerámicas se clasifican en dos tipos: cerámicas bioinertes (como alúmina y zirconio) y cerámicas bioactivas (como hidroxifosfato, fosfato tricálcico y vidrio bioactivo (fosfato cálcico)).

Los materiales biocerámicos pueden imitar los poros del hueso humano y proporcionar espacio para la adhesión y el crecimiento celular siempre que el diseño sea el apropiado.

La bioimpresión del tejido óseo se ha realizado principalmente mediante las técnicas de bioimpresión por extrusión o por láser. Los andamios que se generan en el proceso de impresión se suelen sembrar con células osteoprogenitoras, como las células madre mesenquimales, a las cuales se les proporcionan factores de crecimiento como proteínas morfogénicas óseas, fibroblastos y factores de crecimiento endotelial que favorecen la maduración de las MSC [119].

Esta tecnología hoy por hoy sigue teniendo limitaciones a tener en cuenta como pueden ser [120]–[122]:

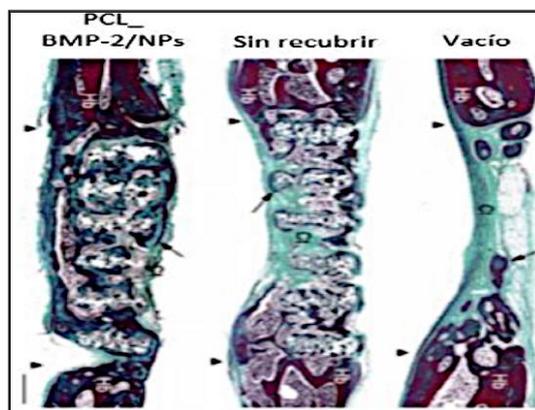
- La liberación de factores de crecimiento no puede regularse.
- La falta de neovascularización provoca un empeoramiento de la adhesión celular.

Muchos estudios sobre regeneración ósea mediante bioimpresión estudian los parámetros óptimos para conseguir la máxima viabilidad celular y crecimiento [123], [124]:

- Tamaño de poro mínimo de 100  $\mu\text{m}$ . Si se hiciera más pequeño disminuiría el volumen de oxígeno y nutrientes que se difunde.
- Tamaño de poro entre 200 y 300  $\mu\text{m}$ . Valor óptimo para el crecimiento óseo, aunque es un valor con el cual se debe tener cuidado, ya que el aumento de la porosidad provoca una reducción de las propiedades mecánicas.

Los factores de crecimiento son proteínas de señalización necesarias en la promoción de la reparación ósea y la osteogénesis.

En la actualidad los factores de crecimiento se están investigando principalmente en el área de la regeneración ósea. El uso de hidrogeles con estos factores de crecimiento resultan muy interesantes ya que proporcionan un medio óptimo para mantener su actividad en el sitio de tratamiento a una velocidad de liberación controlada [125].



**Figura 1-29: Formación del nuevo hueso sin andamio, con andamio sin recubrimiento y con andamio recubierto de policaprolactona (PCL) y proteínas morfogenéticas del hueso (BMP-2) [126].**

El principal problema en el uso de la bioimpresión en la regeneración de tejido óseo es la falta de neovascularización, que afecta a la osteogénesis y a la integración del huésped.

Por otra parte, se han hecho avances en el campo de la odontología, utilizando la tecnología de bioimpresión 3D. La dentición humana exhibe un potencial muy limitado de reparación y regeneración. Los modelos actuales de tratamiento se basan en la rehabilitación protésica o los implantes dentales.

Se encuentran algunos estudios diferentes sobre la biofabricación dental basados en producir complejos de dentina-pulpa en 3D [127]. En bibliografía se encuentran algunas biotintas muy interesantes con base fibrina o colágeno y compuesta de fibrinógeno, gelatina, ácido hialurónico y glicerol cargada con células madre de la pulpa dental humana (hDPSC).

Como se ha indicado, algunos estudios centran sus investigaciones en diseñar una tinta biológica a base de fibrina para la bioimpresión 3D. Los efectos de la concentración de fibrinógeno dentro de la tinta biológica se examinaron en función de la citocompatibilidad, la capacidad de impresión y la diferenciación odontogénica. También se investigó la posibilidad de diferenciación odontogénica

localizada de hDPSC en una estructura impresa, y se aplicó esta tecnología para construir un complejo de dentina-pulpa 3D con forma específica para el paciente.

A pesar de todas las ventajas que plantea el uso de la bioimpresión 3D, nadie ha conseguido aplicar esa tecnología para reconstruir tejidos de composite dentales específicos para cada paciente [127], [128]. Los estudios que se han realizado no llegan a imprimir el diente duro completo, por lo que se necesita realizar más esfuerzos en estas líneas de investigación que plantean retos y soluciones muy interesantes.

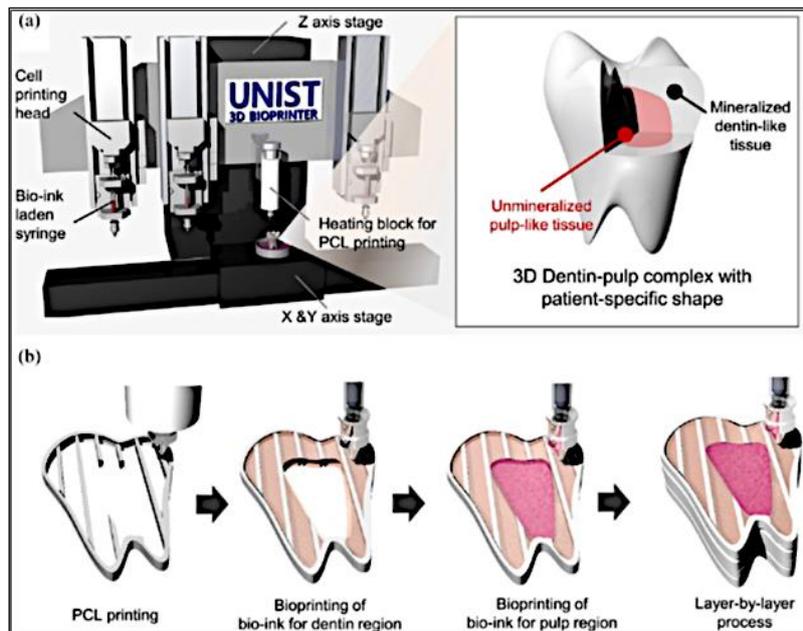


Figura 1-30: Proceso de bioimpresión dentina-pulpa [129].





## **OBJETIVOS DE LA TESIS**



## 2. OBJETIVOS

1. El objetivo general del trabajo se basa en el estudio de la bioimpresión 3D y en la optimización de dicha tecnología. Hay que tener en cuenta que, actualmente, la variabilidad de resultados es muy alta, y aunque esto no implica que no sea apta para su traslado al ámbito clínico/hospitalario, presenta además la complejidad añadida de que la reproducción de tejidos y órganos nativos funcionales requiere unos elevados conocimientos en muchos campos de estudio diferentes. Además, hay que sumar que el coste y recursos que se necesitan es considerable. Por todo ello, en este trabajo se busca disminuir la variabilidad de resultados e incluso describir PNTs (Procedimientos normalizados de trabajo).
2. Estudiar el estado del arte actual tanto de la tecnología de bioimpresión 3D como de los hidrogeles o biotintas utilizadas, para así profundizar en los principales avances e inconvenientes que se están viendo en los últimos años.
3. Desarrollar una serie de pruebas que permitan realizar una nueva metodología para clasificar hidrogeles de bioimpresión, y que sea asequible económicamente para mejorar la cantidad de recursos consumidos.
4. Comprobar la metodología planteada en el punto 3 mediante el análisis de hidrogeles comerciales para comprobar algunos parámetros claves, como es la imprimibilidad y su posible función dentro de la bioimpresión 3D.
5. Buscar posibles relaciones entre parámetros reológicos y las variables utilizadas en los procesos de bioimpresión. Para ello se utilizará la simulación computacional (CFD) y la reología, buscando un método de simulación que permita reducir el número de pruebas a realizar para reducir la cantidad de hidrogel desperdiciado por malas calibraciones de las bioimpresoras.
6. Desarrollar de un dispositivo capaz de caracterizar los materiales usados en la bioimpresión 3D, bajo unas condiciones controladas de temperatura, presión, humedad y CO<sub>2</sub>, y que permita generar un informe sobre las propiedades a tener en cuenta en la producción estructuras bioimpresas.
7. Contribuir al estado actual de la técnica de bioimpresión y al estudio de los hidrogeles empleados, para convertir esta tecnología en una realidad a corto plazo en el ámbito sanitario.



## ❖ **CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS**



## 3 MATERIALES Y MÉTODO

### 3.1 Materiales de partida

Para esta investigación se han utilizado los siguientes materiales de partida:

- ColMA (colágeno con metacrilato) liofilizado, suministrado por Cellink [130].
- Fotoiniciador LAP, suministrado por Cellink [131].
- Agentes de reconstitución A y P, suministrados por Cellink [132], [133].
- Tampón de colágeno, suministrado por Cellink [134].
- Hidróxido de Sodio (NaOH) en lentejas, suministrada por PanReac AppliChem [135].
- GelMA liofilizado (gelatina con metacrilato), suministrado por Cellink [136].
- HAMA (ácido hialurónico con metacrilato) liofilizado, suministrado por Cellink [137].
- Cellink Start [138].
- PLA (ácido poliláctico), suministrado por LEON3D [139].

Estos materiales se describen a continuación:

#### 3.1.1 ColMA liofilizado

Hidrogel híbrido derivado del colágeno tipo I de la cola de rata. Se ha obtenido mediante la adición de grupos metacrilato fotoactivos, lo que le permite su reticulación por la activación de un fotoiniciador, proporcionando al hidrogel mejores propiedades estructurales [130].

#### 3.1.2 Fotoiniciador LAP

Sal de litio fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP). Es un fotoiniciador de tipo I, soluble en agua, citocompatible para su uso en la polimerización de hidrogeles u otros materiales poliméricos. Presenta solubilidad en agua y buena tasa de polimerización con luz de 365nm y absorbancia a 400nm, permitiendo la polimerización con luz visible. La cinética de polimerización mejorada permite la encapsulación celular a una concentración de iniciador reducida y una luz de longitud de onda más larga, reduciendo la toxicidad del iniciador y aumentando la viabilidad celular [140].

#### 3.1.3 Agente de reconstitución A y P

El agente de reconstitución A es una solución ácida empleada para disolver y diluir los biomateriales de colágeno de CELLINK, como el Coll I liofilizado, la solución Coll I y el ColMA liofilizado. Las soluciones de colágeno reconstituidas en combinación con el tampón de colágeno hacen que la biotinta sea isotónica con un pH más fácil de neutralizar [132].

El agente de reconstitución P se emplea para disolver y diluir biotintas liofilizadas sin colágeno, como GelMA y el HAMA. Al tener pH fisiológico e isotonicidad, hace que las biotintas sean adecuadas para aplicaciones de cultivo celular [141].

### 3.1.4 Tampón de colágeno

Contiene un tampón de pH y sales para conseguir que el ColMA sea adecuado para el cultivo celular. Incluye un indicador de pH para facilitar la neutralización [134].

Una solución tampón mantiene el pH constante, lo que es vital para el correcto desarrollo de reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar en los seres vivos. Los amortiguadores o *buffers* son aquellas disoluciones cuya concentración de protones apenas varía al añadir ácidos o bases fuertes.

La elección de los amortiguadores, tanto en la regulación del equilibrio ácido-base en los seres vivos como al trabajar en laboratorios, radica en la posibilidad de mantener la concentración de hidrogeniones ( $H^+$ ) dentro de unos límites muy estrechos [142].

### 3.1.5 Hidróxido de Sodio (NaOH)

A temperatura ambiente es un sólido cristalino, blanco, sin olor y que absorbe rápidamente dióxido de carbono y humedad del aire. Es una sustancia muy corrosiva. Cuando se disuelve en agua o cuando se neutraliza con algún ácido libera gran cantidad de calor [143].

Esta sustancia es altamente versátil y se utiliza en diferentes procesos de fabricación. Es un coproducto de la producción de cloro. Se utiliza para ajustar la disolución a un pH apropiado [144].

### 3.1.6 GelMA liofilizado

Hidrogel híbrido a base de gelatina porcina proporciona a las células un medio óptimo para el crecimiento celular. Esta biotinta está modificada con grupos metacrilato para reticularse con un fotoiniciador al exponerse a la luz ultravioleta, confiriéndole una mayor capacidad estructural [136].

### 3.1.7 Cellink Start

Es un hidrogel soluble en agua utilizado como material de soporte durante la bioimpresión de estructuras complejas, por su sencilla remoción en presencia de agua. También se utiliza en construcciones con porosidad a lo largo de los tres ejes y en construcciones cargadas de células.

Este gel se imprime a temperatura ambiente y se disuelve fácilmente después del lavado con medios de cultivo [138].

### 3.1.8 HAMA liofilizado

Hidrogel híbrido fabricado a partir del ácido hialurónico, modificado con grupos metacrilato que le permiten reticularse en presencia de un fotoiniciador y luz UV [137].

### 3.1.9 PLA

El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico. Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad, este biopolímero tiene numerosas aplicaciones, ya que presenta un amplio rango de propiedades, desde el estado amorfo hasta el estado cristalino. La variación en sus propiedades puede lograrse manipulando las mezclas entre sus isómeros D (-) y L (+), los pesos moleculares y la copolimerización.

La obtención se lleva a cabo generalmente en dos etapas consecutivas: la primera es la síntesis del ácido láctico y la segunda es la polimerización. El proceso completo se esquematiza en la Figura 3.6.

Se han desarrollado dos vías fundamentales para convertir el ácido láctico en polímeros de alto peso molecular: el proceso indirecto vía lactido, cuyo producto se denomina poliláctido, y el proceso directo de polimerización por policondensación, produciendo ácido poliláctico. Ambos productos son agrupados bajo la denominación PLA.

El PLA tiene propiedades mecánicas en el mismo rango de los polímeros petroquímicos, a excepción de una baja elongación. Sin embargo, esta propiedad puede ser afinada durante la polimerización (por copolimerización) o por modificaciones post polimerización (por ejemplo, plastificantes). El PLA puede ser tan duro como el acrílico o tan blando como el polietileno, rígido como el poliestireno o flexible como un elastómero. Además, puede ser formulado para dar una gran variedad de resistencias. Las resinas de PLA pueden ser sometidas a esterilización con rayos gama y es estable cuando se expone a los rayos ultravioleta. Al PLA se le atribuyen también propiedades de interés como la suavidad, resistencia al rayado y al desgaste.

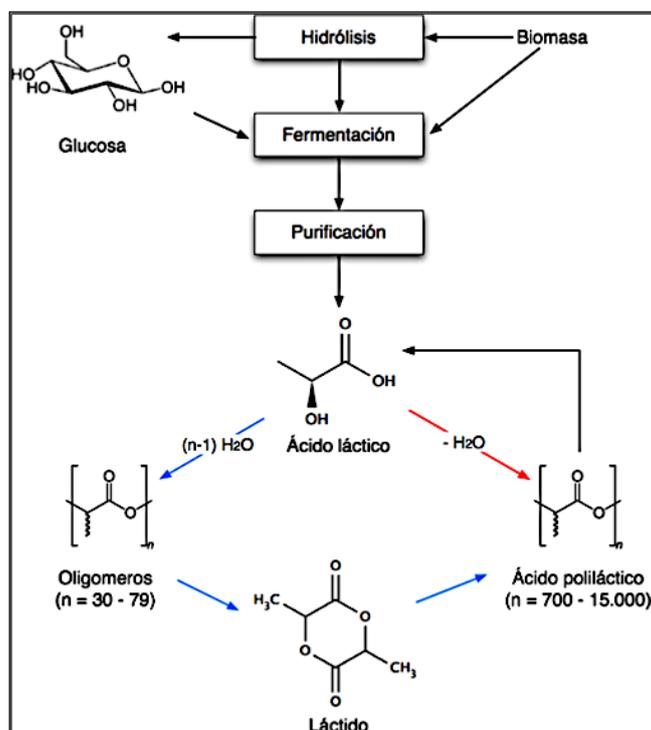


Figura 3-1: Vías para la polimerización del ácido poliláctico [145].

El material utilizado fue suministrado por la empresa de distribución PLA INGENIO, y presenta propiedades tales como:

- Dureza: Muy alta
- Flexibilidad: Muy baja
- Warping: Muy bajo
- Temperatura extrusor: +/- 205°C
- Temperatura base de impresión: 50 °C
- Densidad: 1,24 g/cc
- Post-horneado: Multiplica la resistencia. Puede introducirse en un horno a 95°C durante 12-14 minutos (dependiendo de la pieza).

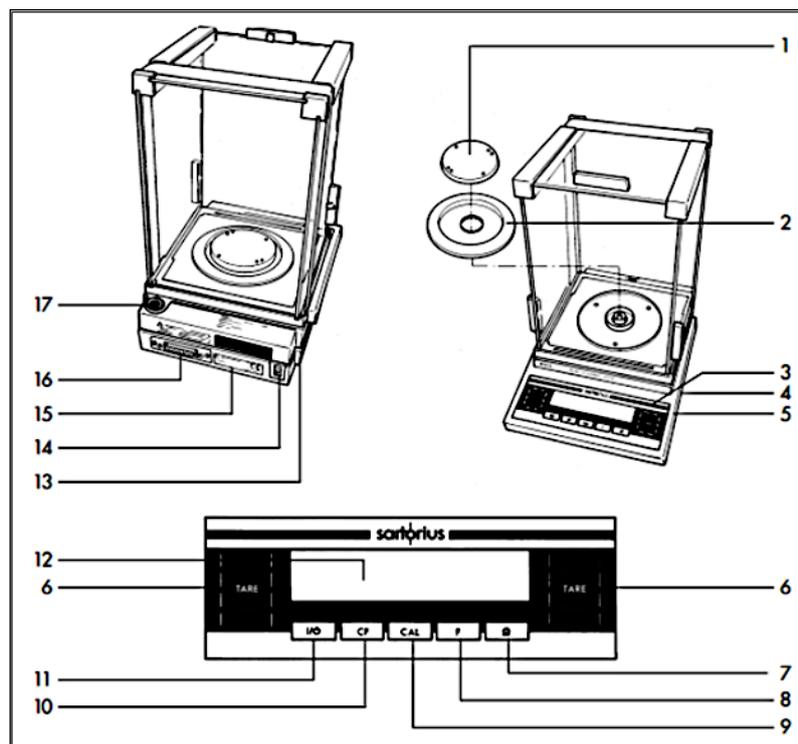
Es el material más utilizado en impresión 3D, y la empresa lo recomienda para decoración, adornos, maquetas, etc.

### 3.2 Equipos de laboratorio

#### 3.2.1 Balanza Sartorius modelo BP61 S

Este tipo de balanzas sirven para pesar o medir con elevada precisión la masa de un cuerpo o sustancia. Suelen estar ubicadas en el interior de una urna protectora de cristal o plástico, para evitar que se altere la medición. Garantizar la precisión de la báscula es muy importante para mantener su correcta calibración.

Las balanzas analíticas tienen una capacidad de 200 gramos y están diseñadas para medir masas pequeñas, en un rango menor al miligramo. En el caso de los modelos digitales, su sensibilidad alcanza hasta la diezmilésima parte de un gramo [146].



1 Weighing pan	69 B20116	12 Weight display
2 Shield ring	69 B20117	13 Verification ID label with metrological data for verified balances approved for use as legal measuring instruments
3 Metrological ID label for verified balances approved for use as legal measuring instruments		14 DC jack
4 Menu access switch		15 Manufacturer's label with the $\text{CE}$ mark of conformity
5 Leveling foot	69 B20005	16 Data interface port
6 Zero-setting and tare keys <b>TARE</b>		17 Level indicator
7 Print key (data output) <b>Q</b>		
8 Function key <b>F</b>		Not shown: Dust cover
9 Adjustment/calibration key <b>CAL</b>		Caps and plugs (set)
10 CF key (clear function) <b>CF</b>		69 60BP07
11 On/off key <b>ON</b> (standby)		69 B20009

Figura 3-2: Esquema de funcionamiento [146].

### 3.2.2 Impresora 3D. Creality Ender 3 pro

La impresora 3D con la que se han fabricado las piezas de PLA utilizadas en este proyecto ha sido fabricada y configurada por el grupo de investigación de Ingeniería de Materiales (INMA) de la Escuela de Ingeniería Industriales.

Este modelo de impresora 3D Open Source, permite imprimir de forma asequible numerosos tipos de filamento, como PLA, ABS, PETG, flexible, entre otros, en un volumen de impresión por encima del estándar.



Figura 3-3: Impresora 3D Ender 3 Pro [147].

➤ Especificaciones técnicas [147]:

• <b>Tipo de extrusión:</b> FDM (Sistema Bowden).
• <b>Volumen de construcción:</b> 220 x 220 x 250mm.
• <b>Diámetro filamento:</b> 1,75mm.
• <b>Diámetro boquilla:</b> 0.4mm.
• <b>Espesor de capa:</b> 0.1 – 0.35mm.
• <b>Precisión:</b> +/-0.1mm.
• <b>Temperatura máxima extrusor:</b> 255 °C.
• <b>Temperatura máxima de cama:</b> 110°C.
• <b>Velocidad máxima de trayecto:</b> 180mm/s.
• <b>Formatos modelo 3D:</b> STL, OBJ, G-Code
• <b>Conectividad:</b> Tarjeta SD y cable USB.
• <b>Sistemas operativos compatibles:</b> Windows/ Mac/ Linux.
• <b>Chasis:</b> Perfiles V-Slot de aluminio.
• <b>Dimensiones de la impresora 3D:</b> 440 x 410 x 465mm.
• <b>Peso:</b> 8.6 Kg.
• <b>Peso neto:</b> 10 Kg.
• <b>Embalaje Dimensiones:</b> 600 x 350 x 160mm.
• <b>Entrada:</b> AC 100-265V 50-60Hz.
• <b>Salida DC 24V 15A 360W.</b>
• Enchufe de la UE.

### 3.2.3 Bioimpresora 3D. BIO X

La bioimpresora BIO X es referencia para empresas de ciencias de la vida, investigadores e innovadores.



Figura 3-4: Bioimpresora BIO X [148].

Se trata de un sistema dotado de la tecnología *Clean Chamber*, patentada por Cellink, con un sistema de filtrado que deja la cámara de impresión totalmente estéril y permite su uso sin necesidad de introducirla en una campana de flujo.

Está dotada de 3 cabezales intercambiables que permiten utilizar hasta 3 materiales o herramientas distintas para la bioimpresión de los diferentes materiales.

Especificaciones técnicas [149]:

- Tecnología de “cámara limpia”.
- Modo de impresión triple.
- Tres cabezas intercambiables.
- Control múltiple de temperatura y sensor de presión.
- Resolución ultrafina de 1 $\mu$ m.
- Sistema de cuadro ultravioleta múltiple (LED UV 365nm y 405 nm).
- Control de temperatura de impresión (4°C-60°C).
- Pantalla táctil de 7 pulgadas.
- Compresor de aire integrado sin aceite.
- Unidad independiente con pequeña huella de laboratorio.

Esta bioimpresora ha sido ampliamente utilizada en múltiples proyectos de investigación, y se ha desarrollado su tecnología para diferentes fines [149]:

- Medicina regenerativa
- Investigación de cáncer
- Materiales para ciencia: desarrollo del siguiente avance en la investigación de materiales a través de la impresión y sus múltiples modalidades de enlace cruzado.
- Descubrimientos en medicina: permite crear modelos robustos de células 3D y cocultivos para ser tratados con fármacos en análisis posteriores.
- Producción alimentaria

Este modelo está diseñado para soportar diferentes cabezales de impresión y herramientas. Permite combinar diferentes materiales y técnicas de impresión según sea su aplicación. Para ello dispone de varios cabezales de impresión [149]:

- Cabezal de impresión neumático con calefacción, 3cc (65°C).
- Cabezal de impresión neumático con calefacción, 10cc (65°C).
- Cabezal de impresión de gota electromagnética (EMD) (65°C).
- Cabezal neumático con control de temperatura (4°C-65°C).

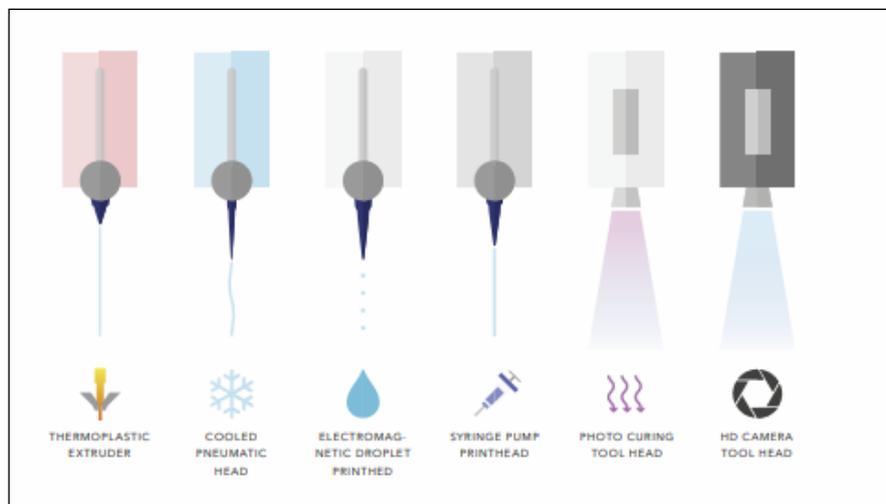


Figura 3-5: Tipos de cabezales [150].

### 3.2.4 Escáner 3D. Shining 3D SE

Escáner 3D de escritorio que presenta diversas características muy interesantes su uso en investigación [151]:

- Multifuncional, captura de datos 3D más fácil y rápido.
- Modos de escaneo dual: escaneo automático y escaneo fijo.
- Gran detalle a un precio asequible.
- Plug and play.
- Múltiples campos de aplicación.
- Adaptación para todos los tamaños.
- Tiempo de escaneo de 360 grados en modo Automatic Scan: 2 minutos.
- Tiempo de escaneo para captura simple: 8 segundos.



Figura 3-6: Escáner 3D EINSCAN-SE [151].

### 3.2.5 Reómetro

Instrumento de laboratorio que se usa para medir la deformación y el flujo de la materia, describiendo la interrelación entre fuerza, deformación y tiempo.

El reómetro modular Kinexus pro+ está focalizado en la caracterización reológica de dispersiones y otros fluidos complejos y sólidos suaves [152].



Figura 3-7: Kinexus pro+ [152].

Datos técnicos [152]:

- Medición: Viscosidad (reología) y viscoelasticidad.
- Tecnología: Reometría-rotacional.
- Rango de par: 1,0nNm – 225mNm.
- Rango de temperatura: -40°C - 300°C.

### 3.2.6 Medidor de pH GLP 21

Es un medidor de pH de laboratorio con resolución seleccionada entre 0,1-0,01-0,001 pH.

Ofrece varios modos de calibración con reconocimiento de 3 familias de tampones a un pH concreto, ofreciendo además tres modos de medida:

- Por estabilidad.
- En continuo.
- Por tiempo.

Posee un Data Logger donde se almacenan las últimas 400 medidas, los datos de la calibración y el historial del electrodo.

Permite conexión con un PC a través del software Comlabo para automatizar las medidas de pH.



Figura 3-8: Medidor de pH GLP 21 [153].

**VARIABLES MEDIDAS**  
Escala: -2...16 pH, ± 2000 mV y -20...150 °C,  
Resolución: 0,01 pH, 1 mV, 0,1 °C,  
Error de medida (± 1 dígito): ± 0,01 pH, ± 1 mV, ± 0,2 °C

**Compensación automática de temperatura**  
Por teclado o con sonda de temperatura Pt 1000 (CAT).

**Calibración pH**  
Con 1, 2 ó 3 tampones seleccionables dentro de la gama.  
Reconocimiento automático de tampones técnicos,  
pH 2,00, 4,01, 7,00, 9,21, 10,90, (valores a 25°C).  
Tiempo de validez programable entre 0 horas y 7 días.  
Frecuencia de calibración programable entre 0 horas y 7 días.  
Aviso automático de recalibración.  
Rechazo de electrodos en mal estado.  
Calibrado teórico

**Criterios de aceptación de calibración pH**  
Potencial de asimetría ± 58 mV.  
Pendiente 41...62 mV/pH, a 25° (sensibilidad 70...105%)

**Calibración mV**  
Reconocimiento automático patrón 220 mV a 25 °C.

**Modos de medida**  
Por estabilidad  
En continuo

**Parámetros físicos**  
Peso 800 g. Dimensiones 325 x 155 x 98 mm.

**Idiomas**  
Castellano, Italiano, Francés, Inglés y Catalán.

**Pantalla**  
Gráfica, de cristal líquido, retroiluminada, 128 x 64 puntos.

**Entradas y salidas**  
Electrodo indicador o combinado, conector BNC (Imp. > 10<sup>12</sup>Ω).  
Electrodo de referencia, conector banana.  
C.A.T. tipo Pt 1000, conector banana o telefónico.  
Agitador CRISON, conector RCA.

**Directivas baja tensión y CEM**  
Según 2006/95/CE. Según 2004/108/CE.

**Condiciones ambientales**  
Temperatura de trabajo 5...40°C  
Temperatura de almacenamiento -15...55°C.  
Humedad relativa < 80% (humedad no condensada).

**Alimentación**  
A través de alimentador externo 220 VCA / 12 VDC, 3,3 W

**Materiales**  
Contenedor, ABS y PC. Teclado, PET.

**Sensores conectables**  
Electrodo indicador o combinado, conector BNC (Imp. > 10<sup>12</sup>Ω).  
Electrodo de referencia, conector banana.  
C.A.T. tipo Pt 1000, conector banana o telefónico.

**Periféricos conectables**  
Agitador magnético CRISON.

\*Especificaciones sujetas a cambios sin previo aviso.

Figura 3-9: Especificaciones técnicas [153].

### 3.2.7 Agitador de laboratorio magnético digital (Benchmark)

Tabla 3-1: Características principales [154].

<b>Características generales:</b>	
<b>Sistema de visualización:</b>	Pantalla LCD con retroalimentación
<b>Superficie de trabajo de cerámica:</b>	6,5 x 6,5 pulgadas
<b>Rango de velocidad:</b>	200 rpm-1500 rpm
<b>Peso:</b>	6,4 lbs./2,9 kg
<b>Eléctrico:</b>	120 V o 230 V, 50Hz-60Hz 500 W
<b>Rango de temperatura:</b>	Ambiente +5 a 380°C
<b>Rango de temperatura de funcionamiento:</b>	+4 <sup>a</sup> +65°C
<i>LED de seguridad indicando superficie caliente (&gt; 50 grados centígrados)</i>	

Los agitadores magnéticos son usados en laboratorios para mezclar soluciones o líquidos de poca viscosidad. Este tipo de agitadores se pueden usar como agitador, como calefactor o combinando ambas funciones.

Este dispositivo cuenta con un motor eléctrico que gira, pudiendo controlar el número de giros que puede dar en un minuto sobre su eje. Adicionalmente, el motor está provisto de unos campos magnéticos que permiten controlar a un agitador magnético, el cual se sumerge en la solución que se desea agitar.

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Conformación de los hidrogeles

##### 3.3.1.1 Conformación GelMA o HAMA

1. Preparación del material necesario:



Figura 3-10: Materiales necesarios para la conformación del hidrogel.

a. Atemperar GelMA o HAMA liofilizado.

2. Preparar agente reconstitución con fotoiniciador (PI) [155]:

➤ Materiales y equipos necesarios

Tabla 3-2: Tabla con los materiales y equipos necesarios para este paso.

12ml de Agente de reconstitución P	30mg de fotoiniciador	Tubo Falcon
Filtro de jeringa de 0,22µm	Pipeta	Vaso de precipitado
Agitador de laboratorio magnético	Balanza de laboratorio	

a. Mediante una pipeta se trasvasan 12ml del agente de reconstitución P a un vaso de precipitado.

b. Mezclar la cantidad deseada de PI en el agente.



Figura 3-11: Paso previo a mezclar el PI con el agente de reconstitución P.

- c. Filtrar estérilmente la solución PI en un tubo Falcon estéril de 15ml, utilizando una jeringa y un filtro de jeringa de 0,22µm.
- d. Calentar la solución a 50 °C.

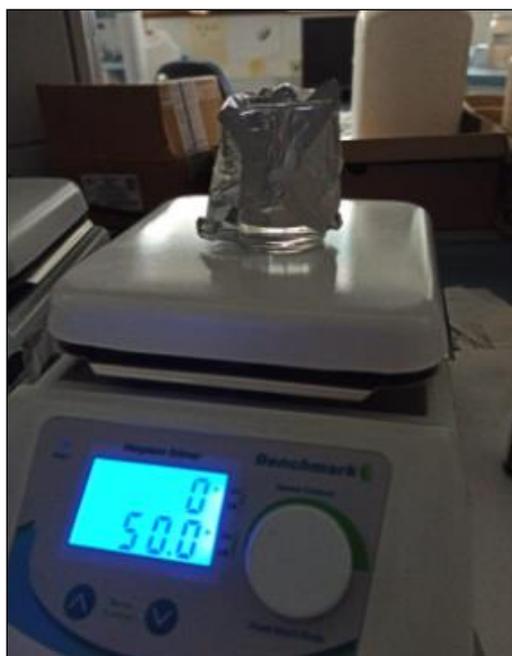


Figura 3-12: Proceso de calentado.

Tabla 3-3: Concentración de PI según la masa seleccionada.

PI concentración (%)	Masa de PI para 12 ml de agente (mg)
0,05	6
0,10	12
0,25	30

### 3. Preparación de la solución GelMA:

Tabla 3-4: Materiales y equipos utilizados en este paso.

Solución PI + Agente de reconstitución	Agitador de laboratorio magnético	Medidor de pH
Solución 1 molar de NaOH		

- a. Añadir la cantidad preparada de PI + agente de reconstitución P en el vial de GelMA o HAMA.

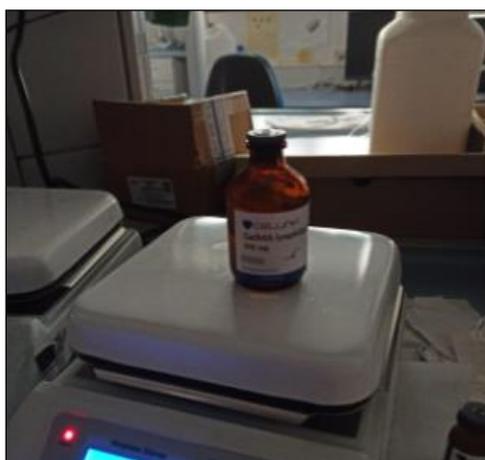


Figura 3-13: En el vial se calienta la mezcla con el PI, el agente y el material liofilizado.

Tabla 3-5: Concentración obtenida de GelMA según el volumen de agente + PI introducidos en el vial de GelMA

Concentración GelMA	Volumen de PI
5%	9,5 ml
10%	4,5 ml
20%	2 ml

Tabla 3-6: Concentración obtenida HAMA según el volumen de agente + PI introducidos en el vial de HAMA

Concentración HAMA (w/w)	Volumen de PI
3%	3,23 ml
5%	1,9 ml

- b. Mezclar a 50 °C durante 60 minutos o hasta disolver en el caso de GelMA, o mezclar a temperatura ambiente en el caso del HAMA.
- c. Comprobar pH para que se encuentre entre 7-7,4 pH para el GelMA o en el rango de 6,5-7,4 para el HAMA. Es habitual que, tras este paso, el pH se encuentre fuera del anterior rango establecido.

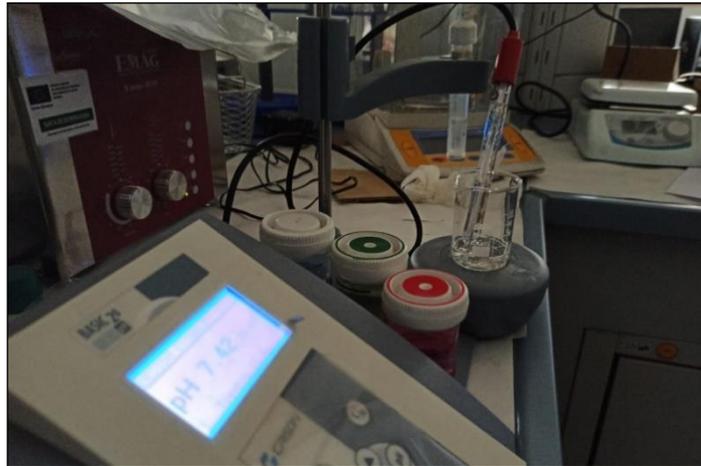


Figura 3-14: Comprobación del pH.

Tabla 3-7: Protocolo para regular el pH.

<b>1. pH por encima del rango marcado</b>	Añadir solución 1 molar HCl
<b>2. pH por debajo del rango marcado</b>	Añadir solución 1 molar de NaOH

#### 4. Preparar Bioink:

Tabla 3-8: Materiales y equipos utilizados en este paso.

Agitador de laboratorio magnético	Pipeta	Cartucho ámbar
-----------------------------------	--------	----------------

- a. Calentar la solución a 35 °C o hasta que esté totalmente líquida.
- b. Transferir a una jeringa.
- c. Introducir la solución a un cartucho ámbar.
- d. Almacenar a 4°C-8°C.



Figura 3-15: Hidrogel conformado y almacenado.

### 3.3.1.2 Conformación ColMA

**1. Realizar cálculos [156]:**

- a. Decidir la concentración final ( $C_f$ ) deseada de ColMA  $\rightarrow$  4mg/ml.
- b. Calcular la concentración objetivo ( $C_s$ ) de la solución madre de COLMA.

$$C_s = C_f \cdot 1,25 \rightarrow 5\text{mg/ml.}$$

**2. Disolver ColMA:**

Tabla 3-9: Materiales y equipos necesarios para este paso.

Agente de reconstitución A	ColMA liofilizado	Vaso de precipitado
Pipeta	Barra de agitación	

- a. Agregar el volumen deseado de agente de reconstitución A en la botella de ColMA.

Tabla 3-10: Concentración objetivo-obtenida según el volumen de agente seleccionado.

$C_s$ (mg/ml)	Volumen en ml de agente
5	20
8	12,5
10	10

- b. Remover con barra de agitación estéril durante 8 horas a 4°C.
- c. Evitar la formación de burbujas.
- d. Almacenar el vial a 4°C-8°C.

### 3. Neutralización:

Tabla 3-11: Materiales y equipos utilizados en este paso.

Baño de hielo	Vial de ColMA con agente de reconstitución	Solución tampón
Fotoiniciador	Filtro de 0,22 $\mu$ m	Tubo Falcon
Pipeta	Vaso de precipitado	Medidor de pH
NaOH	Buffer	

- a. Colocar en baño de hielo el vial y la solución tampón.
- b. Decidir el volumen final en mililitros de la biotinta ( $V_{TINTA}$ ) que se quiere obtener del proceso.
- c. Disolver el PI ( $m_{PI}$ ) en el buffer ( $V_{CB}$ ).
- d. Filtrar la solución con filtro de 0,22 $\mu$ m en tubo Falcon.
- e. Mezclar el elemento ( $m_{PI} + V_{CB}$ ) en un recipiente estéril agitando y pipeteando hacia arriba y hacia abajo para favorecer el proceso de mezclado.
- f. Agregar el volumen de  $V_{NaOH}$ .
- g. Medir el pH. Debe estar entre 6,9 pH Y 7,3 pH.

#### 3.3.2 Digitalización, moldeado y (bio)fabricación de piezas

Para obtener un modelo biomimético complejo existen muchas alternativas en el mercado. Las más efectivas y comunes son:

- Obtener el modelo final mediante tomografía axial computarizada (TAC)
- Mediante escáneres especializados

Los dos métodos necesitan de la obtención de múltiples imágenes para llevar a cabo la reconstrucción tridimensional del modelo biomimético escogido. La diferencia entre ambos radica en que el TAC reconstruye estructuras a partir de imágenes obtenidas de planos del objeto, permitiendo así reproducir la parte interna de estructuras biomiméticas, mientras que el escáner especializado la obtiene a partir de imágenes de la superficie del objeto.

En este trabajo nos centramos en el uso de un escáner 3D al centrar nuestros recursos en la aplicación de la bioimpresión 3D en obtener estructuras biomiméticas óseas y solucionar problemas maxilofaciales.



Figura 3-16: Escáner 3D especializado en obtención de modelos 3D [157].

### 3.3.3 Protocolo para el escaneado de una estructura

1. En primer lugar y tras el proceso de calibración propio de cada escáner, se selecciona el nuevo espacio de trabajo en el equipo y escaneo con texturas. Esta opción nos permitirá en el modelo obtenido en el escaneo visualizar el modelo de una forma más realista.

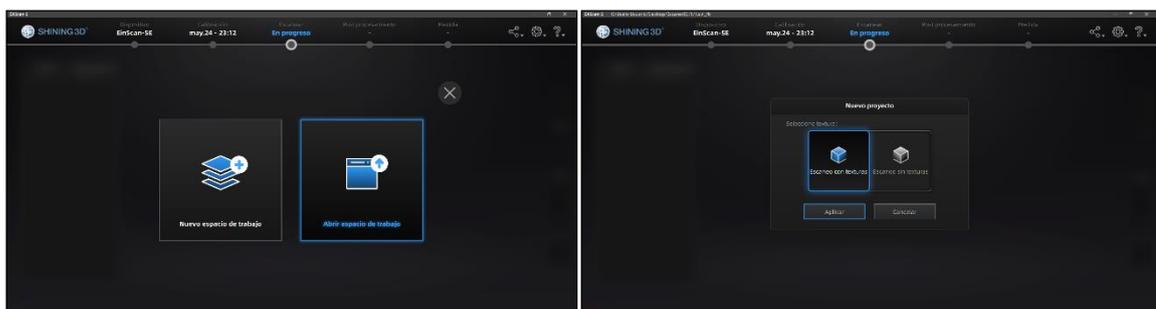


Figura 3-17: Paso 1 del protocolo del escáner 3D.

2. Se configura el software para obtener un escaneado fidedigno, pero optimizando el tiempo de escaneo. Para ello, el programa nos permite un cierto grado de configuración y adaptabilidad a los requerimientos de nuestra pieza.

En la figura 18 se puede visualizar la configuración que se ha elegido tras varias pruebas para conseguir un resultado real, y optimizando el tiempo de procesamiento de imagen.

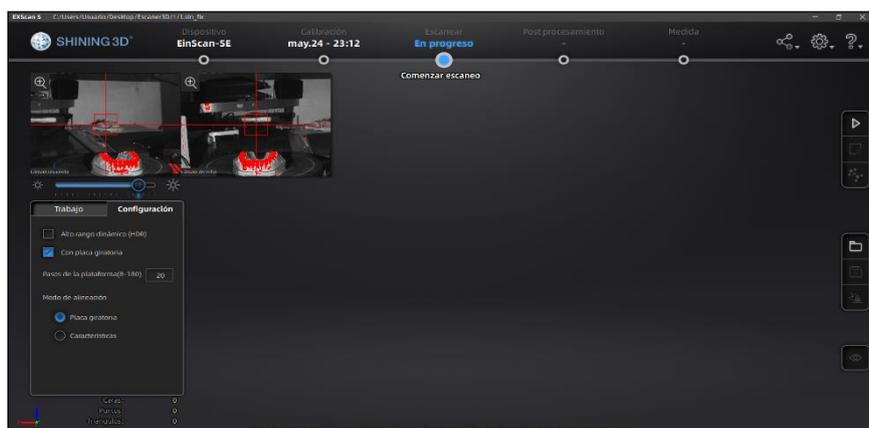


Figura 3-18: Ajuste de los parámetros del software SHINING 3D.

3. El escáner tras los pasos anteriores analiza todas las imágenes que ha tomado en cada giro de la placa giratoria.

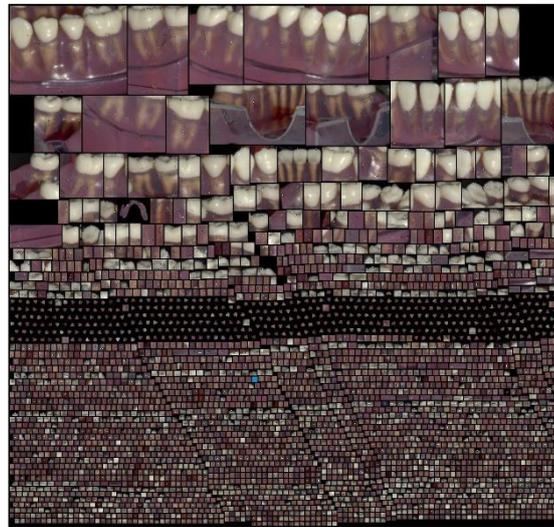


Figura 3-19: Todas las imágenes que el escáner realiza para interpretarlas y proporcionar un modelo 3D.

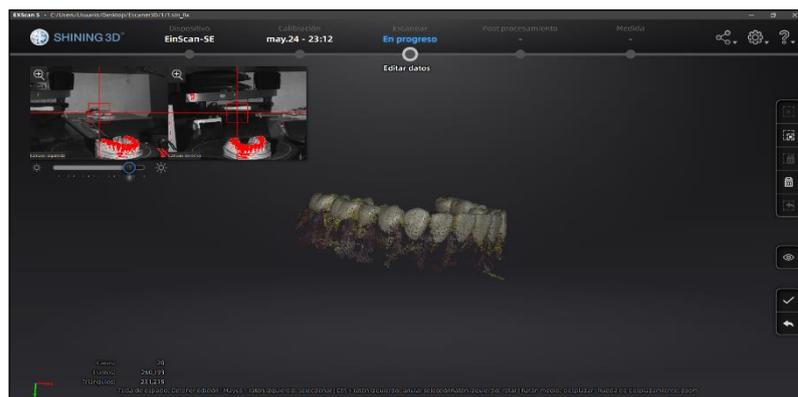


Figura 3-20: Modelo 3D obtenido sin tratamiento digital.

4. Se edita el modelo, seleccionando modelo estanco.

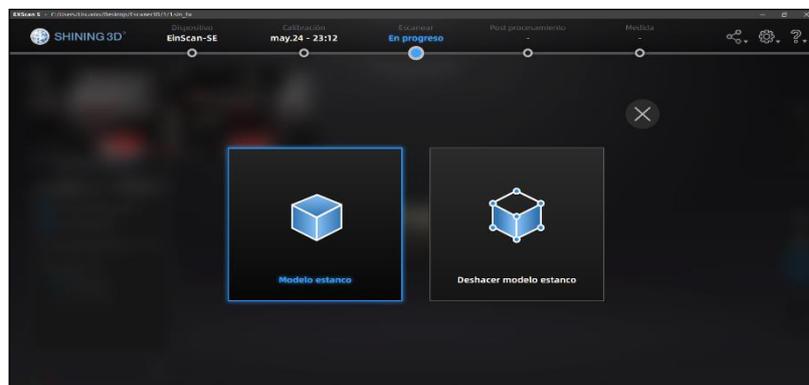


Figura 3-21: Ajuste de la edición del modelo.

5. Se selecciona el grado de detalle de la pieza.

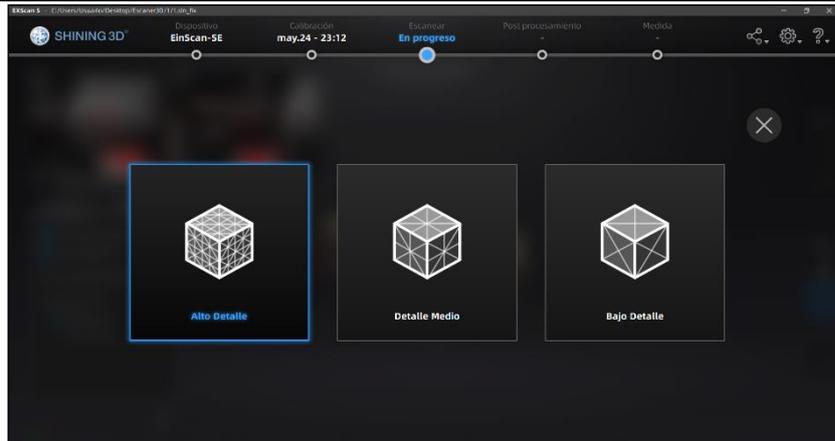


Figura 3-22: Ventana de selección del detalle.

6. Se obtiene la siguiente pieza tras el tratamiento:

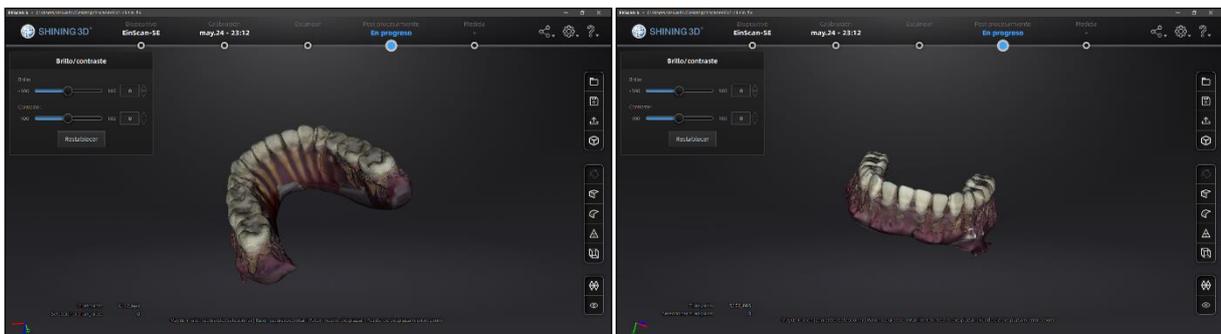


Figura 3-23: Pieza final tras el proceso de escaneo.

7. Mediante un tratamiento de imagen se consiguió un modelo digitalizado más real y fidedigno.

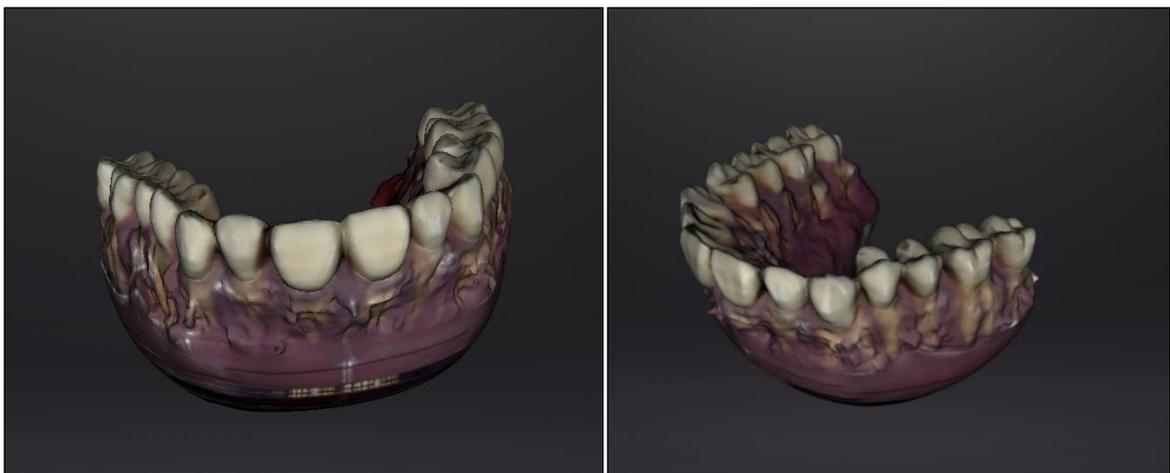


Figura 3-24: Phantom digital obtenido en el proyecto.

8. Dicho modelo se exporta a un formato .STL, para poder ser leído mediante el software libre que ofrece Autodesk llamado Meshmixer. Este programa se basa en el modelado de

superficies para diseñar cualquier tipo de pieza a partir de otro modelo, generando previamente una malla de triángulos.

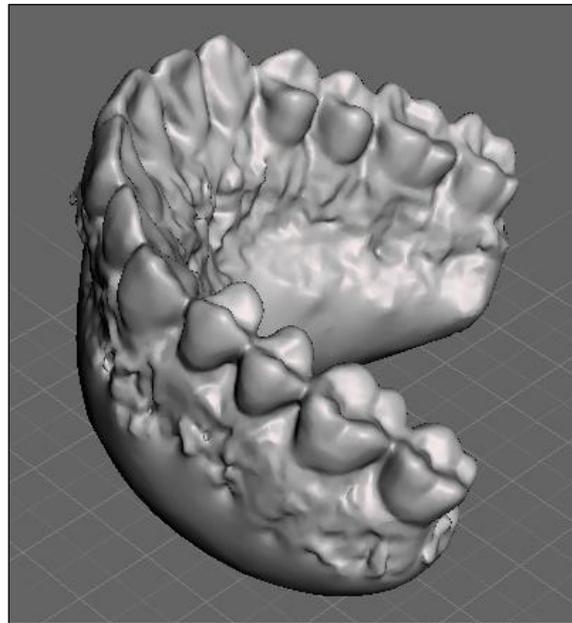


Figura 3-25: Digitalización mediante el programa Meshmixer.

9. A partir de este modelo, y con las herramientas que ofrece el programa, se puede aislar el fallo y generar un scaffold para imprimirlo y adherirlo al paciente.



## ❖ **CAPÍTULO: BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Derby, "Printing and prototyping of tissues and scaffolds," *Science*, vol. 338, no. 6109. American Association for the Advancement of Science, pp. 921–926, Nov. 16, 2012. doi: 10.1126/science.1226340.
- [2] A. J. Robson, "Complex Evolutionary Systems and the Red Queen," *The Economic Journal*, vol. 115, no. 504, pp. F211–F224, Jun. 2005, doi: 10.1111/j.1468-0297.2005.01002.x.
- [3] J. L. Ocaña, "Las Tecnologías de Fabricación Aditiva: Oportunidades y Retos para la Industria."
- [4] Y. Yang *et al.*, "Recent Progress in Biomimetic Additive Manufacturing Technology: From Materials to Functional Structures," *Advanced Materials*, vol. 30, no. 36, p. 1706539, Sep. 2018, doi: 10.1002/adma.201706539.
- [5] Manuel Rus García and Alberto Hernando Juanas, "Introducción a la Impresión 3D ," 2014. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4766256> (accessed Apr. 01, 2021).
- [6] P. X. Ma, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 2. Elsevier, pp. 184–198, Jan. 14, 2008. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.041.
- [7] Y. Zhu *et al.*, "3D printing biomimetic materials and structures for biomedical applications," *Bio-Design and Manufacturing*, vol. 4, no. 2. Springer, pp. 405–428, Jun. 01, 2021. doi: 10.1007/s42242-020-00117-0.
- [8] *INFORME DE LA OMPI SOBRE PATENTES Organización Mundial de la Propiedad Intelectual*. 2007.
- [9] "La OMPI publica la solicitud de patente número tres millones en el marco del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT)." [https://www.wipo.int/wipo\\_magazine/es/2017/01/article\\_0001.html](https://www.wipo.int/wipo_magazine/es/2017/01/article_0001.html) (accessed Apr. 11, 2021).
- [10] "USO DE ACRILONITRILO BUTADIENO ESTIRENO POST CONSUMO EN LA OBTENCION DE DERIVADOS POLIMERICOS CON VALOR AGREGADO | Request PDF." [https://www.researchgate.net/publication/340662085\\_USO\\_DE\\_ACRILONITRILO\\_BUTADIENO\\_ESTIRENO\\_POST\\_CONSUMO\\_EN\\_LA\\_OBTENCION\\_DE\\_DERIVADOS\\_POLIMERICOS\\_CON\\_VALOR\\_AGRGADO](https://www.researchgate.net/publication/340662085_USO_DE_ACRILONITRILO_BUTADIENO_ESTIRENO_POST_CONSUMO_EN_LA_OBTENCION_DE_DERIVADOS_POLIMERICOS_CON_VALOR_AGRGADO) (accessed Apr. 02, 2021).
- [11] I. Luis, A. García, I. T. Metropolitana, A. Melissa, and F. Ramírez, "Ana Melissa Franco Ramírez Institución Tecnológica Metropolitana ," pp. 69–78, 2015.
- [12] Martínez Palau, M. (2008). Síntesis, estructura y aplicaciones de poliésteres secuenciales derivados de ácido glicólico y w-hidroxiácidos. Universidad Politécnica de Ctalunya.
- [13] Marsal Boyer, È. (2009). Análisis de matrices 3D con arquitectura regular para ingeniería de tejidos. <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/8223>
- [14] "Polylactic Acid: PLA Biopolymer Technology and Applications - Lee Tin Sin - Google Libros." <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=atexWMS35UkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=polylactic+acid+pla+biopolymer+technology+and+applications&ots=cfwGY5UoRc&sig=Gxo9h6nsFmeMHqO8qP>

ZJvfWBjJA#v=onepage&q=polylactic acid pla biopolymer technology and applications&f=false (accessed Apr. 11, 2021).

[15] F. E. Javier Moleón Rodríguez GRADO ADMINISTRACIÓN Y DIRECCIÓN DE EMPRESAS TUTOR and D. E. José Ángel Miguel Dávila Catedrático, "PLAN DE NEGOCIO DE IMPRESIÓN 3D."

[16] M. Bucco, "La impresión 3D y su aplicación en los servicios médicos (prótesis, fármacos, órganos)," 2016.

[17] B. Derby, "Printing and prototyping of tissues and scaffolds," *Science*, vol. 338, no. 6109. American Association for the Advancement of Science, pp. 921–926, Nov. 16, 2012. doi: 10.1126/science.1226340.

[18] L. González Yeguas, "Estudio de la bioimpresión de hidrogeles aplicados a la generación de piel artificial mediante impresión laser BA-LIFT," 2020.

[19] F. Ghorbani *et al.*, "Bioprinting a cell-laden matrix for bone regeneration: A focused review," *J Appl Polym Sci*, vol. 138, no. 8, pp. 1–25, 2021, doi: 10.1002/app.49888.

[20] "La bioimpresión clave para la medicina del futuro".

[21] S. Vijayavenkataraman, W. C. Yan, W. F. Lu, C. H. Wang, and J. Y. H. Fuh, "3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 132. Elsevier B.V., pp. 296–332, Jul. 01, 2018. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.004.

[22] A. G. Tabriz, M. A. Hermida, N. R. Leslie, and W. Shu, "Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures," *Biofabrication*, vol. 7, no. 4, Dec. 2015, doi: 10.1088/1758-5090/7/4/045012.

[23] M. M. Pacheco *et al.*, "FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA CÁMARA CLIMÁTICA PARA EL DESARROLLO DE TÉCNICAS DE BIOIMPRESIÓN 3D", doi: 10.17979/spudc.9788497497565.0100.

[24] J. M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, and D. J. Burgess, "Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response," *AAPS Journal*, vol. 12, no. 2. Springer, pp. 188–196, Jun. 09, 2010. doi: 10.1208/s12248-010-9175-3.

[25] "The Williams Dictionary of Biomaterials - D. F. Williams - Google Libros." [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Hv45B7P5N3gC&oi=fnd&pg=PR5&ots=hPoU\\_jo3Xn&sig=f6ahRdDh0louKDaLbCXo4mwlZak&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Hv45B7P5N3gC&oi=fnd&pg=PR5&ots=hPoU_jo3Xn&sig=f6ahRdDh0louKDaLbCXo4mwlZak&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (accessed Apr. 03, 2021).

[26] E. Fournier, C. Passirani, C. N. Montero-Menei, and J. P. Benoit, "Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: Focus on brain biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 24, no. 19. Elsevier BV, pp. 3311–3331, Aug. 01, 2003. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00161-3.

[27] J. M. Anderson, "Biological Responses to Materials," *Annu Rev Mater Res*, vol. 31, no. 1, pp. 81–110, Aug. 2001, doi: 10.1146/annurev.matsci.31.1.81.

[28] A. S. H. F. J. S. J. E. L. Buddy D. Ratner, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine - Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons - Google Libros.*

- [29] J. M. Anderson and J. J. Langone, "Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 57, no. 2, pp. 107–113, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0168-3659(98)00178-3.
- [30] J. E. Babensee, J. M. Anderson, L. V. McIntire, and A. G. Mikos, "Host response to tissue engineered devices," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 33, no. 1–2. Elsevier Sci B.V., pp. 111–139, Aug. 03, 1998. doi: 10.1016/S0169-409X(98)00023-4.
- [31] D. F. Williams, "Tissue-biomaterial interactions," *Journal of Materials Science*, vol. 22, no. 10. Kluwer Academic Publishers, pp. 3421–3445, Oct. 1987. doi: 10.1007/BF01161439.
- [32] J. Groll *et al.*, "Biofabrication: Reappraising the definition of an evolving field," *Biofabrication*, vol. 8, no. 1. Institute of Physics Publishing, p. 013001, Jan. 08, 2016. doi: 10.1088/1758-5090/8/1/013001.
- [33] M. Fritz *et al.*, "Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates," *Nature*, vol. 371, no. 6492, pp. 49–51, 1994, doi: 10.1038/371049a0.
- [34] I. Angelopoulos, M. C. Allenby, M. Lim, and M. Zamorano, "Engineering inkjet bioprinting processes toward translational therapies," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, no. 1. John Wiley and Sons Inc., pp. 272–284, Jan. 01, 2020. doi: 10.1002/bit.27176.
- [35] I. Matai, G. Kaur, A. Seyedsalehi, A. McClinton, and C. T. Laurencin, "Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering," *Biomaterials*, vol. 226. Elsevier Ltd, p. 119536, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536.
- [36] B. Guillotin *et al.*, "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization," *Biomaterials*, vol. 31, no. 28, pp. 7250–7256, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.055.
- [37] J. M. Bourget *et al.*, "Patterning of Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells by Laser-Assisted Bioprinting to Study Cell Migration," *Biomed Res Int*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/3569843.
- [38] E. Roddy, M. R. DeBaun, A. Daoud-Gray, Y. P. Yang, and M. J. Gardner, "Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives," *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*, vol. 28, no. 3. Springer-Verlag France, pp. 351–362, Apr. 01, 2018. doi: 10.1007/s00590-017-2063-0.
- [39] V. L. Zizzari, S. Zara, G. Tetè, R. Vinci, E. Gherlone, and A. Cataldi, "Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review," *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, vol. 122, no. 4. Mosby Inc., pp. 392–402, Oct. 01, 2016. doi: 10.1016/j.oooo.2016.04.010.
- [40] H. Li, C. Tan, and L. Li, "Review of 3D printable hydrogels and constructs," *Mater Des*, vol. 159, pp. 20–38, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.matdes.2018.08.023.
- [41] P. D. Teerdha, M. Admali, K. Smriti, K. Pentapati, R. Vineetha, and S. Gadicherla, "3D Bio-Printing-A review on current application and future prospects in dentistry," *undefined*, 2019.

- [42] S. Ji and M. Guvendiren, "Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, no. APR. Frontiers Media S.A., p. 23, Apr. 05, 2017. doi: 10.3389/fbioe.2017.00023.
- [43] I. T. Ozbolat, "Scaffold-Based or Scaffold-Free Bioprinting: Competing or Complementing Approaches?," *J Nanotechnol Eng Med*, vol. 6, no. 2, May 2015, doi: 10.1115/1.4030414.
- [44] A. Gilpin and Y. Yang, "Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications," *BioMed Research International*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017. doi: 10.1155/2017/9831534.
- [45] J. Li, M. Chen, X. Fan, and H. Zhou, "Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects," *J Transl Med*, vol. 14, no. 1, Sep. 2016, doi: 10.1186/s12967-016-1028-0.
- [46] P. D. A. Teerdha, M. Admali, K. Smriti, K. C. Pentapati, R. Vineetha, and S. Gadicherla, "3D Bio-Printing-A review on current application and future prospects in dentistry," *Journal of International Dental and Medical Research*, vol. 12, no. 3, pp. 1202–1210, Jan. 2019.
- [47] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold design for bone regeneration," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 14, no. 1. NIH Public Access, pp. 15–56, Jan. 2014. doi: 10.1166/jnn.2014.9127.
- [48] A. N. Leberfinger, D. J. Ravnic, A. Dhawan, and I. T. Ozbolat, "Concise Review: Bioprinting of Stem Cells for Transplantable Tissue Fabrication," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 6, no. 10. John Wiley and Sons Ltd., pp. 1940–1948, Oct. 01, 2017. doi: 10.1002/sctm.17-0148.
- [49] T. Wang, L. Chen, T. Shen, and D. Wu, "Preparation and properties of a novel thermo-sensitive hydrogel based on chitosan/hydroxypropyl methylcellulose/glycerol," *Int J Biol Macromol*, vol. 93, no. Pt A, pp. 775–782, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.038.
- [50] S. Burkert, T. Schmidt, U. Gohs, H. Dorschner, and K. F. Arndt, "Cross-linking of poly(N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 76, no. 8–9, pp. 1324–1328, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.radphyschem.2007.02.024.
- [51] X. Guan *et al.*, "Development of hydrogels for regenerative engineering," *Biotechnology Journal*, vol. 12, no. 5. Wiley-VCH Verlag, May 01, 2017. doi: 10.1002/biot.201600394.
- [52] X. Bai, M. Gao, S. Syed, J. Zhuang, X. Xu, and X. Q. Zhang, "Bioactive hydrogels for bone regeneration," *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 4. KeAi Communications Co., pp. 401–417, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.05.006.
- [53] X. Guan *et al.*, "Development of hydrogels for regenerative engineering," *Biotechnology Journal*, vol. 12, no. 5. Wiley-VCH Verlag, May 01, 2017. doi: 10.1002/biot.201600394.
- [54] "Validación, D. S. De, I. De, and U. N. Biomaterial, "UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA CARRERA DE INGENIERÍA MECÁNICA," 2016.
- [55] M. Morales, F. David, and M. Martín, "Magda Sbant."
- [56] J. Intelisano, "Mecánica de Fluidos Frank M. White.pdf."

- [57] G. Bracco and B. Holst, "Surface science techniques," *Springer Series in Surface Sciences*, vol. 51, no. 1, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-34243-1.
- [58] "PIJUSH K. KUNDU O IRA M. COHEN."
- [59] J. D. Berry, M. J. Neeson, R. R. Dagastine, D. Y. C. Chan, and R. F. Tabor, "Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 454. Academic Press Inc., pp. 226–237, Sep. 05, 2015. doi: 10.1016/j.jcis.2015.05.012.
- [60] J. H. Palma, "Desarrollo y estudio reológico de biotintas para una bioimpresora 3d," 2021. Accessed: Mar. 05, 2023. [Online]. Available: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/seminario/document/seminario\\_nFIS000105\\_Palma](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/seminario/document/seminario_nFIS000105_Palma)
- [61] T. G. Mezger, *The Rheology Handbook*. Vincentz Network, 2019. doi: 10.1515/9783748600367/HTML.
- [62] D. R. Picout and S. B. Ross-Murphy, "Rheology of biopolymer solutions and gels," *ScientificWorldJournal*, vol. 3, pp. 105–121, 2003, doi: 10.1100/TSW.2003.15.
- [63] K. W. Lee, S. Wang, B. C. Fox, E. L. Ritman, M. J. Yaszemski, and L. Lu, "Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 4, pp. 1077–1084, Apr. 2007, doi: 10.1021/BM060834V.
- [64] K. Nair *et al.*, "Characterization of cell viability during bioprinting processes," *Biotechnol J*, vol. 4, no. 8, pp. 1168–1177, 2009, doi: 10.1002/BIOT.200900004.
- [65] K. Sanaullah and A. Khan, "Rheological behavior and transport of molten polymers and gas–non-Newtonian fluids," *Advances in Sustainable Polymer Composites*, pp. 141–183, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-820338-5.00007-2.
- [66] "Objetivos conceptuales y metodológicos de la investigación histológica." [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1575-18132004000200007](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-18132004000200007) (accessed Apr. 03, 2021).
- [67] C. K. Schneider *et al.*, "Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 195–201, 2010. doi: 10.1038/nrd3052.
- [68] N. Cuende, "Andalusian Initiative for Advanced Therapies: Fostering Synergies," *Stem Cells Transl Med*, vol. 2, no. 4, pp. 243–245, Apr. 2013, doi: 10.5966/sctm.2013-0051.
- [69] M. E. Mavili, H. I. Canter, B. Saglam-Aydinatay, S. Kamaci, and I. Kocadereli, "Use of three-dimensional medical modeling methods for precise planning of orthognathic surgery," *Journal of Craniofacial Surgery*, vol. 18, no. 4, pp. 740–747, Jul. 2007, doi: 10.1097/scs.0b013e318069014f.
- [70] J. Faber, P. M. Berto, and M. Quaresma, "Rapid prototyping as a tool for diagnosis and treatment planning for maxillary canine impaction," *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, vol. 129, no. 4, pp. 583–589, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.ajodo.2005.12.015.

- [71] P. S. D'urso *et al.*, "Custom cranioplasty using stereolithography and acrylic," *Br J Plast Surg*, vol. 53, no. 3, pp. 200–204, 2000, doi: 10.1054/bjps.1999.3268.
- [72] L. Shor *et al.*, "Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering," *Biofabrication*, vol. 1, no. 1, 2009, doi: 10.1088/1758-5082/1/1/015003.
- [73] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science (1979)*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993, doi: 10.1126/science.8493529.
- [74] R. Roque, G. F. Barbosa, and A. C. Guastaldi, "Design and 3D bioprinting of interconnected porous scaffolds for bone regeneration. An additive manufacturing approach," *J Manuf Process*, vol. 64, pp. 655–663, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jmapro.2021.01.057.
- [75] L. Martín Gil Dirigido por M<sup>a</sup> Begoña García Cenador, "EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATA DIRIGIDO A LA REGENERACIÓN ÓSEA CON CÉLULAS MADRE OBTENIDAS DE PULPA DENTAL Review of an experimental model in rat aimed at bone regeneration with dental pulp stem cells."
- [76] R. E. Marx, "Bone and Bone Graft Healing," *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, vol. 19, no. 4, pp. 455–466, Nov. 2007. doi: 10.1016/j.coms.2007.07.008.
- [77] P. Katsimbri, "The biology of normal bone remodelling," *European Journal of Cancer Care*, vol. 26, no. 6. Blackwell Publishing Ltd, Nov. 01, 2017. doi: 10.1111/ecc.12740.
- [78] "Fisiología humana, 4e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical." <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1858> (accessed Apr. 05, 2021).
- [79] M. Liu and Y. Lv, "Reconstructing Bone with Natural Bone Graft: A Review of In Vivo Studies in Bone Defect Animal Model," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 12, p. 999, Dec. 2018, doi: 10.3390/nano8120999.
- [80] C. Garrido-Allepuz, E. Haro, D. González-Lamuño, M. L. Martínez-Frías, F. Bertocchini, and M. A. Ros, "A clinical and experimental overview of sirenomelia: Insight into the mechanisms of congenital limb malformations," *DMM Disease Models and Mechanisms*, vol. 4, no. 3. Dis Model Mech, pp. 289–299, May 2011. doi: 10.1242/dmm.007732.
- [81] L. Gentile, S. L. Iglesias, E. Lobos Centeno, F. Vanoli, and C. A. Allende Nores, "Defectos óseos diafisarios postraumáticos en la extremidad superior de niños," *Rev. Asoc. Argent. Ortop. Traumatol*, vol. 82, no. 4, pp. 287–293, 2017.
- [82] R. Marsell and T. A. Einhorn, "The biology of fracture healing," *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 551–555, 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.
- [83] S. M. Perren, "Evolution of the internal fixation of long bone fractures," *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, vol. 84, no. 8. British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, pp. 1093–1110, 2002. doi: 10.1302/0301-620X.84B8.13752.

- [84] L. C. Gerstenfeld, D. M. Cullinane, G. L. Barnes, D. T. Graves, and T. A. Einhorn, "Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation," *J Cell Biochem*, vol. 88, no. 5, pp. 873–884, Apr. 2003, doi: 10.1002/jcb.10435.
- [85] J. R. Lieberman and G. E. Friedlaender, "Bone Regeneration and Repair Bone Regeneration and Repair Biology and Clinical Applications," 2005.
- [86] T. J. Cho, L. C. Gerstenfeld, and T. A. Einhorn, "Differential temporal expression of members of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily during murine fracture healing," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 17, no. 3, pp. 513–520, 2002, doi: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513.
- [87] S.-K. Lee and J. Lorenzo, "Cytokines regulating osteoclast formation and function," *Curr Opin Rheumatol*, vol. 18, no. 4, pp. 411–418, Jul. 2006, doi: 10.1097/01.bor.0000231911.42666.78.
- [88] X. Yang, B. F. Ricciardi, A. Hernandez-Soria, Y. Shi, N. Pleshko Camacho, and M. P. G. Bostrom, "Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice," *Bone*, vol. 41, no. 6, pp. 928–936, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.bone.2007.07.022.
- [89] R. Marsell and T. A. Einhorn, "The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair.," *Injury*, vol. 40 Suppl 3, 2009, doi: 10.1016/s0020-1383(09)70003-8.
- [90] E. Tsiridis, N. Upadhyay, and P. Giannoudis, "Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules?," *Injury*, vol. 38, no. SUPPL. 1, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.injury.2007.02.006.
- [91] J. M. Kanczler and R. O. C. Oreffo, "Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone," *European Cells and Materials*, vol. 15. AO Research Institute Davos, pp. 100–114, 2008. doi: 10.22203/eCM.v015a08.
- [92] R. Marsell and T. A. Einhorn, "The biology of fracture healing," *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 551–555, 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.
- [93] I. Ullah, R. B. Subbarao, and G. J. Rho, "Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective," *Bioscience Reports*, vol. 35, no. 2. Portland Press Ltd, 2015. doi: 10.1042/BSR20150025.
- [94] A. Giuliani *et al.*, "Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications," *Stem Cells Transl Med*, vol. 2, no. 4, pp. 316–324, Apr. 2013, doi: 10.5966/sctm.2012-0136.
- [95] F. F. Demarco *et al.*, "Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells," *J Endod*, vol. 36, no. 11, pp. 1805–1811, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.joen.2010.08.031.
- [96] A. Jahanbin *et al.*, "Success of Maxillary Alveolar Defect Repair in Rats Using Osteoblast-Differentiated Human Deciduous Dental Pulp Stem Cells," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 74, no. 4, pp. 829.e1-829.e9, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.joms.2015.11.033.

- [97] E. Anitua, M. Troya, and M. Zaldueño, "Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine," *Cytotherapy*, vol. 20, no. 4. Elsevier B.V., pp. 479–498, Apr. 01, 2018. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.12.011.
- [98] X. B. Wu and R. Tao, "Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells," *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, vol. 11, no. 4. Firts Affiliated Hospital, pp. 360–371, 2012. doi: 10.1016/S1499-3872(12)60193-3.
- [99] "(PDF) PRINCIPIOS BÁSICOS EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA." [https://www.researchgate.net/publication/312029159\\_PRINCIPIOS\\_BASICOS\\_EN\\_REGENERACION\\_OSEA\\_GUIADA](https://www.researchgate.net/publication/312029159_PRINCIPIOS_BASICOS_EN_REGENERACION_OSEA_GUIADA) (accessed Apr. 11, 2021).
- [100] E. Fávaro-Pípi *et al.*, "Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats," *Photomed Laser Surg*, vol. 29, no. 5, pp. 311–317, May 2011, doi: 10.1089/pho.2010.2841.
- [101] V. López, "Trabajo Fin De Grado Sistemas De Liberación De Fármacos En Implantes Óseos.," p. 101, 2019.
- [102] V. Aguilar Gual., "Caracterización de scaffolds construidos con 3D printing mediante simulación computacional," pp. 06-09, 2015.
- [103] E. Gemeno, "Trabajo Fin De Grado Impresión 3D Para La Regeneración," pp. 1–21, 2019.
- [104] T. L. Bill Tseng, A. Chilukuri, S. C. Park, and Y. James Kwon, "Automated quality characterization of 3D printed bone scaffolds," *J Comput Des Eng*, vol. 1, no. 3, pp. 194–201, Jul. 2014, doi: 10.7315/JCDE.2014.019.
- [105] G. Turnbull *et al.*, "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 3. KeAi Communications Co., pp. 278–314, Sep. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [106] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, and H. Uludağ, "Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 80. Acta Materialia Inc, pp. 1–30, Oct. 15, 2018. doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.031.
- [107] L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson, and X. Jia, "Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair," *Acta Biomaterialia*, vol. 84. Acta Materialia Inc, pp. 16–33, Jan. 15, 2019. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.039.
- [108] B. P. Chan and K. W. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations," in *European Spine Journal*, Dec. 2008, vol. 17, no. SUPPL. 4, p. 467. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- [109] P. Rider, Ž. Kačarević, S. Alkildani, S. Retnasingh, R. Schnettler, and M. Barbeck, "Additive Manufacturing for Guided Bone Regeneration: A Perspective for Alveolar Ridge Augmentation," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 11, MDPI AG, p. 3308, Oct. 24, 2018. doi: 10.3390/ijms19113308.

- [110] G. Calabrese *et al.*, "Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151181, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151181.
- [111] D. Zhang, X. Wu, J. Chen, and K. Lin, "The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration," *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 1. KeAi Communications Co., pp. 129–138, Mar. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.08.004.
- [112] M. Vallet-Regí and D. Arcos, "Bioceramics for drug delivery," *Acta Mater*, vol. 61, no. 3, pp. 890–911, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.actamat.2012.10.039.
- [113] M. Mohammadi *et al.*, "Micro and nanotechnologies for bone regeneration: Recent advances and emerging designs," *Journal of Controlled Release*, vol. 274. Elsevier B.V., pp. 35–55, Mar. 28, 2018. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.01.032.
- [114] H. Chen, C. Wang, X. Zhu, K. Zhang, Y. Fan, and X. Zhang, "Fabrication of porous titanium scaffolds by stack sintering of microporous titanium spheres produced with centrifugal granulation technology," *Materials Science and Engineering C*, vol. 43, pp. 182–188, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.07.026.
- [115] A. Marino, C. Filippeschi, G. G. Genchi, V. Mattoli, B. Mazzolai, and G. Ciofani, "The Osteoprint: A bioinspired two-photon polymerized 3-D structure for the enhancement of bone-like cell differentiation," *Acta Biomater*, vol. 10, no. 10, pp. 4304–4313, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.05.032.
- [116] A. Marino *et al.*, "Two-Photon Lithography of 3D Nanocomposite Piezoelectric Scaffolds for Cell Stimulation," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 7, no. 46, pp. 25574–25579, Nov. 2015, doi: 10.1021/acsami.5b08764.
- [117] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, "Bone substitutes: an update.," *Injury*, vol. 36 Suppl 3, no. 3. Elsevier, pp. S20–S27, Nov. 01, 2005. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029.
- [118] K. Lee, E. A. Silva, and D. J. Mooney, "Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 8, no. 55. Royal Society, pp. 153–170, Feb. 06, 2011. doi: 10.1098/rsif.2010.0223.
- [119] T. Anada *et al.*, "Vascularized bone-mimetic hydrogel constructs by 3D bioprinting to promote osteogenesis and angiogenesis," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 5, p. 1096, Mar. 2019, doi: 10.3390/ijms20051096.
- [120] M. Orciani, M. Fini, R. Di Primio, and M. Mattioli-Belmonte, "Biofabrication and bone tissue regeneration: Cell source, approaches, and challenges," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, no. MAR. Frontiers Media S.A., p. 17, Mar. 23, 2017. doi: 10.3389/fbioe.2017.00017.
- [121] S. Stegen, N. van Gastel, and G. Carmeliet, "Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration," *Bone*, vol. 70, pp. 19–27, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.bone.2014.09.017.

- [122] D. Tang, R. S. Tare, L. Y. Yang, D. F. Williams, K. L. Ou, and R. O. C. Oreffo, "Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 83. Elsevier Ltd, pp. 363–382, Mar. 01, 2016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.024.
- [123] É. Lakatos, L. Magyar, and I. Bojtár, "Material properties of the mandibular trabecular bone," *J Med Eng*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/470539.
- [124] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Materials Today*, vol. 14, no. 3. Elsevier B.V., pp. 88–95, 2011. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [125] X. Bai, M. Gao, S. Syed, J. Zhuang, X. Xu, and X. Q. Zhang, "Bioactive hydrogels for bone regeneration," *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 4. KeAi Communications Co., pp. 401–417, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.05.006.
- [126] B. S. Kim, S. S. Yang, and C. S. Kim, "Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an  $\epsilon$ -polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 170, pp. 421–429, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.043.
- [127] F. Obregon, C. Vaquette, S. Ivanovski, D. W. Hutmacher, and L. E. Bertassoni, "Three-Dimensional Bioprinting for Regenerative Dentistry and Craniofacial Tissue Engineering," *J Dent Res*, vol. 94, no. 9 Suppl, pp. 143S-152S, Sep. 2015, doi: 10.1177/0022034515588885.
- [128] J. Han, D. S. Kim, H. Jang, H. R. Kim, and H. W. Kang, "Bioprinting of three-dimensional dentin–pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells," *J Tissue Eng*, vol. 10, May 2019, doi: 10.1177/2041731419845849.
- [129] J. Han, D. S. Kim, H. Jang, H. R. Kim, and H. W. Kang, "Bioprinting of three-dimensional dentin–pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells," *J Tissue Eng*, vol. 10, 2019, doi: 10.1177/2041731419845849.
- [130] "ColMA Lyophilizate - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/colma-lyophilizate/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [131] "LAP Photoinitiator- CELLINK." <https://www.cellink.com/product/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [132] "Agente de reconstitución A 30 ml - Cellink Global." <https://www.cellink.com/global/product/reconstitution-agent-a-30-ml/> (accessed Jun. 04, 2021).
- [133] "Reconstitution Agent P 50 ml - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/reconstitution-agent-p-50-ml/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [134] "Tampón de colágeno 5 ml - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/collagen-buffer-5-ml/> (accessed Jun. 04, 2021).
- [135] "Sodio Hidróxido lentejas (Reag. USP) para análisis, ACS, ISO - ITW Reagents." <https://itwreagents.com/iberia/es/product/sodio-hidroxido-lentejas-reag-usp-para-analisis-acs-iso/131687> (accessed Jun. 08, 2021).

- [136] “GelMA Lyophilizate - Cellink Global.” <https://www.cellink.com/global/product/gelma-lyophilizate/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [137] “HAMA Lyophilizate - CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/hama-lyophilizate/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [138] “CELLINK START - CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/cellink-start/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [139] “LEON3D.” <https://www.leon-3d.es/producto/pla-blanco-1-75mm-2/> (accessed Jun. 08, 2021).
- [140] A. K. Nguyen, P. L. Goering, R. K. Elespuru, S. S. Das, and R. J. Narayan, “The photoinitiator lithium phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) phosphinate with exposure to 405 nm light is cytotoxic to mammalian cells but not mutagenic in bacterial reverse mutation assays,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 7, pp. 1–13, Jul. 2020, doi: 10.3390/polym12071489.
- [141] “Reconstitution Agent P - Cellink Global.” <https://www.cellink.com/global/product/reconstitution-agent-p-50-ml/> (accessed Jun. 04, 2021).
- [142] “DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS.” <http://www.ehu.es/biomoleculas/buffers/buffer.htm> (accessed Jun. 04, 2021).
- [143] “Hidróxido de sodio,” 17AD.
- [144] N. Bodenberger, D. Kubiczek, and F. Rosenau, “Easy manipulation of architectures in protein-based hydrogels for cell culture applications,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2017, no. 126, p. 55813, Aug. 2017, doi: 10.3791/55813.
- [145] “Ácido poliláctico (PLA) | Textos Científicos.” <https://www.textoscientificos.com/polimeros/acido-polilactico> (accessed Jun. 01, 2021).
- [146] “Balanzas de laboratorio: Análisis y precisión.” <https://www.balanzasdigitales.com/blog/9/usos-de-balanzas/13/balanzas-de-laboratorio-analisis-y-precision/> (accessed May 28, 2021).
- [147] “Impresora 3D Creality Ender 3 Pro, tienda oficial de impresoras 3D ender 3 pro – Creality3D Store® Official Store for Creality 3D Printers and Accessories.” <https://www.creality3dofficial.com/es/products/creality-ender-3-pro-3d-printer> (accessed May 29, 2021).
- [148] “BIO X™ 3D bioprinter - Cellink Global.” <https://www.cellink.com/global/bioprinting/bio-x-3d-bioprinter/> (accessed May 28, 2021).
- [149] “Bioimpresora 3D BIO X | AbaTec Distribuidor de Equipo para Laboratorio.” <https://www.abatec.com.mx/bioimpresora-3d-bio-x/> (accessed May 28, 2021).
- [150] Medical 3D. Bioimpresoras 3D. Retrieved March 29, 2023, from <https://medical3d.co/bioimpresoras-3d/>

- 
- [151] “Shining 3D | EINSCAN-SE | Sicnova.” <https://tienda.sicnova3d.com/einscan-s-se-y-sp/2842-einscan-se> (accessed May 29, 2021).
- [152] “Kinexus pro+ - NETZSCH Análisis & Ensayo.” <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/es/productos-soluciones/reologia/kinexus-pro/> (accessed Jun. 09, 2021).
- [153] “Medidor pH GLP 21 - Crison Instruments.” <http://www.crisoninstruments.com/es/laboratorio/medidor-de-ph-/medidor-de-ph-de-sobremesa/Medidor-pH-glp-21> (accessed May 29, 2021).
- [154] Digital Hotplate Stirrers – Benchmark Scientific.” <https://www.benchmarkscientific.com/rpproducts/digital-hotplate-stirrers/> (accessed May 28, 2021).
- [155] G. Lyophilizate, “Reconstitution Protocol Protocol aim.” 2020.
- [156] C. Lyophilizate, “Reconstitution Protocol Protocol aim,” 2020.
- [157] “Aoralscan | shining3ddental.com.” <https://www.shining3ddental.com/solution/intraoral-scanner/> (accessed Jun. 01, 2021).
- [158] “CELLINK | First Bioink Company | Pharmaceuticals Bioprinting Industry.” <https://www.cellink.com/global/> (accessed May 31, 2021).

## ❖ **CAPÍTULO 4: RESULTADOS**



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Evolución de la bioimpresión y aplicaciones actuales



International Journal of Bioprinting

#### REVIEW ARTICLE

### Evolution of bioprinting and current applications

Laura Mendoza-Cerezo<sup>1</sup>, Jesús M. Rodríguez-Rego<sup>1\*</sup>, Antonio Macías-García<sup>2</sup>, Alfonso C. Marcos-Romero<sup>1</sup>,  
Antonio Díaz-Parralejo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Expresión Gráfica, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Extremadura,  
Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales, Escuela de Ingenierías Industriales,  
Universidad de Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

**Keywords:** *Bioprinting; 3D printing; Tissue engineering; Organ culture; Tissue regeneration*

---

## Resumen

La bioimpresión es una herramienta muy útil que ofrece grandes posibilidades en diferentes campos de la ciencia y la biotecnología. En medicina, los avances de la bioimpresión están centrados en la impresión de células y tejidos para la regeneración de la piel y en la fabricación de órganos humanos viables (corazones, riñones, huesos, etc.). En esta review se repasan cronológicamente algunos de los acontecimientos más relevantes de esta técnica de fabricación aditiva y de su estado actual. Para su elaboración se realizó una búsqueda en las bases de SCOPUS, WOS y PUBMED, y se encontraron un total de 31,603 papers, de los cuales fueron finalmente escogidos 119 para analizar información. Estos artículos recogen los avances más importantes de esta técnica a nivel médico, las aplicaciones y las posibilidades en la actualidad. Finalmente, se exponen algunas conclusiones sobre el empleo de la bioimpresión y las expectativas que genera en un mundo donde las tecnologías avanzan cada vez más rápido.

**Palabras clave:** Bioprinting, cell 3D printing, tissue engineering, organ, tissue regeneration

### 4.1.1 Introducción

#### 1. Realización del estudio

Para la realización del siguiente estudio se accedió a las principales bases de datos bibliográficas y de revistas científicas como son SCOPUS, WOS y PUBMED. En ellas se analizaron los artículos necesarios para la realización de esta review.

En primer lugar, se realizó una búsqueda global en las tres bases de datos con los siguientes criterios:

- Publicaciones en inglés (sólo se seleccionaron publicaciones en este idioma)
- Papers relacionados con Bioimpresión 3D
- Materiales para bioimpresión 3D
- Técnicas de bioimpresión

Se obtuvo un total de 31,603 resultados, quedando 17,603 al eliminar los duplicados.

Se excluyeron un total de 8,244 artículos y se descartaron 4,863 artículos por tratarse de otras reviews o por pertenecer a campos de estudio no relacionados con la bioimpresión.

Finalmente, se obtuvieron un total de 853 artículos, de los cuales se seleccionaron 119 para analizar la información necesaria para realizar esta review.

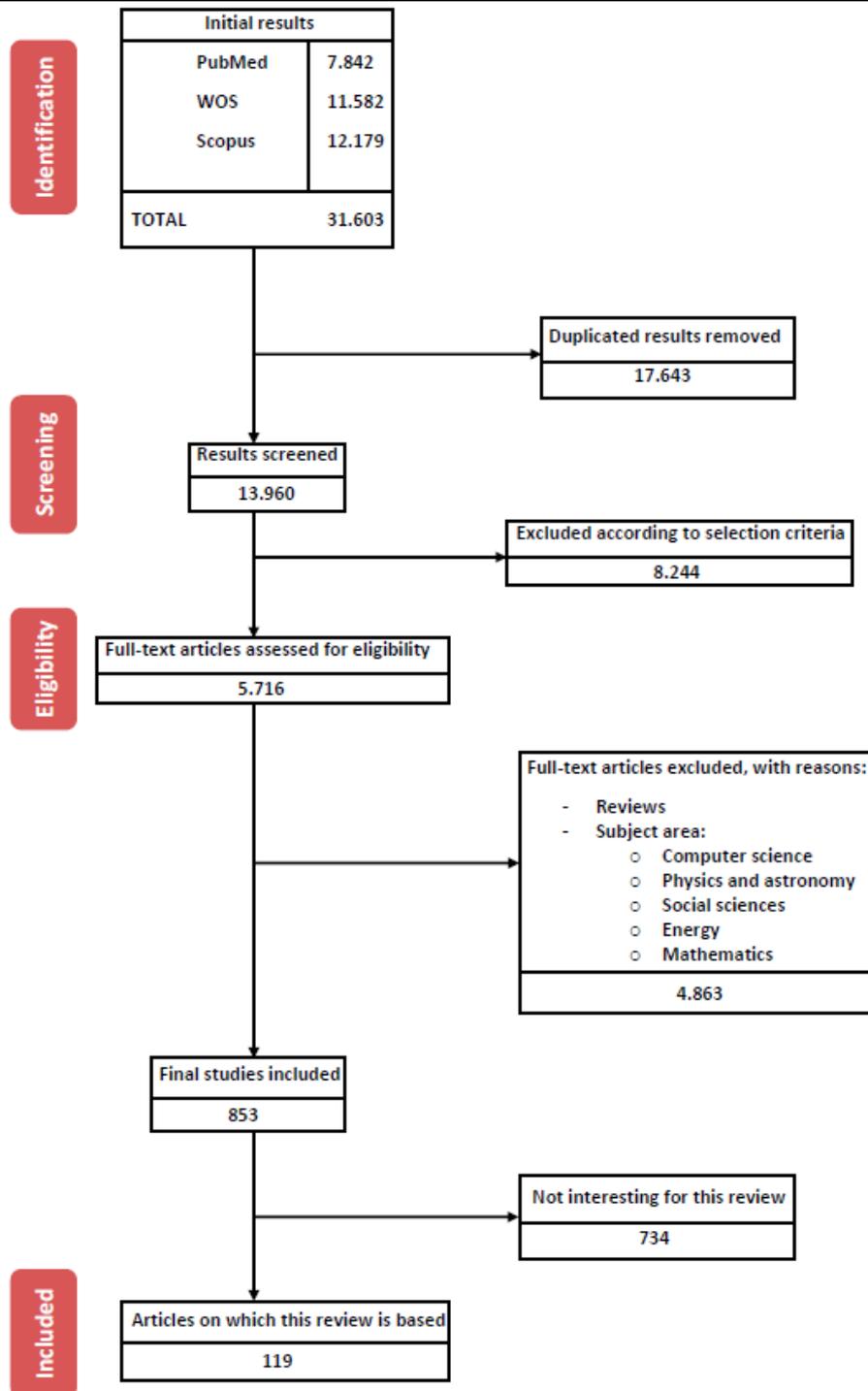


Figura 4-1: Diagrama de flujo PRISMA que muestra la búsqueda bibliográfica, el proceso de exclusión, los criterios de elegibilidad y los documentos finales incluidos. Se incluyeron 19 artículos sin restricción de fecha de publicación.

De las 119 publicaciones seleccionadas, 117 son artículos. Un estudio de estas publicaciones escogidas por años nos muestra que, en los años 2004, 2009, 2016 y 2018, se realizó un elevado número de publicaciones científicas relevantes en el campo de la bioimpresión aplicada a la medicina.

A partir del año 2019 se produce un descenso en el número de artículos estudiados para esta review debido a que no plantean descubrimientos relevantes. Además, debido a la pandemia producida por el SARS-CoV-2, a partir del año 2020 observa un importante descenso en la publicación de artículos de investigación propia, y un aumento considerable de artículos de revisión.

A pesar de ello, en la figura 3-2 se puede observar una tendencia general ascendente en el número de publicaciones importantes en función del avance de los años.

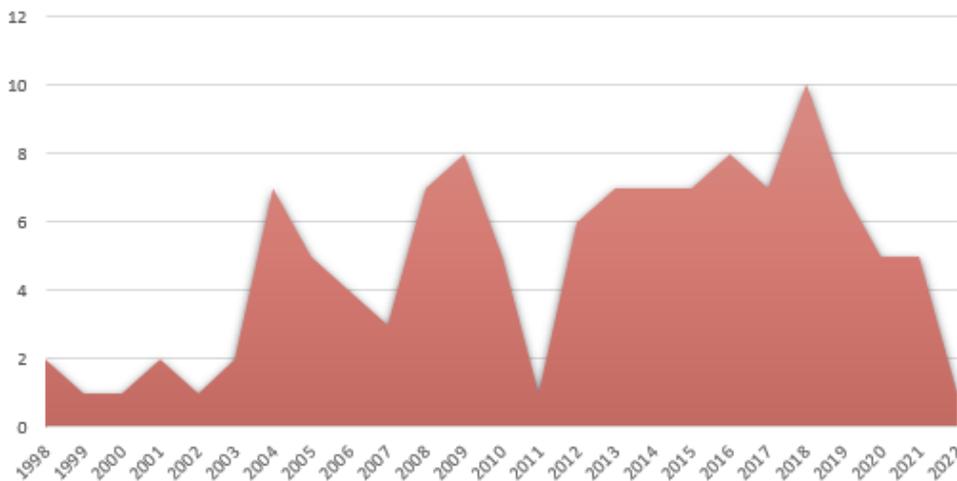


Figura 4-2: número de publicaciones estudiadas por fecha de publicación de las 119 publicaciones estudiadas.

## 2. Estudio de la bioimpresión en el mundo

El análisis de los artículos en función del lugar de publicación nos muestra que la mayoría de los estudios se llevaron a cabo en Estados Unidos, seguido de China, Alemania y Reino Unido.

Este apartado pone de manifiesto que son los países más desarrollados los que lideran las investigaciones en un campo tan importante como la bioimpresión.

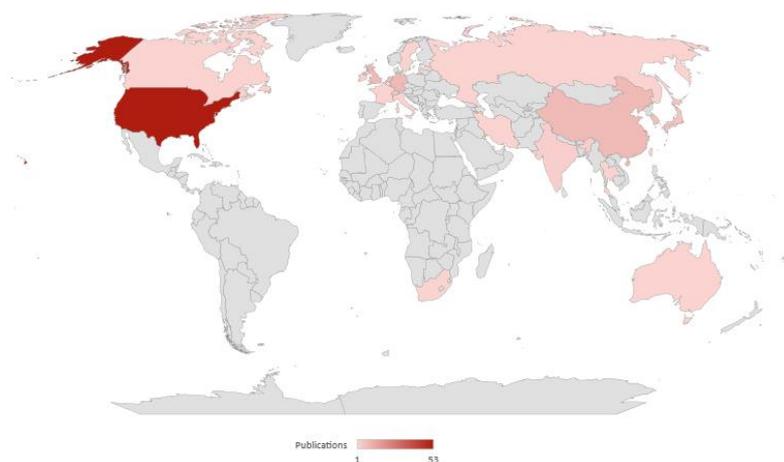


Figura 4-3: Mapa representativo del número de publicaciones por cada país, en función de los 117 artículos elegidos. Se pueden observar: Estados Unidos (53), China (8), Alemania (8), Reino Unido (8), Países Bajos (7), Corea del Sur (6), Japón (5), India (2), Israel (2), Beirut (1), Sudáfrica (1), Canadá (1), Qatar (1), Rusia (1), Australia (1), Suecia (1), Bélgica (1), Francia (1), Irlanda (1), Italia (1), Tailandia (1), Taiwán (1), Letonia (1), Irán (1).

### 3. Línea temporal

#### a. Inicios de la bioimpresión

La bioimpresión 3D, que se puede definir como una técnica utilizada para imprimir células vivas en un patrón prediseñado [1], es una tecnología innovadora que aún se encuentra en una etapa incipiente.

Los primeros intentos por lograr el crecimiento celular sobre una superficie tridimensional prefabricada, biodegradable y apta para su supervivencia comenzaron en el año 1998, cuando se modificó la superficie de polímeros biodegradables de ácido poliláctico (PLA) mediante el empleo de poli-óxido de etileno (PEO) y poli-óxido de propileno (PPO) para lograr la adherencia a su superficie de células hepáticas y fibroblastos [2].

Ese mismo año, se estudió la supervivencia y función de los hepatocitos en un nuevo *scaffold* de polímero biodegradable sintético tridimensional, con una red intrínseca de canales interconectados en condiciones de flujo continuo que permitían una adecuada difusión de oxígeno [3].

Es en el año 1999 cuando se comienza a pensar en la idea de reemplazar órganos dañados o enfermos por tejidos artificiales provenientes de una combinación de células vivas y *scaffolds* biocompatibles, gracias a esfuerzos multidisciplinarios y a que existen cada vez más herramientas que permiten estudiar el control del comportamiento celular [4]. Durante el año 2000 ya se comienzan a idear metodologías de impresión basadas en microposicionamientos 3D de alta precisión con jeringas que pueden depositar volúmenes de hasta nanolitros [5].

En 2001 se demuestra la importancia de la determinación de las organizaciones espaciales de la superficie de los polímeros cuando van a ser modificados para ser empleados como *scaffolds* [6], así como la influencia de la porosidad y del tamaño de los poros en dichos *scaffolds* para una correcta formación de tejido [7].

A partir del año 2002 comenzaron los estudios sobre la fabricación célula a célula de un tejido vivo mediante el empleo de pulsos láser de baja energía para lograr la construcción de tejidos 3D complejos, como células vivas de mamíferos, proteínas activas, materiales de matriz extracelular o materiales para *scaffolds* semirrígidos [8].

#### b. Despegue de la bioimpresión

En el año 2003 se publica el primer artículo que unifica los conceptos de impresión de células capa por capa sobre un gel termorreversible para formar órganos en 3D en el futuro, y que propone esta metodología como posible solución a la crisis de los trasplantes de órganos [9], para posteriormente introducir, de la mano de los mismos investigadores, la posibilidad de emplear geles 3D termosensibles para generar capas secuenciales para la impresión celular [10].

El concepto de bioimpresión aparece por primera vez en el año 2004, cuando se llevó a cabo el desarrollo de un sistema de 12 eyectores piezoeléctricos capaces de imprimir materiales biológicos mediante eyección de gotas en una plataforma XY que permitía la impresión de cualquier patrón deseado [11].

Numerosos artículos sobre diferentes técnicas de impresión 3D aplicadas a materiales biológicos fueron descritos a lo largo de ese año [12]–[17]

A partir de entonces se pudo observar que las células viables se podían imprimir utilizando algo tan sencillo como las impresoras comerciales de inyección de tinta, donde múltiples boquillas serían capaces de crear estructuras arbitrarias conformadas por tipos de células mixtas [18].

Es en ese momento cuando la bioimpresión fue conformándose como una meta de investigación que cada vez cobraba más importancia, hasta el punto de realizarse el Taller Internacional sobre Bioimpresión, Biodiseño y Bioensamblaje en la Universidad Médica de Carolina del Sur, dándose su segunda edición en el año 2005 [19]. Se llevaron también a cabo diversos estudios para la realización de *scaffolds* biocompatibles con la regeneración de tejido óseo [20], [21].

La primera impresión asociada a la encapsulación de células en hidrogeles se produjo en el año 2006, mediante la bioimpresión de células hepáticas para la realización de un modelo *in vitro* con fines de estudios farmacocinéticos [22]

En ese mismo año, se puede observar una creciente demanda de la posibilidad de ensamblar diferentes materiales biológicos relevantes formando organizaciones jerárquicas tridimensionales prescritas con el objetivo de recrear tejidos multicelulares y órganos, y se producen nuevos desarrollos en procesos de transferencia de materiales en escalas de micrómetros y nanómetros [23].

Además, se celebra el Primer Simposio Anual de Bioimpresión de Charleston, organizado por el Centro de Investigación de Bioimpresión de la Universidad Médica de Carolina del Sur. En él se demostró que, aunque aún quedan muchos desafíos tecnológicos, la bioimpresión de órganos es una tecnología factible que evoluciona rápidamente [24].

Durante el año 2007 se comenzaron a redactar artículos sobre el gran potencial de esta tecnología y sus posibilidades en la ingeniería de tejidos [25][26], además de celebrarse nuevos simposios al respecto [27], mientras que en el año 2008 ya se empieza a vislumbrar la importancia que cobra la investigación de la regeneración ósea usando la bioimpresión debido a que aparecen múltiples estudios sobre ello y sobre el uso de la hidroxiapatita en los *scaffolds* [28]–[33].

En 2009 se consiguió desarrollar, mediante impresión 3D, un implante multifármaco con isoniazida y rifampicina de liberación programada para tratar la tuberculosis ósea, lo cual implica otra importante posibilidad de aplicación para esta tecnología [34].

También se realiza la impresión directa de células vivas en gel de alginato con un sistema de impresión por inyección de tinta [35], y se logra la recreación de injertos de piel mediante la impresión de precursores de hidrogel de colágeno, fibroblastos y queratinocitos [36].

Aparecen las tintas fotopolimerizables [37], [38], y se logra la bioimpresión de microvasculatura [39] y también de tejido vascular sin empleo de *scaffolds* [40].

A lo largo del año 2010 se continúa el desarrollo de la impresión láser de alto rendimiento de células y biomateriales [41], y se establece el empleo de hidrogeles como el material preciso para el futuro desarrollo de técnicas de biofabricación directa [42], [43].

Se logra la biofabricación de un análogo tridimensional de tejido hepático a microescala para evaluar perfiles farmacocinéticos [44].

En 2011 se desarrolló una bioimpresora bastante parecida a las actuales de inyección, ya que su mecanismo se basaba en la inyección de tinta a medida capa por capa a partir de datos de imágenes complejas, pudiendo imitar mucho mejor la conformación de las estructuras tisulares [45].

En el año 2012 se estudia la posibilidad de emplear en bioimpresión las células derivadas del líquido amniótico, con resultados bastante positivos en el tratamiento de heridas aumentando la tasa de angiogénesis en comparación con la aplicación única de células mesenquimales o de gel de fibrocolágeno [46].

También se demuestra la gran importancia de dotar a los tejidos de ingeniería tridimensional de canales vasculares perfundidos, solucionando el problema de necrosis nuclear al que se veían sometidos los tejidos densamente poblados que carecían de los mismos [47].

Comienza a descubrirse la importancia de dopantes en hidrogeles, como pueden ser la sílice y el óxido de zinc en los *scaffold* de fosfato tricálcico, lo cual permite una proliferación celular más rápida que en los *scaffold* de fosfato tricálcico puro [48].

Además, se comprueba la posibilidad de impresión de tejido cardíaco con una combinación de biomateriales y células progenitoras de cardiomiocitos, con buenos resultados [49], así como la impresión 3D de una válvula aórtica [50].

#### c. Primeros logros de la bioimpresión

En el año 2013 se logró la creación de una férula bioabsorbible para vía aérea para tratar la traqueobroncomalacia que sufren algunos recién nacidos y les dificulta la respiración [51].

Se pudo comprobar también la viabilidad de fabricación de construcciones complejas de tejidos heterogéneos que contienen múltiples tipos de células utilizando tecnologías de impresión por inyección de tinta [52], y respecto a la bioimpresión asistida por láser, se logró la impresión 3D exitosa de una construcción celular con posterior formación de tejido *in vivo* para la creación de un tejido como la piel, que consta de diferentes tipos de células formando un patrón complejo [53].

Un hito muy importante fue la bioimpresión de una válvula aórtica heterogénea a través de hidrogeles de alginato y gelatina, demostrando que los conductos de hidrogel de válvula aórtica anatómicamente complejos y heterogéneamente encapsulados se pueden fabricar con bioimpresión 3D [54]. Comienza a descubrirse el potencial real de los hidrogeles en el campo de la bioimpresión, cobrando importancia el empleo de la gelatina metacrilatada (GelMA), que en exposición a la luz UV es capaz de aumentar su rigidez y las propiedades de hinchamiento, atribuyendo mejores propiedades mecánicas a la impresión [55].

Además, se logra la reproducción de una oreja humana mediante la impresión 3D de una matriz de hidrogel sembrada de células con una antena de bobina inductiva en su interior, lo cual proporciona capacidad de recepción de radiofrecuencia. Esto supone un gran avance en el desarrollo de tejidos biónicos y órganos [56].

En el año 2014 se logra desarrollar un método de impresión para construir canales vasculares en el interior de las estructuras impresas que permite mantener la viabilidad celular en tejidos más gruesos, permitiendo su crecimiento y maduración tras la impresión [57]–[59].

También se empezaron a llevar a cabo recreaciones de tumores para su estudio, como la impresión 3D de células Hela para así poder obtener un modelo de tumor cervical *in vitro* [60], y se demuestra que la presión y la forma de la aguja a la hora de bioimprimir afectan a la viabilidad celular [61].

Debido a la complejidad que presenta la composición de la matriz extracelular y de la gran función que cumple en el desarrollo y supervivencia celular, se empezaron a crear biotintas formadas de matriz extracelular descelularizada, siendo más específicas para cada tejido [62].

#### d. Avances: hacia la bioimpresión 4D

Durante el 2015 se demuestra que el refuerzo de los hidrogeles blandos con redes de microfibras de alta porosidad es capaz de aproximar la rigidez y elasticidad de la impresión a la del tejido del cartílago articular, ofreciendo una base para reproducir construcciones de tejido con compatibilidad biológica y mecánica [63].

De la misma manera, se estudió que una biotinta que incluía grafeno en su composición era adecuada para la adhesión, viabilidad, proliferación y diferenciación de células mesenquimales a tejido neurológico debido a su alta capacidad de conductividad [64].

Se vio la posibilidad del empleo de la biotinta de alginato con nanocelulosa, la cual posee unas excelentes propiedades de adelgazamiento por cizallamiento, como matriz para la impresión de tejido cartilaginoso [65], y para la impresión de este mismo tejido se desarrolló también otra biotinta compuesta de polietilenglicol, alginato de sodio y nanoarcilla que poseía una alta resistencia y viabilidad celular [66].

Un gran avance fue lograr la bioimpresión de células neuronales primarias encapsuladas conformando unas estructuras similares al cerebro mediante el empleo de goma gellan como biotinta [67], y comienzan a tener cada vez más relevancia los hidrogeles con propiedades mecánicas ajustables a través de la irradiación con luz [68].

Durante el 2016 se desarrolla una impresora integrada de órganos y tejidos, capaz de fabricar construcciones de tejidos estables a escala humana de cualquier forma, a través de la impresión de hidrogeles cargados de células junto con polímeros biodegradables [69], y en general se perfecciona cada vez más la impresión de tejidos complejos con buena vascularización [70], [71].

Toman importancia la combinación de diferentes hidrogeles, para lograr optimizar al máximo las propiedades de la estructura impresa [72].

Se logra el desarrollo de un modelo hepático biomimético en 3D que imita la característica organización morfológica de las células del hígado para ser empleado en reproducción de enfermedades y detección temprana de fármacos [73].

Se logró un método de bioimpresión para crear túbulos proximales renales humanos en 3D *in vitro* que están completamente incrustados dentro de una matriz extracelular y alojados en chips de tejido perfundibles, lo que les permite mantenerse durante más de dos meses [74], [75].

Se estudia el empleo de ondas de sonido a modo de “pinzas acústicas” para la manipulación precisa y no invasiva de células tanto individuales como en conjunto, con el fin de crear estructuras 2D y 3D [76].

En el año 2017 comienzan a realizarse controles *in vivo* de los tejidos bioimpresos mediante el empleo de sensores, como es por ejemplo la lectura electrónica no invasiva de las tensiones contráctiles y las respuestas a medicamentos de los tejidos cardíacos [77].

Se mejora la calidad de impresión del tejido cardíaco al prevascularizarlo antes de su implantación, consiguiendo una rápida vascularización tras su aplicación en forma de parche en el tejido afectado, y permitiendo reparar zonas infartadas [78].

Se logra el desarrollo de una técnica que permite realizar andamios morfológica y estructuralmente muy similares a la matriz extracelular mediante la autoaglomeración inducida térmicamente de nanofibras, electrohilando PLA y nanofibras de PCL [79].

Además, se comprueba la importancia de la geometría de los poros y el efecto que tienen sobre el comportamiento y la función de las células, llegando a conseguirse mediante *scaffolds* de 30° y 60° la restauración de tejido ovárico en ratones esterilizados, los cuales lograron tener descendencia por apareamiento natural [80].

La posibilidad de imprimir componentes vivos funcionales con bacterias permite obtener materiales que pueden realizar diferentes funciones, como es el caso de la impresión 3D de biotintas con *Acetobacter xylinum* y *Pseudomonas putida*, capaces de producir celulosa de uso médico y degradar contaminantes respectivamente al mismo tiempo [81].

Es importante destacar el desarrollo de una glándula tiroidea funcional de ratón capaz de normalizar los niveles de tiroxina en la sangre y de regular la temperatura corporal tras su injerto [82].

En el año 2018 continúa el perfeccionamiento de la bioimpresión de materiales destinados a la regeneración ósea [83], y el estudio de las posibles combinaciones de hidrogeles y de sus parámetros de impresión para obtener los mejores resultados posibles [84], [85].

Continúa el estudio del microambiente tumoral y su papel en la comunicación celular en el desarrollo del cáncer, para poder recrear de la manera más fidedigna posible este tipo de tejido mediante tecnologías de bioimpresión, y así lograr ensayos más específicos y realistas que permitan combatir la enfermedad [86].

Se consiguió la bioimpresión de un modelo de piel humana de un espesor completo, gracias al empleo de biotintas compuestas de matriz extracelular derivadas de la piel [87].

Nuevos estudios sobre el empleo del grafeno en la impresión 3D de tejido neuronal demostraron que promovía el crecimiento axonal y la remielinización tras una lesión en un nervio periférico, teniendo un gran potencial en aplicaciones preclínicas y clínicas [88].

Además, comienza la investigación sobre la posibilidad de producir prótesis corneales listas para trasplantar, y, aunque aún no se ha conseguido una estructura final adecuada, sí que se ha logrado una alta viabilidad celular de los queratocitos bioimpresos [89].

La bioimpresión de oligodendrocitos junto con células progenitoras neuronales espinales, impresas de una forma precisa y concreta, abriendo una puerta a la reconstrucción de conexiones axonales funcionales en áreas de daño tisular del sistema nervioso central [90].

En el año 2019 se descubre que el control de la gelificación impulsada por el pH proporciona una resolución de filamento de 20 micrómetros, una microestructura porosa que permite una rápida infiltración celular y microvascularización, y resistencia mecánica para la fabricación y perfusión de vasculatura en la regeneración del tejido cardíaco [91]. Se logra también la impresión de corazones humanos celularizados con una arquitectura natural gracias a la reprogramación de células para su diferenciación en cardiomiocitos y células endoteliales [92].

La impresión 3D de las estructuras del sistema nervioso central, difícil de conseguir debido a la gran complejidad de este, se hace posible a pequeña escala gracias a la impresión de proyección continua a microescala. Con estos *scaffolds* biomiméticos se logra la regeneración de axones dañados de la médula espinal de ratones, los cuales hacen sinapsis con las células progenitoras neurales del *scaffold* [93].

Se produce el desarrollo del “*tumor-on-a-chip*”, donde la reconstrucción de un tumor de glioblastoma a partir de células derivadas de un paciente reproduce la estructura, bioquímica y propiedades biofísicas del tumor nativo, pudiendo ser útil para la identificación de tratamientos efectivos [94].

Se desarrolla una bioimpresora de piel in situ, donde se imprimen las diferentes capas de piel directamente sobre el paciente, obteniendo como resultado un cierre rápido de la herida, una contracción reducida y una reepitelización acelerada [95].

Se demuestra que la impresión de *scaffolds* de matriz extracelular de cartílago, GelMA y exosomas derivados de células madre mesenquimales pueden ser un tratamiento eficaz contra la osteoartritis al regular la función mitocondrial que causa la enfermedad y facilitar la regeneración del cartílago [96].

Además, se descubre que gracias al diseño de músculos biomiméticos creados a base impresión 3D con células y biotintas derivadas de tejidos se puede mejorar el tratamiento de la pérdida volumétrica de masa muscular irrecuperable [97].

A lo largo del año 2020 se pudo observar una elevada ausencia de trabajos de investigación original, siendo la mayoría de ellos artículos de revisión.

Empiezan a realizarse reviews sobre la bioimpresión 4D, la cual integra el concepto de tiempo dentro de la tecnología de bioimpresión 3D tradicional como la cuarta dimensión y facilita la fabricación de arquitecturas biológicas funcionales y complejas [98]. Esto es posible gracias a que dichas estructuras impresas en 3D son capaces de producir cambios en su estructura tras recibir un determinado estímulo.

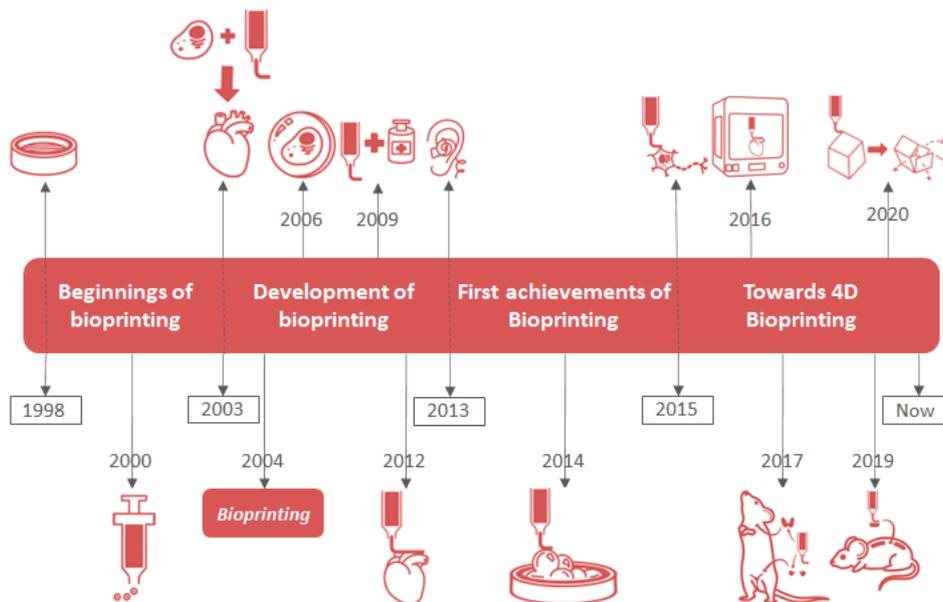
También comienza a haber más revisiones sobre la bioimpresión en el estudio del complejo microambiente tumoral, entendiendo mejor su funcionalidad con vistas a tratamientos personalizados para cada paciente [99], [100].

Se plantea por primera vez el uso de compuestos poloxámeros en la bioimpresión debido a sus propiedades de bioactividad, autoensamblaje dependiente de temperatura, comportamiento termorreversible y propiedades fisicoquímicas, las cuales los convierten en portadores de fármacos prometedores y buenos imitadores de varios tipos de tejido [101].

Se logra la impresión de un menisco preparado para su implantación[102].

A lo largo de los años 2021 y 2022 de nuevo abunda la publicación de reviews y de estudios sobre el empleo de matriz celular descelularizada en bioimpresión. Se observa un elevado número de artículos encaminados a la caracterización de los hidrogeles, impresiones de pequeñas partes de órganos que cada vez, gracias a todos los avances realizados cada año, comienzan a ser más funcionales, y, sobre todo, de pequeñas adiciones, modificaciones o cambios en los materiales para realizar una bioimpresión lo más similar posible a las estructuras biológicas reales.

Muchos de los estudios anteriormente nombrados continúan llevándose a cabo y evolucionando, dando lugar al desarrollo de nuevos protocolos con cambios importantes que nos acercan cada vez más a la realidad de emplear la bioimpresión en la medicina de forma rutinaria.



**Figura 4-4: Hitos relevantes en la evolución de la bioimpresión. 1998: crecimiento celular sobre estructura tridimensional prefabricada. 2000: metodologías basadas en nanodeposiciones con jeringuillas. 2003: planteamiento de la unión de células con hidrogeles para formar órganos. 2004: aparición del término “bioimpresión”. 2006: encapsulación de células en hidrogeles. 2009: unión de fármacos y bioimpresión. 2012: bioimpresión de tejido cardíaco. 2013: bioimpresión de oreja humana con bobina. 2014: bioimpresión con células Hela para estudios tumorales. 2015: bioimpresión de estructuras similares al cerebro con neuronas primarias encapsuladas. 2016: desarrollo de bioimpresora integrada de órganos y tejidos. 2017: bioimpresión de glándula tiroides y tejido ovárico funcionales en ratones. 2019: bioimpresión de scaffolds biomiméticos que permiten la regeneración de axones dañados de la médula espinal de ratones. 2020: comienzo de la bioimpresión 4D, gracias a la cual los elementos bioimpresos pueden cambiar tras reaccionar con el entorno. Fuente propia.**

#### 4. Principales aplicaciones de la bioimpresión

##### a. Regeneración de tejidos

El bajo nivel de donantes de órganos y tejidos a nivel mundial es un problema que se debe abordar, ya que por un lado hay que hacer frente a la alta demanda de dichos órganos y tejidos que existe y por otro a la necesidad del empleo de inmunosupresores durante largo tiempo tras la implantación de estos [103].

Por ello, se plantea cada vez más el uso de la bioimpresión como posible solución a dichos problemas, gracias a la cual los trasplantes son creados a partir de las células del propio paciente, esquivando la posible ausencia de donante o evitando el empleo de diferentes sustancias inmunosupresoras con efectos secundarios negativos.

Para lograr la creación de estos tejidos, la bioimpresión se basa en tres enfoques centrales: la biomimética, el autoensamblaje autónomo y los bloques de construcción de mini tejido [104].

- **Biomimetismo:** implica la fabricación de reproducciones idénticas de los componentes celulares y extracelulares de un tejido u órgano [105].
- **Autoensamblaje autónomo:** el autoensamblaje autónomo se basa en la célula como principal impulsor de la histogénesis, dirigiendo la composición, localización, propiedades funcionales y estructurales del tejido [106].
- **Bloques de construcción de mini tejido:** se pueden definir como el componente estructural y funcional más pequeño de un tejido. Hay dos estrategias principales: primero, las esferas celulares autoensambladas (similares a los minitejidos) se ensamblan en un macrotejido utilizando un diseño y una organización inspirados en la biología [107]. En segundo lugar, se diseñan reproducciones precisas y de alta resolución de una unidad de tejido y luego se les permite autoensamblarse en un macrotejido funcional. Ejemplos de estos enfoques incluyen el autoensamblaje de bloques de construcción vascular para formar redes vasculares ramificadas [108].

Para lograr llevar a cabo la reproducción de los diferentes tejidos u órganos a desarrollar es esencial conocer a la perfección la organización e interacción de sus componentes. Gracias a la tecnología de imagen médica se obtiene información de la estructura en 3D y de su funcionamiento a nivel celular, tisular, como órgano y como organismo.

Estos conocimientos ayudan a determinar los parámetros y condiciones óptimos para bioimprimir cada tipo de tejido y que sobreviva realizando sus funciones, facilitando cada vez más la posibilidad de recrear a la perfección el tejido que se pretende imitar con vistas a su posible implantación en el organismo.

#### b. Estudios farmacocinéticos

El proceso de fabricación de los fármacos puede llegar a ser muy largo, ya que desde su estudio en el laboratorio hasta su explotación comercial existen múltiples pasos que retrasan su salida al mercado y encarecen el proceso.

La impresión 3D y las técnicas de alto rendimiento no solo mejoraron el modelo del producto, sino que también redujeron el tiempo de fabricación, el costo de producción y su llegada a tiempo al mercado [109].

Esto se ha conseguido gracias a la inclusión de modelos de tejido bioimpreso en 3D para pruebas de drogas de alto rendimiento [110].

Dichos tejidos bioimpresos en 3D permiten una recreación lo más fidedigna posible del órgano diana en el cual van a actuar los fármacos, simulando *in vitro* la respuesta a la administración de estos medicamentos y pudiendo evaluar con mayor rapidez los resultados obtenidos. A través de la

integración de modelos de cultivo celular 3D *in vitro* con líneas celulares, se han lanzado diferentes avances como dispositivos de microfluidos y tejidos y órganos en un chip para recapitular las propiedades y funciones biológicas de los tejidos nativos, órganos y circulación humanos [111].

#### c. Estudio de enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas se han tratado tradicionalmente mediante el empleo de antibióticos, antifúngicos y antivirales, cuando el sistema inmunitario del huésped era insuficiente para combatir la infección por sí solo.

Por ello, comprender cómo es la respuesta del huésped a la entrada de patógenos, así como las diferentes interacciones que suceden entre ambos, es clave para lograr el correcto diseño y desarrollo de fármacos eficaces.

Tradicionalmente se han empleado cultivos 2D para poder comprender la interacción huésped-patógeno, pero en ellos las células no se encuentran expuestas a las mismas condiciones que en el organismo, y los estudios realizados en ellas, aunque útiles y absolutamente necesarios, no representan fielmente los procesos que se llevan a cabo en los tejidos *in vivo* [112].

Por ello, los modelos 3D pueden servir como mejor plataforma para el desarrollo de medicamentos y vacunas [113], ya que imitan el microambiente que se produce en el organismo mejor que los sistemas de cultivo 2D.

Un claro ejemplo de la utilidad de la bioimpresión contra las enfermedades infecciosas es la recreación de tejido respiratorio humano para estudiar la infección por SARS-CoV-2 y probar posibles medicamentos antivirales [114].

Gracias a ello, se descubrió mediante el empleo de organoides pulmonares y colónicos que no sólo las células del tracto respiratorio expresan el receptor ACE2, sino que varios tipos de células del colon también, siendo ambas permisivas para la entrada del virus [115].

Además, gracias a estos modelos, se descubrió la utilidad de varios fármacos ya existentes en la reducción de la infección por SARS-CoV-2 [115], mientras que se pudo ir desarrollando al mismo tiempo el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la COVID-19 [116].

#### d. Estudios tumorales

Al igual que ocurre en los estudios farmacocinéticos, la impresión de tejidos con ingeniería 3D puede ser de gran ayuda a la hora de combatir el cáncer.

A la hora de estudiar diferentes tumores, las estrategias empleadas en la actualidad pueden ver su eficiencia limitada, ya que, durante su estudio *in vitro*, las células podrían volverse inactivas o incluso adquirir nuevas mutaciones mientras crecen en el laboratorio [117].

En la actualidad, el proceso preclínico realizado para el desarrollo de fármacos se lleva a cabo evaluando *in vitro* la toxicidad o eficacia del fármaco a probar en un cultivo 2D seguido de estudios animales. Este tipo de cultivos, a pesar del gran valor que poseen en la investigación médica, no son compatibles con la arquitectura en tres dimensiones que posee el tejido tumoral en el cuerpo

humano, y no mantienen las diferentes funciones de los múltiples tipos de células que desempeñan un papel importante en la progresión de la enfermedad [118].

Por ello, la mejor opción para el desarrollo de terapias antitumorales es el empleo de la tecnología de la bioimpresión 3D, gracias a la cual es posible desarrollar las condiciones a las cuales se encuentran expuestas las células en los tumores, como la presión hidrostática, el esfuerzo de cizalla y la tensión y fuerzas de compresión, las cuales desempeñan funciones importantes en la regulación del comportamiento tisular y celular [119].

#### e. Líneas futuras

Uno de los grandes retos de la bioimpresión es asentarse como herramienta rutinaria en el campo de la medicina. En la actualidad, los estudios más relevantes son los relacionados con la regeneración de órganos y tejidos, siendo necesarias muchas investigaciones para lograr bioimprimir órganos completos y funcionales listos para su trasplante en pacientes reales. Se ha logrado ya la bioimpresión y posterior implantación en modelos animales de tejidos más sencillos, aunque queda mucho por investigar para lograr la correcta bioimpresión de tejidos más complejos.

Aun así, ya se ha comenzado a estudiar el siguiente paso: la bioimpresión 4D. La bioimpresión 4D consiste en la creación de estructuras tridimensionales que son capaces de responder a un estímulo cambiando de forma, color o función, entre otros cambios. Esto es de especial interés en la medicina debido a que estas estructuras podrían formar parte de implantes ortopédicos inteligentes, de métodos que administren fármacos de forma dirigida o de scaffolds inteligentes en ingeniería de tejidos. Esta es la nueva línea de investigación de la bioimpresión, que supondrá grandes avances en la ingeniería biomédica y aportará resultados para problemas actuales sin solución.

A pesar de los grandes avances realizados, los problemas a los que se enfrenta la bioimpresión son el elevado tiempo de procesamiento de las estructuras generadas, las cuales tardan en imprimirse y posteriormente deben mantenerse en unas condiciones muy específicas para tratar de lograr supervivencia celular e integridad estructural, y la incapacidad de crear directamente estructuras dinámicas que se parezcan más a los tejidos vivos del cuerpo, los cuales presentan grandes complejidades.

Es por ello que, además, se prevé la investigación continuada de los diferentes hidrogeles disponibles, de nuevas formulaciones y de las condiciones en las cuales se debe utilizar cada uno, para asegurar las condiciones que mejor aúnen buenas propiedades mecánicas con alta viabilidad celular. En un futuro estos descubrimientos permitirán disminuir el tiempo de impresión al mismo tiempo que se aumenta la viabilidad celular, además de lograr la similitud de los tejidos bioimpresos con los tejidos reales del organismo.

La bioimpresión 4D es la herramienta que, gracias a la mejora de los hidrogeles y sus condiciones de impresión, podría lograr ese aumento de funcionalidad de los tejidos bioimpresos al permitir la producción de cambios en los mismos como respuesta a estímulos externos.

### 4.1.2 Conclusiones

La bioimpresión es una herramienta con un desarrollo exponencial, en la que cada día que pasa se realizan nuevos e importantes descubrimientos. Dando sus primeros pasos en 1998 sin haber recibido aún ese nombre, y con la publicación de muy pocos artículos durante los años posteriores,

---

ha ido despertando poco a poco el interés de la comunidad científica hasta el punto de contar con más de 1,000 publicaciones cada uno de los dos últimos años.

Se ha podido observar que, en cuestión de pocos años, ha sufrido una enorme evolución que se mantendrá al alza debido a los grandes beneficios que se están obteniendo gracias a su uso, y se prevé su empleo en regeneración médica de forma rutinaria en centros hospitalarios y laboratorios.

Tras haber podido observar éxitos como la reconstrucción de tejidos in situ sobre el propio paciente obteniendo resultados excelentes en la regeneración de la piel [95], la reconstrucción de tejido ovárico que permite la gestación de descendencia de forma natural [80], la reconstrucción de una glándula tiroides capaz de normalizar los niveles de tiroxina en la sangre [82] o la regeneración de axones dañados de una médula espinal [93] solo cabe esperar que la evolución de la bioimpresión traiga finalmente terapias como la generación completa de órganos para trasplantes autólogos y soluciones a diferentes enfermedades que hoy en día carecen de cura.

Es por ello por lo que la bioimpresión supone una revolución en la medicina moderna gracias a los avances actuales y futuros, teniendo en cuenta las aplicaciones que aún quedan por descubrir.

### 4.1.3 BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. T. Ozbolat and Y. Yu, "Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 60, no. 3, pp. 691–699, 2013, doi: 10.1109/TBME.2013.2243912.
- [2] A. Park, B. Wu, and L. G. Griffith, "Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion," *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 9, no. 2, pp. 89–110, Jan. 1998, doi: 10.1163/156856298X00451.
- [3] S. S. Kim et al., "Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels.," *Annals of Surgery*, vol. 228, no. 1, p. 8, Jul. 1998, doi: 10.1097/0000658-199807000-00002.
- [4] S. N. Bhatia and C. S. Chen, "Tissue Engineering at the Micro-Scale," *Biomedical Microdevices* 1999 2:2, vol. 2, no. 2, pp. 131–144, 1999, doi: 10.1023/A:1009949704750.
- [5] Vozi G., Ahluwalia A., de Rossi, Giuntini F, Mazzoldi A, and Sapienza A, "Microsyringe based fabrication of high resolution organic structures for bioengineering applications," in *Microsyringe based fabrication of high resolution organic structures for bioengineering applications*, Oct. 2000, pp. 141–145.
- [6] R. A. Quirk, D. Briggs, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, and K. M. Shakesheff, "Characterization of the spatial distributions of entrapped polymers following the surface engineering of poly(lactic acid)," *Surface and Interface Analysis*, vol. 31, no. 1, pp. 46–50, 2001, doi: 10.1002/SIA.951.
- [7] J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller, and L. G. Griffith, "Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition," *Tissue Eng*, vol. 7, no. 5, pp. 557–572, Oct. 2001, doi: 10.1089/107632701753213183.
- [8] B. R. Ringeisen et al., "Cell-by-cell construction of living tissue by ambient laser transfer," *2nd Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology - Proceedings*, pp. 120–125, 2002, doi: 10.1109/MMB.2002.1002277.
- [9] V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, and R. R. Markwald, "Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering," *Trends Biotechnol*, vol. 21, no. 4, pp. 157–161, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0167-7799(03)00033-7.
- [10] T. Boland, V. Mironov, A. Gutowska, E. A. Roth, and R. R. Markwald, "Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels," *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, vol. 272, no. 2, pp. 497–502, Jun. 2003, doi: 10.1002/AR.A.10059.
- [11] H. ben Hsieh et al., "Ultra-high-throughput microarray generation and liquid dispensing using multiple disposable piezoelectric ejectors," *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 9, no. 2, pp. 85–94, Mar. 2004, doi: 10.1177/1087057103260943.
- [12] A. Pfister, R. Landers, A. Laib, U. Hübner, R. Schmelzeisen, and R. Mülhaupt, "Biofunctional rapid prototyping for tissue-engineering applications: 3D bioplotting versus 3D printing,"

- 
- Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, vol. 42, no. 3, pp. 624–638, Feb. 2004, doi: 10.1002/POLA.10807.
- [13] K. Jakab, A. Neagu, V. Mironov, R. R. Markwald, and G. Forgacs, “Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 9, p. 2864, Mar. 2004, doi: 10.1073/PNAS.0400164101.
- [14] J. Ackermann, C. Vidélot, T. N. Nguyen, L. Wang, P. M. Sarro, and F. Fages, “Gel-layer-assisted directional electropolymerization: A versatile method for high-resolution volume and surface patterning of flexible substrates with conjugated polymers,” *Advanced Materials*, vol. 16, no. 19, pp. 1709–1712, Oct. 2004, doi: 10.1002/ADMA.200306705.
- [15] G. Fridman, M. Li, G. Friedman, A. Gutsol, P. I. Lelkes, and A. Fridman, “Non-thermal plasma bioPrinter with nano-scale precision,” *IEEE International Conference on Plasma Science*, p. 170, 2004, doi: 10.1109/PLASMA.2004.1339724.
- [16] Hackney P.M and Pancholi K.P., “Application of the Z-Corps three-dimensional printing processes using novel material to manufacture bio-scaffold for bone replacement,” in *Fifth National Conference on Rapid Design, Prototyping, and Manufacturing*, 2004, pp. 53–60.
- [17] H. Komatsu et al., “Design and synthesis of highly sensitive and selective fluorescein-derived magnesium fluorescent probes and application to intracellular 3D Mg<sup>2+</sup> imaging,” *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 50, pp. 16353–16360, Dec. 2004, doi: 10.1021/JA049624L.
- [18] P. Ball, “Body painting,” *Nature Materials* 2005 4:8, vol. 4, no. 8, pp. 582–582, 2005, doi: 10.1038/nmat1439.
- [19] V. Mironov, “The Second International Workshop on Bioprinting, Biopatterning and Bioassembly,” *Expert Opin Biol Ther*, vol. 5, no. 8, pp. 1111–1115, Aug. 2005, doi: 10.1517/14712598.5.8.1111.
- [20] B. Leukers et al., “Biocompatibility of ceramic scaffolds for bone replacement made by 3D printing,” *Materwiss Werksttech*, vol. 36, no. 12, pp. 781–787, Dec. 2005, doi: 10.1002/MAWE.200500968.
- [21] B. Leukers et al., “Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 16, no. 12, pp. 1121–1124, Dec. 2005, doi: 10.1007/S10856-005-4716-5.
- [22] R. Chang, B. Starly, W. Sun, C. Culbertson, H. Holtorf, and S. Gonda, “Freeform Bioprinting of Liver Encapsulated in Alginate Hydrogels Tissue Constructs for Pharmacokinetic Study,” 2006.
- [23] V. Mironov, N. Reis, and B. Derby, “Review: bioprinting: a beginning,” *Tissue Eng*, vol. 12, no. 4, pp. 631–634, Apr. 2006, doi: 10.1089/TEN.2006.12.631.
- [24] V. Mironov, “Toward human organ printing: Charleston Bioprinting Symposium,” *ASAIO J*, vol. 52, no. 6, Nov. 2006, doi: 10.1097/01.MAT.0000248999.25334.6A.
- [25] H. Fakhrzadeh and B. Larikani, “Bioprinting: Prospects of a rapidly growing technology,” *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders*, vol. 7, no. 1, pp. 1–7, Oct. 2007.
-

- [26] V. Mironov, V. Kasyanov, and R. Markwald, "Bioprinting: Directed tissue self-assembly," *Chem Eng Prog*, vol. 103, pp. S12–S17, Dec. 2007.
- [27] 2007 International Symposium on VLSI Technology, Systems and Applications (VLSI-TSA). Hsinchu, 2007. [Online]. Available: <http://lib.ugent.be/catalog/ebk01:1000000000525455>
- [28] J. Suwanprateeb, R. Sanngam, and W. Suwanpreuk, "Fabrication of bioactive hydroxyapatite/bis-GMA based composite via three dimensional printing," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 19, no. 7, pp. 2637–2645, 2008, doi: 10.1007/S10856-007-3362-5.
- [29] K. Igawa, U. il Chung, and Y. Tei, "Custom-made artificial bones fabricated by an inkjet printing technology," *Clinical Calcium*, vol. 18, no. 12, pp. 1737–1743, Dec. 2008, doi: clica081217371743.
- [30] E. Sachlos, D. A. Wahl, J. T. Triffitt, and J. T. Czernuszka, "The impact of critical point drying with liquid carbon dioxide on collagen-hydroxyapatite composite scaffolds," *Acta Biomater*, vol. 4, no. 5, pp. 1322–1331, 2008, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2008.03.016.
- [31] N. E. Fedorovich, J. R. de Wijn, A. J. Verbout, J. Alblas, and W. J. A. Dhert, "Three-dimensional fiber deposition of cell-laden, viable, patterned constructs for bone tissue printing," *Tissue Eng Part A*, vol. 14, no. 1, pp. 127–133, Jan. 2008, doi: 10.1089/TEN.A.2007.0158.
- [32] G. E. Ryan, A. S. Pandit, and D. P. Apatsidis, "Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique," *Biomaterials*, vol. 29, no. 27, pp. 3625–3635, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.05.032.
- [33] F. C. Fierz et al., "The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds," *Biomaterials*, vol. 29, no. 28, pp. 3799–3806, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.06.012.
- [34] W. Wu, Q. Zheng, X. Guo, J. Sun, and Y. Liu, "A programmed release multi-drug implant fabricated by three-dimensional printing technology for bone tuberculosis therapy," *Biomed Mater*, vol. 4, no. 6, 2009, doi: 10.1088/1748-6041/4/6/065005.
- [35] Y. Nishiyama et al., "Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology," *J Biomech Eng*, vol. 131, no. 3, Mar. 2009, doi: 10.1115/1.3002759.
- [36] W. Lee et al., "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication," *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1587–1595, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.12.009.
- [37] B. A. Robert Barry III et al., "Direct-Write Assembly of 3D Hydrogel Scaffolds for Guided Cell Growth," *Advanced Materials*, vol. 21, no. 23, pp. 2407–2410, Jun. 2009, doi: 10.1002/ADMA.200803702.
- [38] N. E. Fedorovich et al., "Evaluation of photocrosslinked Lutrol hydrogel for tissue printing applications," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1689–1696, Jul. 2009, doi: 10.1021/BM801463Q.

- [39] X. Cui and T. Boland, "Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology," *Biomaterials*, vol. 30, no. 31, pp. 6221–6227, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.07.056.
- [40] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5910–5917, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.06.034.
- [41] F. Guillemot et al., "High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering," *Acta Biomater*, vol. 6, no. 7, pp. 2494–2500, 2010, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2009.09.029.
- [42] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, and Y. Nishiyama, "Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication," *Biofabrication*, vol. 2, no. 1, 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014110.
- [43] W. Lee et al., "On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels," *Biotechnol Bioeng*, vol. 105, no. 6, pp. 1178–1186, Apr. 2010, doi: 10.1002/BIT.22613.
- [44] R. Chang, K. Emami, H. Wu, and W. Sun, "Biofabrication of a three-dimensional liver microorgan as an in vitro drug metabolism model," *Biofabrication*, vol. 2, no. 4, Dec. 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/4/045004.
- [45] K. Arai, S. Iwanaga, H. Toda, C. Genci, Y. Nishiyama, and M. Nakamura, "Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images," *Biofabrication*, vol. 3, no. 3, Sep. 2011, doi: 10.1088/1758-5082/3/3/034113.
- [46] A. Skardal et al., "Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds," *Stem Cells Transl Med*, vol. 1, no. 11, pp. 792–802, Nov. 2012, doi: 10.5966/SCTM.2012-0088.
- [47] J. S. Miller et al., "Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues," *Nat Mater*, vol. 11, no. 9, pp. 768–774, 2012, doi: 10.1038/NMAT3357.
- [48] G. A. Fielding, A. Bandyopadhyay, and S. Bose, "Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds," *Dent Mater*, vol. 28, no. 2, pp. 113–122, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.DENTAL.2011.09.010.
- [49] R. Gaetani et al., "Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells," *Biomaterials*, vol. 33, no. 6, pp. 1782–1790, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.11.003.
- [50] L. A. Hockaday et al., "Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds," *Biofabrication*, vol. 4, no. 3, Sep. 2012, doi: 10.1088/1758-5082/4/3/035005.

- [51] D. A. Zopf, S. J. Hollister, M. E. Nelson, R. G. Ohye, and G. E. Green, "Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer," *N Engl J Med*, vol. 368, no. 21, pp. 2043–2045, May 2013, doi: 10.1056/NEJMC1206319.
- [52] T. Xu, W. Zhao, J. M. Zhu, M. Z. Albanna, J. J. Yoo, and A. Atala, "Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology," *Biomaterials*, vol. 34, no. 1, pp. 130–139, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.09.035.
- [53] S. Michael et al., "Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0057741.
- [54] B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang, and J. T. Butcher, "3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels," *J Biomed Mater Res A*, vol. 101, no. 5, pp. 1255–1264, May 2013, doi: 10.1002/JBM.A.34420.
- [55] W. Schuurman et al., "Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs," *Macromol Biosci*, vol. 13, no. 5, pp. 551–561, May 2013, doi: 10.1002/MABI.201200471.
- [56] M. S. Mannoor et al., "3D printed bionic ears," *Nano Lett*, vol. 13, no. 6, pp. 2634–2639, Jun. 2013, doi: 10.1021/NL4007744.
- [57] V. K. Lee, A. M. Lanzi, H. Ngo, S. S. Yoo, P. A. Vincent, and G. Dai, "Generation of Multi-Scale Vascular Network System within 3D Hydrogel using 3D Bio-Printing Technology," *Cell Mol Bioeng*, vol. 7, no. 3, pp. 460–472, 2014, doi: 10.1007/S12195-014-0340-0.
- [58] V. K. Lee et al., "Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology," *Biomaterials*, vol. 35, no. 28, pp. 8092–8102, 2014, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.05.083.
- [59] D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, and J. A. Lewis, "3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs," *Adv Mater*, vol. 26, no. 19, pp. 3124–3130, May 2014, doi: 10.1002/ADMA.201305506.
- [60] Y. Zhao et al., "Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro," *Biofabrication*, vol. 6, no. 3, 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035001.
- [61] T. Billiet, E. Gevaert, T. de Schryver, M. Cornelissen, and P. Dubruel, "The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability," *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, pp. 49–62, 2014, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.09.078.
- [62] F. Pati et al., "Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink," *Nature Communications* 2014 5:1, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, Jun. 2014, doi: 10.1038/ncomms4935.
- [63] J. Visser et al., "Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils," *Nature Communications* 2015 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Apr. 2015, doi: 10.1038/ncomms7933.

- [64] A. E. Jakus, E. B. Secor, A. L. Rutz, S. W. Jordan, M. C. Hersam, and R. N. Shah, "Three-dimensional printing of high-content graphene scaffolds for electronic and biomedical applications," *ACS Nano*, vol. 9, no. 4, pp. 4636–4648, Apr. 2015, doi: 10.1021/ACSNANO.5B01179.
- [65] K. Markstedt, A. Mantas, I. Tournier, H. Martínez Ávila, D. Hägg, and P. Gatenholm, "3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 5, pp. 1489–1496, May 2015, doi: 10.1021/ACS.BIOMAC.5B00188/ASSET/IMAGES/LARGE/BM-2015-00188Z\_0007.JPEG.
- [66] S. Hong et al., "3D Printing of Highly Stretchable and Tough Hydrogels into Complex, Cellularized Structures," *Advanced Materials*, vol. 27, no. 27, pp. 4035–4040, Jul. 2015, doi: 10.1002/ADMA.201501099.
- [67] R. Lozano et al., "3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates," *Biomaterials*, vol. 67, pp. 264–273, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.07.022.
- [68] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, and A. Khademhosseini, "Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels," *Biomaterials*, vol. 73, pp. 254–271, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.08.045.
- [69] H. W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity," *Nature Biotechnology* 2016 34:3, vol. 34, no. 3, pp. 312–319, Feb. 2016, doi: 10.1038/nbt.3413.
- [70] D. B. Kolesky, K. A. Homan, M. A. Skylar-Scott, and J. A. Lewis, "Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 12, pp. 3179–3184, Mar. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1521342113.
- [71] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, and D. H. Kim, "3D bioprinting for engineering complex tissues," *Biotechnol Adv*, vol. 34, no. 4, pp. 422–434, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2015.12.011.
- [72] W. Jia et al., "Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink," *Biomaterials*, vol. 106, pp. 58–68, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.07.038.
- [73] X. Ma et al., "Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 8, pp. 2206–2211, Feb. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1524510113.
- [74] K. A. Homan et al., "Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips," *Scientific Reports* 2016 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Oct. 2016, doi: 10.1038/srep34845.
- [75] N. S. Bhise et al., "A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids," *Biofabrication*, vol. 8, no. 1, Jan. 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/1/014101.

- [76] F. Guo et al., "Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 6, pp. 1522–1527, Feb. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1524813113.
- [77] J. U. Lind et al., "Instrumented cardiac microphysiological devices via multi-material 3D printing," *Nat Mater*, vol. 16, no. 3, p. 303, Mar. 2017, doi: 10.1038/NMAT4782.
- [78] J. Jang et al., "3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair," *Biomaterials*, vol. 112, pp. 264–274, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.10.026.
- [79] Q. Yao et al., "Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation," *Biomaterials*, vol. 115, pp. 115–127, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.11.018.
- [80] M. M. Laronda et al., "A bioprosthesis ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice," *Nat Commun*, vol. 8, May 2017, doi: 10.1038/NCOMMS15261.
- [81] M. Schaffner, P. A. Rühls, F. Coulter, S. Kilcher, and A. R. Studart, "3D printing of bacteria into functional complex materials," *Sci Adv*, vol. 3, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.1126/SCIADV.AAO6804.
- [82] E. A. Bulanova et al., "Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct," *Biofabrication*, vol. 9, no. 3, Aug. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/AA7FDD.
- [83] G. Turnbull et al., "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," *Bioact Mater*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2017.10.001.
- [84] J. Gopinathan and I. Noh, "Recent trends in bioinks for 3D printing," *Biomater Res*, vol. 22, no. 1, Apr. 2018, doi: 10.1186/S40824-018-0122-1.
- [85] T. Gao et al., "Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach," *Biofabrication*, vol. 10, no. 3, Jun. 2018, doi: 10.1088/1758-5090/AACDC7.
- [86] J. Hoarau-Véchet, A. Rafii, C. Touboul, and J. Pasquier, "Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.3390/IJMS19010181.
- [87] B. S. Kim et al., "3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 168, pp. 38–53, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.03.040.
- [88] Y. Qian, X. Zhao, Q. Han, W. Chen, H. Li, and W. Yuan, "An integrated multi-layer 3D-fabrication of PDA/RGD coated graphene loaded PCL nanoscaffold for peripheral nerve restoration," *Nature Communications* 2018 9:1, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2018, doi: 10.1038/s41467-017-02598-7.

- [89] A. Isaacson, S. Swioklo, and C. J. Connon, "3D bioprinting of a corneal stroma equivalent," *Exp Eye Res*, vol. 173, pp. 188–193, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.EXER.2018.05.010.
- [90] D. Joung et al., "3D Printed Stem-Cell Derived Neural Progenitors Generate Spinal Cord Scaffolds," *Adv Funct Mater*, vol. 28, no. 39, Sep. 2018, doi: 10.1002/ADFM.201801850.
- [91] A. Lee et al., "3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart," *Science*, vol. 365, no. 6452, pp. 482–487, Aug. 2019, doi: 10.1126/SCIENCE.AAV9051.
- [92] N. Noor, A. Shapira, R. Edri, I. Gal, L. Wertheim, and T. Dvir, "3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts," *Advanced Science*, vol. 6, no. 11, p. 1900344, Jun. 2019, doi: 10.1002/ADVS.201900344.
- [93] J. Koffler et al., "Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair," *Nat Med*, vol. 25, no. 2, pp. 263–269, Feb. 2019, doi: 10.1038/S41591-018-0296-Z.
- [94] H. G. Yi et al., "A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy," *Nat Biomed Eng*, vol. 3, no. 7, pp. 509–519, Jul. 2019, doi: 10.1038/S41551-019-0363-X.
- [95] M. Albanna et al., "In Situ Bioprinting of Autologous Skin Cells Accelerates Wound Healing of Extensive Excisional Full-Thickness Wounds," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41598-018-38366-W.
- [96] P. Chen et al., "Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration," *Theranostics*, vol. 9, no. 9, pp. 2439–2459, 2019, doi: 10.7150/THNO.31017.
- [97] Y. J. Choi et al., "A 3D cell printed muscle construct with tissue-derived bioink for the treatment of volumetric muscle loss," *Biomaterials*, vol. 206, pp. 160–169, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.03.036.
- [98] Z. Wan, P. Zhang, Y. Liu, L. Lv, and Y. Zhou, "Four-dimensional bioprinting: Current developments and applications in bone tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 101, pp. 26–42, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.10.038.
- [99] S. Pan et al., "2D MXene-Integrated 3D-Printing Scaffolds for Augmented Osteosarcoma Phototherapy and Accelerated Tissue Reconstruction," *Advanced Science*, vol. 7, no. 2, Jan. 2020, doi: 10.1002/ADVS.201901511.
- [100] P. Datta, M. Dey, Z. Ataie, D. Unutmaz, and I. T. Ozbolat, "3D bioprinting for reconstituting the cancer microenvironment," *NPJ Precis Oncol*, vol. 4, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41698-020-0121-2.
- [101] P. Zarrintaj et al., "Ploxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications," *Acta Biomater*, vol. 110, pp. 37–67, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2020.04.028.
- [102] Y. Sun, Y. You, W. Jiang, Q. Wu, B. Wang, and K. Dai, "Generating ready-to-implant anisotropic menisci by 3D-bioprinting protein-releasing cell-laden hydrogel-polymer composite scaffold," *Applied Materials Today*, vol. 18, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.APMT.2019.100469.

- [103] B. Pavan Kalyan and L. Kumar, "3D Printing: Applications in Tissue Engineering, Medical Devices, and Drug Delivery," *AAPS PharmSciTech*, vol. 23, no. 4, May 2022, doi: 10.1208/S12249-022-02242-8.
- [104] S. v. Murphy and A. Atala, "3D bioprinting of tissues and organs," *Nat Biotechnol*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014, doi: 10.1038/NBT.2958.
- [105] D. E. Ingber et al., "Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic," *Tissue Eng*, vol. 12, no. 12, pp. 3265–3283, Dec. 2006, doi: 10.1089/TEN.2006.12.3265.
- [106] B. Derby, "Printing and prototyping of tissues and scaffolds," *Science*, vol. 338, no. 6109, pp. 921–926, Nov. 2012, doi: 10.1126/SCIENCE.1226340.
- [107] J. M. Kelm et al., "A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks," *J Biotechnol*, vol. 148, no. 1, pp. 46–55, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2010.03.002.
- [108] A. Alajati et al., "Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice," *Nat Methods*, vol. 5, no. 5, pp. 439–445, May 2008, doi: 10.1038/NMETH.1198.
- [109] G. Gao, M. Ahn, W. W. Cho, B. S. Kim, and D. W. Cho, "3D Printing of Pharmaceutical Application: Drug Screening and Drug Delivery," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13091373.
- [110] M. Vaidya, "Startups tout commercially 3D-printed tissue for drug screening," *Nat Med*, vol. 21, no. 1, p. 2, Jan. 2015, doi: 10.1038/NM0115-2.
- [111] B. Zhang, A. Korolj, B. F. L. Lai, and M. Radisic, "Advances in organ-on-a-chip engineering," *Nature Reviews Materials*, vol. 3, no. 8, pp. 257–278, Aug. 2018, doi: 10.1038/S41578-018-0034-7.
- [112] F. A. Saleh and P. G. Genever, "Turning round: multipotent stromal cells, a three-dimensional revolution?," *Cytherapy*, vol. 13, no. 8, pp. 903–912, 2011, doi: 10.3109/14653249.2011.586998.
- [113] J. S. Joseph, S. T. Malindisa, and M. Ntwasa, "Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery," *Cell Culture*, Nov. 2018, doi: 10.5772/INTECHOPEN.81552.
- [114] A. Harb, M. Fakhreddine, H. Zaraket, and F. A. Saleh, "Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19," *Biomimetics (Basel)*, vol. 7, no. 1, Mar. 2021, doi: 10.3390/BIOMIMETICS7010003.
- [115] L. C. Rijsbergen, L. L. A. van Dijk, M. F. M. Engel, R. D. de Vries, and R. L. de Swart, "In Vitro Modelling of Respiratory Virus Infections in Human Airway Epithelial Cells – A Systematic Review," *Frontiers in Immunology*, vol. 12, p. 3301, Aug. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.683002/BIBTEX.

- 
- [116] J. Krüger et al., “Drug Inhibition of SARS-CoV-2 Replication in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Organoids,” *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 11, no. 4, pp. 935–948, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JCMGH.2020.11.003.
- [117] U. Ben-David et al., “Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response,” *Nature*, vol. 560, no. 7718, pp. 325–330, Aug. 2018, doi: 10.1038/S41586-018-0409-3.
- [118] L. Neufeld et al., “Microengineered perfusable 3D-bioprinted glioblastoma model for in vivo mimicry of tumor microenvironment,” *Sci Adv*, vol. 7, no. 34, Aug. 2021, doi: 10.1126/SCIADV.ABI9119.
- [119] D. T. Butcher, T. Alliston, and V. M. Weaver, “A tense situation: forcing tumour progression,” *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 108–122, Feb. 2009, doi: 10.1038/NRC2544.

## 4.2 Análisis del uso de hidrogeles en la bioimpresión

### Analysis of the use of Hydrogels in Bioprinting

Jesús M. Rodríguez Rego<sup>\*1</sup>, Laura Mendoza Cerezo<sup>1</sup>, Antonio Macías García<sup>2</sup>, and Alfonso C. Marcos Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Graphic Expression. School of Industrial Engineering. University of Extremadura. Avenida de Elvas, s/ n. 06006- Badajoz. Spain

<sup>2</sup>Department of Mechanical, Energy and Materials Engineering. School of Industrial Engineering. University of Extremadura. Avenida de Elvas, s/ n. 06006- Badajoz. Spain

\*Corresponding autor: [jesusrodriguezrego@unex.es](mailto:jesusrodriguezrego@unex.es)

#### CONTENTS

Resumen.....	113
Characteristics of Hydrogels.....	114
Rheological Properties of Hydrogels.....	115
Composition of Hydrogels Used in Bioprinting.....	116
Types of Bioinks Based on Hydrogels.....	117
Cross- Linking of Hydrogels.....	120
Biofabrication Technologies.....	123
Conclusions.....	127
Bibliography.....	128

Edited By Ram K. Gupta

Copyright 2023, ISBN 9781032283999, DOI: 10.1201/9781003296676-28



CRC Press

Taylor & Francis Group

## Resumen

La bioimpresión es una herramienta en auge que promete ofrecer importantes resultados en campos como la ciencia, la medicina y la biotecnología. Encaminada mayormente al empleo en medicina, concretamente en la regeneración de órganos y tejidos y en el estudio de enfermedades, son muchos los estudios que hay que llevar a cabo para lograr su normal implantación en centros hospitalarios y laboratorios clínicos, ya que aún se encuentra en una etapa incipiente.

Son muchos los descubrimientos que han llevado a la bioimpresión a conseguir los avances actuales. Logrando sus primeros resultados en la década de los 90, con el crecimiento celular sobre una superficie tridimensional prefabricada, biodegradable y apta para la supervivencia celular, la bioimpresión ha vivido, poco a poco, una gran evolución con el paso de los años, siendo a partir de la década del 2010 cuando se empiezan a lograr los resultados más prometedores.

Desde férulas bioabsorbibles hasta válvulas aórticas heterogéneas, canales vasculares, diferentes tipos de tejidos, glándulas tiroides y tejido ovárico funcionales, y reconstrucciones de tumores (*tumor-on-a-chip*) para facilitar y optimizar el estudio de tratamientos efectivos, las posibilidades de la bioimpresión aumentan cada año gracias a las nuevas investigaciones.

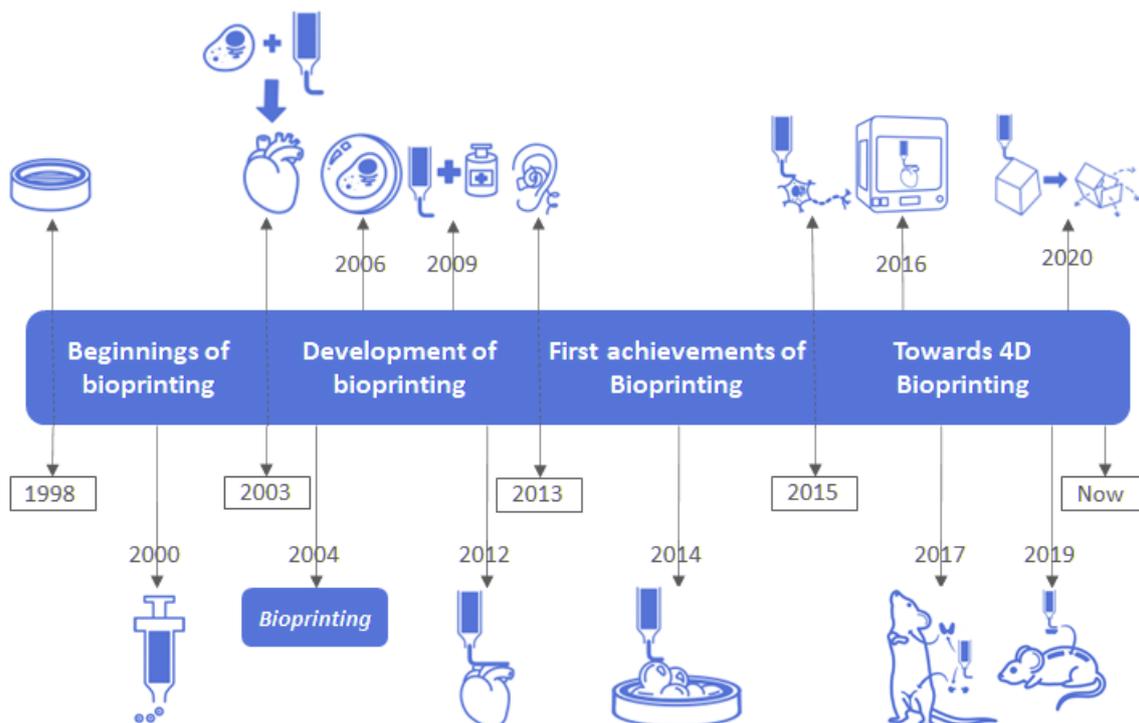


Figura 4-5: Hitos relevantes en la evolución de la bioimpresión. 1998: crecimiento celular sobre estructura tridimensional prefabricada. 2000: metodologías basadas en nanodeposiciones con jeringuillas. 2003: planteamiento de la unión de células con hidrogeles para formar órganos. 2004: aparición del término "bioimpresión". 2006: encapsulación de células en hidrogeles. 2009: unión de fármacos y bioimpresión. 2012: bioimpresión de tejido cardíaco. 2013: bioimpresión de oreja humana con bobina. 2014: bioimpresión con células Hela para estudios tumorales. 2015: bioimpresión de estructuras similares al cerebro con neuronas primarias encapsuladas. 2016: desarrollo de bioimpresora integrada de órganos y tejidos. 2017: bioimpresión de glándula tiroides y tejido ovárico funcionales en ratones. 2019: bioimpresión de scaffolds biomiméticos que permiten la regeneración de axones dañados de la médula espinal de ratones. 2020: comienzo de la bioimpresión 4D, gracias a la cual los elementos bioimpresos pueden cambiar tras reaccionar con el entorno. Fuente propia.

Para lograr todo este avance ha sido necesario el estudio no sólo de métodos de bioimpresión y del desarrollo de nuevas bioimpresoras, sino también de los hidrogeles que conforman las biotintas cargadas de material celular. Estos hidrogeles son la matriz que va a mantener la integridad de la estructura bioimpresa al mismo tiempo que va a provocar el menor daño posible a las células durante y después de la bioimpresión, además de permitir la angiogénesis y el intercambio de sustancias para asegurar la proliferación y mantenimiento celular.

Es por ello por lo que, conocer las características de los hidrogeles que conforman las biotintas y la forma de emplearlos, es esencial para obtener una vista general de su funcionamiento y sus posibilidades. Así, en este capítulo, se estudian las características, propiedades reológicas, composición, tipos de biotinta y formas de reticulación de los hidrogeles, junto con las diferentes tecnologías de biofabricación existentes.

Todo ello nos permitirá comprender la complejidad de estos compuestos y la necesidad de seguir estudiándolos, de investigar nuevas combinaciones y de incorporar nuevos aditivos que mejoren sus propiedades estructurales, de viabilidad y de mimetización de tejidos del cuerpo humano para su uso clínico óptimo.

#### **4.2.1 Características de los hidrogeles**

La ingeniería de tejidos juega un papel fundamental en la evolución de la medicina. Se encarga del estudio de la regeneración, reparación o construcción de tejidos u órganos funcionales similares a los órganos humanos.

El avance de la ingeniería de tejidos a lo largo de los años, junto con las tecnologías de impresión 3D, ha hecho posible el desarrollo de la bioimpresión. La bioimpresión se define como la fabricación de estructuras tridimensionales compuestas de materiales biológicos. Para ello, emplea hidrogeles como matriz de impresión debido a que poseen las cualidades mecánicas y de biocompatibilidad necesarias para llevar a cabo el proceso de generación de tejidos y órganos con una organización parecida a los presentes en el cuerpo humano.

Los hidrogeles se definen como polímeros hidrofílicos y reticulados, que pueden absorber e hincharse en agua y biofluidos, y transformarse en redes 3D insolubles [1], pudiendo absorber hasta mil veces su peso seco en agua [2]. Se componen de materiales sintéticos, naturales o semisintéticos/híbridos, y pueden emplearse tanto para realizar una construcción biológica de ingeniería celular (por ejemplo, medio sintético/medio biológico) y reconstruir un elemento dañado de un organismo o para simular la fisiopatología de un tejido y estudiar los procesos moleculares que hay detrás.

La estructura que poseen los hidrogeles es debida a la formación de una red insoluble en el biofluido que los conforman, a través de un proceso de reticulación. Dicho proceso de reticulación es el que confiere propiedades elásticas al hidrogel cuando es sometido a tensiones (durante la bioimpresión). Dentro del entorno acuoso en el cual se forma la red, se mantiene un equilibrio entre las fuerzas osmóticas del líquido y las fuerzas elásticas del polímero reticulado, y son la composición de la estructura química y la densidad de reticulación los que definen la velocidad de hinchamiento y la permeabilidad de la estructura [1]. Son capaces de absorber una cantidad de agua equivalente a entre 10 y 1000 veces su peso en seco [3].

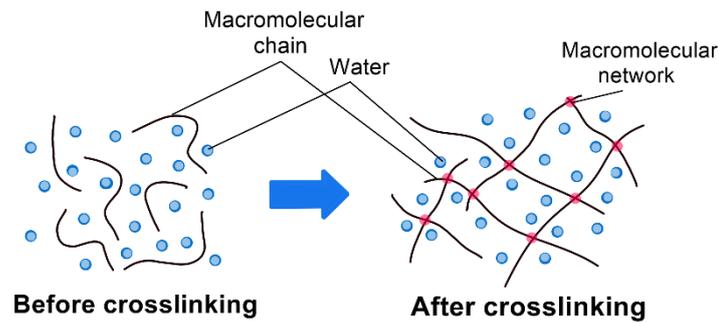


Figura 4-6: Proceso de reticulación de un hidrogel. Fuente propia.

Estas propiedades confieren a la estructura formada gran elasticidad y capacidad de retención de agua, lo cual permite su uso en diferentes aplicaciones biomédicas debido a su semejanza con los tejidos biológicos. Para que un hidrogel pueda ser considerado apto para su empleo debe ser compatible con el material biológico que va a portar, y debe poder adquirir una estructura que se ajuste al tejido que pretende imitar.

Los hidrogeles también deben mantener una estrecha proximidad a los tejidos con un efecto adhesivo mínimo. Además, las matrices sintéticas deben ser capaces de envolver las células y promover la proliferación celular sin dañarlas bajo el efecto de la presión osmótica. Por lo tanto, las matrices sintéticas deben ser altamente porosas para promover la difusión de nutrientes y metabolitos entre las células y el entorno circundante [4].

#### 4.2.2 Propiedades reológicas de los hidrogeles

Las propiedades reológicas de las biotintas influyen en gran medida en la integridad y fidelidad de la estructura impresa y en la viabilidad de las células. Las principales propiedades reológicas que afectan a las características finales de los tejidos bioimpresos en 3D y de las construcciones biológicas incluyen el comportamiento de flujo, la viscosidad, la tensión de cizallamiento y la viscoelasticidad [5].

- **Comportamiento del flujo:** indica la resistencia a la deformación por cizallamiento de un fluido. Se caracteriza por la interacción entre la viscosidad y la tasa de cizallamiento. Según este flujo, el comportamiento se clasifica generalmente como newtoniano o no newtoniano [6]. Las biotintas basadas en hidrogeles presentan un comportamiento preferiblemente no newtoniano además de adelgazamiento por cizallamiento, para fluir sin problemas y evitar la obstrucción de la boquilla de la bioimpresora. Además, esas características mejoran la fidelidad de la impresión y la estabilidad de las estructuras bioimpresas en 3D [6].

- **Viscosidad:** en las biotintas, una mayor viscosidad implica una mejora de la estabilidad estructural, al mismo tiempo que disminuye la viabilidad celular. Por el contrario, una menor viscosidad disminuye la estabilidad estructural de la impresión mientras aumenta la viabilidad celular [1]. Una viscosidad demasiado elevada puede causar oclusiones en la boquilla, por lo que hay que adecuar la viscosidad de la biotinta a la forma y tamaño de la boquilla y viceversa, teniendo en cuenta que ajustando ambos parámetros también se puede obtener una mayor viabilidad celular. En el caso de las formulaciones de biotintas, la viscosidad puede controlarse regulando el peso molecular, la concentración de polímero, la masa de aditivos, la temperatura y la reticulación previa [7].

• **Tensión de cizallamiento:** está determinada por la viscosidad de la biotinta, e influye negativamente sobre la viabilidad celular, ya que, a mayor tensión de cizallamiento, mayor tasa de daño celular se produce. La tensión de cizallamiento actúa en la pared del tubo durante el flujo para oponerse a la fuerza impulsora debida a la presión. Lejos de la pared, la velocidad aumenta y las capas más rápidas aplican un esfuerzo cortante en las capas adyacentes más lentas en un esfuerzo por aumentar su velocidad. Al mismo tiempo, las capas más lentas intentan retener a las capas más rápidas con una fuerza opuesta a la dirección del flujo a medida que los efectos de la fricción se propagan a través del fluido [8].

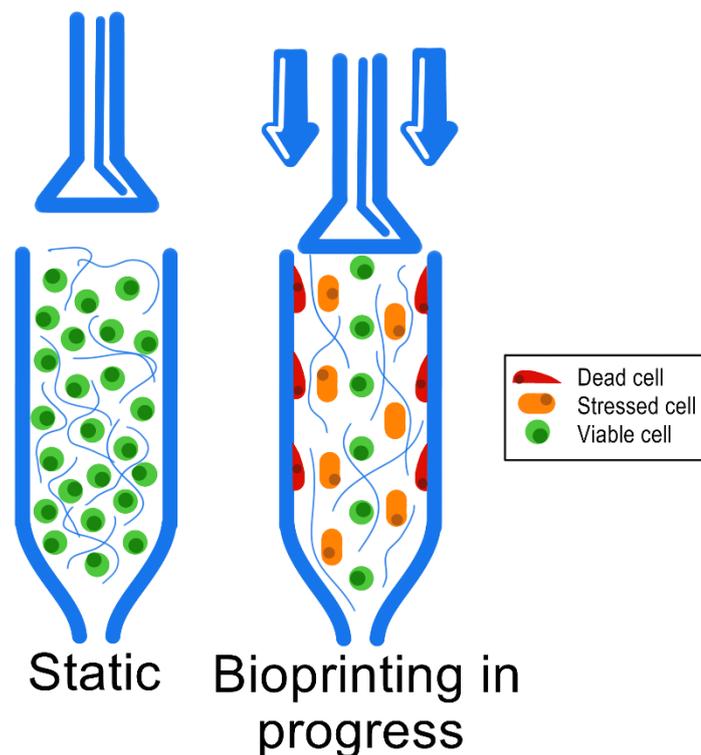


Figura 4-7: Efecto del esfuerzo de cizalla durante la bioimpresión en las células. Fuente propia.

• **Viscoelasticidad:** es el comportamiento que presentan aquellos materiales con propiedades viscosas y elásticas cuando se deforman. Esta propiedad depende del tipo de hidrogel, su concentración y el método de reticulación que se le aplica ya sea físico o químico, y afecta a la proliferación y diferenciación celular. La viscoelasticidad se basa en la medida del módulo de almacenamiento (parte elástica) y pérdida en forma de calor (parte viscosa) de energía almacenada. De esta forma, un módulo de almacenamiento alto da lugar a biotintas con mayor estabilidad estructural mientras que un módulo de pérdida más alto dará lugar a biotintas con menor estabilidad estructural [9]. Es necesario adaptar esta propiedad reológica a las necesidades de bioimpresión.

### 4.2.3 Composición de hidrogeles empleados en bioimpresión

La composición de los hidrogeles empleados en bioimpresión puede ser la siguiente:

- Los **hidrogeles naturales** se componen de biomateriales que tienen funciones inherentes dentro del propio cuerpo humano, como pueden ser el colágeno, la fibrina, el ácido hialurónico (HA) o el Matrigel® [10]. Son los más adecuados para lograr una alta viabilidad celular inicial debido a que, al derivar de los tejidos biológicos, imitan mejor el microentorno natural del organismo, mejorando la proliferación y diferenciación de las células y replicando con mayor fidelidad aquellos procesos, funciones y reacciones que se producen in vivo. A pesar de ello, pueden presentar algunos problemas, ya que al provenir de tejidos biológicos podrían ser inmunogénicos o portar virus y enfermedades del donante al ser injertados.
- Los **hidrogeles sintéticos** están compuestos de materiales como el polietilenglicol (PEG), ácido poliacrílico (PAA) o polihidroximetilmetacrilato (pHEMA), entre otros. Al igual que los naturales poseen una alta biocompatibilidad, y pueden ser especialmente funcionalizados con grupos de adhesión celular y factores de crecimiento, así como modificados química y físicamente con moléculas bioactivas para mejorar el crecimiento [11]. Además, pueden funcionar como sustrato y pueden personalizarse en función de los requerimientos para cada tipo de bioimpresión, logrando mejores propiedades mecánicas y biológicas.
- Los **hidrogeles semisintéticos/híbridos** están formados por hidrogeles naturales que han sido modificados químicamente o mezclados con polímeros sintéticos, adquiriendo nuevas propiedades que pueden resolver algunos de los problemas que pueden presentar los hidrogeles naturales, como la debilidad estructural, una rápida degradación o la variabilidad de la fuente de origen [12]. Al formar los hidrogeles naturales parte de su formulación, pueden llegar a presentar los mismos problemas de inmunogenicidad e incompatibilidad que éstos.

Además, el uso de biotintas que contengan otros biomateriales puede proporcionar un soporte mecánico adicional para las células bioimpresas, ayudándolas a organizarse, migrar y diferenciarse de forma autónoma para formar tejidos funcionales.

#### 4.2.4 Tipos de biotintas basadas en hidrogeles

Existen numerosos tipos de hidrogeles que presentan buenas propiedades en bioimpresión debido a sus características de biocompatibilidad y e integración celular. Además, las formas modificadas de algunos de ellos permiten su reticulación inmediata tras la exposición a la luz UV, aumentando su integridad estructural según se produce la impresión.

Según su composición, los hidrogeles se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Biotintas basadas en proteínas:
  - **Colágeno:** es la principal proteína estructural de la matriz extracelular de las células de mamíferos. Así, el colágeno posee propiedades fisicoquímicas similares a las de los tejidos, junto con biocompatibilidad in vitro/in vivo, y se ha utilizado ampliamente en aplicaciones biomédicas. El colágeno puede combinarse con alginato para su uso como biotinta compuesta [13], y es capaz de mantener las comunicaciones intercelulares entre diferentes tipos de células. Puede modificarse con grupos metacrilato fotopolimerizables para dar lugar al ColMA, permitiendo así su reticulación física en presencia de luz UV.
  - **Gelatina:** se produce por la desnaturalización del colágeno. Deriva de la piel, tendones o huesos de los mamíferos, y tiene un bajo coste. Sus propiedades le confieren la capacidad

de ser biocompatible, biodegradable y termosensible, pudiendo formar hidrogeles a bajas temperaturas. Además, es posible realizar numerosos estudios variando su concentración, y sus formas modificadas, que pueden ser reticuladas química o físicamente, también se han adaptado para la bioimpresión, como la gelatina metacrilato (GelMA) [14]. Este GelMA se consigue mediante su modificación con grupos metacrilato fotopolimerizables, permitiendo una reticulación covalente. La gelificación física surge del ensamblaje de triples hélices intermoleculares que poseen una estructura similar a la del colágeno [15]. La gelatina puede ser combinada con el alginato para mejorar las propiedades mecánicas de los tejidos blandos bioimpreso. También puede combinarse con el ácido hialurónico para crear estructuras más robustas.

- **Fibrinógeno:** es una glicoproteína grande, fibrosa y soluble que participa en la formación de coágulos sanguíneos, donde se convierte en una molécula de fibrina insoluble por la trombina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de interacciones intermoleculares [16]. En ingeniería de tejidos, es principalmente utilizada para la reconstrucción de tejidos dañados por su nula inmunogenicidad y por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, además de inducir la formación de la matriz extracelular. Puede combinarse, por ejemplo, con el colágeno para mejorar las propiedades mecánicas en la ingeniería tisular del cartílago o con el ácido hialurónico para formar redes vasculares [17].
- **Seda:** es un biomaterial con gran elasticidad y biodegradación lenta, con baja inmunogenicidad y biocompatibilidad, que tiene importantes aplicaciones en la ingeniería de tejidos al utilizarse tradicionalmente como soporte para el crecimiento celular.
- Biotintas basadas en polisacáridos:
  - **Alginato:** es un polisacárido aniónico natural obtenido a partir de las algas pardas, y es muy parecido a los glucosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular presente en el cuerpo humano. Además, presenta biocompatibilidad, baja citotoxicidad, proceso de gelificación suave y bajo coste. Debido a su rápida gelificación sin la formación de subproductos dañinos, es ampliamente utilizada en bioimpresión como biotinta. La reticulación física y solidificación del alginato se lleva a cabo fácilmente mediante la adición de cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. Es la biotinta más utilizada debido a que su rápida gelificación implica una buena imprimibilidad, y se mezcla fácilmente con otras biotintas o aditivos. A pesar de ello, como el alginato es un material biológicamente inerte, presenta baja fijación celular, por lo que debe ser modificado mediante un proceso de oxidación y posterior adición de péptidos RGD para promover la adhesión celular [19].
  - **Goma gellan:** es un polisacárido aniónico hidrofílico producido por bacterias, y utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica como agente gelificador. Al igual que el alginato, forma un hidrogel a bajas temperaturas cuando se mezcla con cationes monovalentes o divalentes. Se puede combinar con otras biotintas para aportar estabilidad mecánica a la estructura bioimpresa, aumentando su viscosidad y no afectando negativamente a la viabilidad celular.
  - **Ácido hialurónico:** es un glicosaminoglicano no sulfatado que se encuentra en la matriz extracelular natural. Desempeña un papel importante en el líquido sinovial, el humor vítreo y el cartílago hialino. Se trata de un polisacárido adecuado para aquellas bioimpresiones que

requieren de elevada viscosidad y buenas propiedades reológicas, ya que, a mayor peso molecular y concentración de ácido hialurónico, mayor es la viscosidad [20]. Al igual que ocurre con la gelatina y el colágeno, puede modificarse mediante la adición de grupos metacrilato fotopolimerizables, obteniendo HAMA que puede reticularse en presencia de luz UV.

- **Dextrano:** polisacárido complejo natural hidrófilo que se sintetiza por bacterias acidolácticas a partir de la sacarosa, y que puede ser degradado por el cuerpo por las enzimas dextranasas, por lo que es biodegradable [21]. La combinación de hidrogeles de ácido hialurónico y dextrano metacrilatado presentan características viscoelásticas y pseudoplásticas como biotintas y pueden utilizarse en diversas aplicaciones de bioimpresión.
  - **Agarosa:** polisacárido extraído de las algas marinas con buenas propiedades gelificantes que puede utilizarse para conformar biotintas en conjunto con otras biotintas.
  - **Quitosano:** polisacárido que se obtiene de la desacetilación de la quitina presente en exoesqueletos de crustáceos e insectos y en hongos, algas verdes y levaduras. Posee propiedades antimicrobianas y de cicatrización de heridas, y puede combinarse con otras biotintas, como por ejemplo con agarosa [22].
  - **Konjac:** El glucomanano de konjac (KGM) es un polisacárido natural que consta de  $\beta$  D-glucosa y  $\beta$ -Dmanosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 [23]. Las propiedades que hacen que sea apropiado para la bioimpresión son su alta retención de agua, alta viscosidad y fácil gelatinización. Se han encontrado pocos estudios en la bibliografía sobre este polisacárido y su comportamiento durante los procesos de bioimpresión, por lo que es necesario realizar más investigaciones con diferentes concentraciones, combinaciones con otras biotintas y diferentes parámetros de bioimpresión.
- Biotintas basadas en matriz extracelular descelularizada (dECM):
    - **Matrigel:** matriz compuesta a partir de la membrana basal solubilizada secretada por las células de sarcoma de ratón, rica en laminina y colágeno IV, y empleada en el cultivo celular. Sirve como matriz extracelular biomimética natural y se utiliza ampliamente en los cultivos de células y tejidos, donde sufre reticulación térmica a temperaturas más altas [24]. Se pueden añadir otras biotintas, como el alginato, para mejorar su bioimprimibilidad, además de otros factores de crecimiento y componentes que ayuden al crecimiento y proliferación celular. A pesar de que dicha combinación con otras biotintas puede resultar en propiedades de bioimpresión interesantes, su traslado al marco clínico puede verse limitado debido a su procedencia de sarcoma de ratón.
  - Biotintas basadas en polímeros sintéticos:
    - **PEG (polietilenglicol):** es un polímero sintético sintetizado por oxidación del óxido de etileno, que no presenta inmunogenicidad ni citotoxicidad, es bioinerte, y que presenta unas propiedades apropiadas para su uso en bioimpresión debido a que sus propiedades mecánicas favorecen la integridad de las estructuras impresas. Al tratarse de un material bioinerte las células no pueden adherirse con facilidad a su superficie, así que para su correcta utilización como biotinta debe mezclarse con otras que sí sean biológicamente activas. Se puede modificar el PEG para que contenga grupos reactivos (PEGX), para que sea

fotorreticulable (PEGDA), y para que se pueda combinar con otros componentes como gelatina, fibrinógeno, atelocolágeno [7], o ácido hialurónico, entre otros.

- **Pluronic (poloxámero):** es un copolímero en bloque que consta de un bloque central de poli (óxido de propileno) (PPO) flanqueado por bloques de poli (óxido de etileno) (PEO) [25]. Se trata de un polímero termosensible que posee propiedades termogelificantes inversas (gelifica con el aumento de la temperatura), lo que permite su fácil manejo en estado líquido y con alta viscosidad a bajas temperaturas para llevar a cabo su mezcla con el material celular y los biopolímeros que se agregan para incorporar señales biológicas. Así, la temperatura de gelificación depende de la concentración y el tipo de Pluronic. Estos geles muestran un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento y una buena recuperación de cizallamiento, importantes para una buena precisión a la hora de imprimir. Puede ser modificado para incluir en su estructura grupos fotorreticulables. El principal problema que presenta el empleo de este compuesto como biotinta es que necesita de altas concentraciones para producir la gelificación y el comportamiento reológico requeridos para la bioimpresión por extrusión, afectando negativamente a la viabilidad celular a largo plazo, aunque durante un corto período de tiempo las células sí pueden ser encapsuladas en altas concentraciones de Pluronic sin ningún efecto perjudicial sobre su viabilidad [26].

#### 4.2.5 Reticulación de los hidrogeles

Cuando los hidrogeles empleados en bioimpresión no poseen de por sí las características físicas necesarias para alcanzar los requerimientos de la pieza que se trata de reproducir, hay que emplear compuestos que permitan su reticulación para una mayor estabilidad estructural. Para ello, se pueden emplear tanto modificaciones químicas como físicas para inducir la gelificación, siempre que las células encapsuladas sobrevivan y proliferen después.

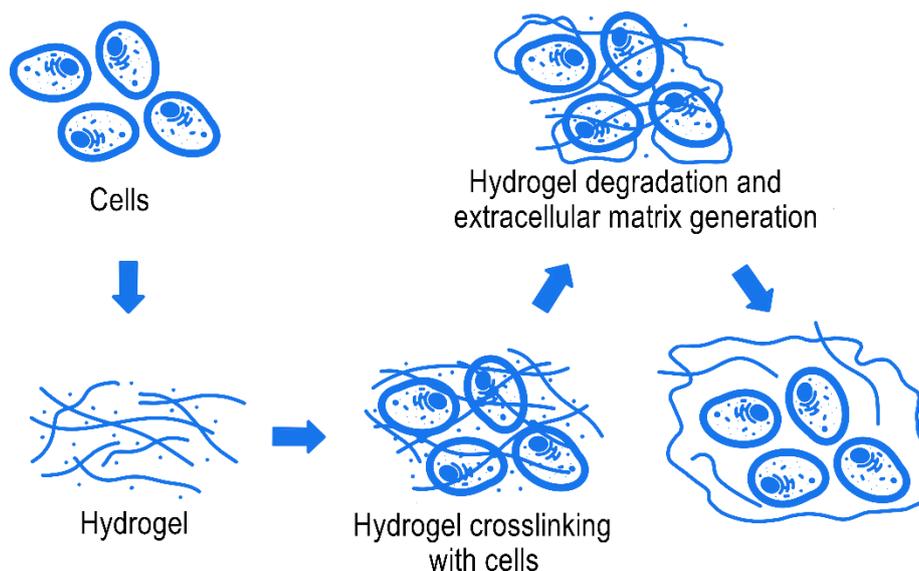


Figura 4-8: Proceso de reticulación de los hidrogeles junto con las células para la posterior formación de tejido.  
Fuente propia.

La reticulación en los hidrogeles puede producirse de forma física o química. En los geles activados físicamente, la luz o la temperatura estimulan la aparición de enlaces cruzados dentro de los hidrogeles, mientras que, en los geles activados químicamente, los enlaces covalentes o los enlaces coordinados entre las cadenas de polímeros crean una red de hidrogel estable a través de agentes reticulantes moleculares o iónicos, respectivamente [27].

Los hidrogeles activados físicamente tienen ventajas únicas para la aplicación clínica, como una temperatura de gelificación suave y una reacción de reticulación de baja toxicidad en ausencia de químicos de reticulación. Estos hidrogeles tienen aplicaciones potenciales para fracturas y defectos óseos con pequeños agujeros. Mientras, los hidrogeles activados químicamente se pueden utilizar, por ejemplo, en defectos óseos duros y grandes a través de hidrogeles de reticulación covalente mono, dual o múltiple [28].

• **Hidrogeles reticulados por condiciones físicas:** se conforman por las interacciones físicas de reticulación, que incluyen interacciones iónicas, temperatura y autoensamblaje.

- Hidrogeles activados por temperatura: los hidrogeles activados por temperatura son capaces de responder a diferentes estímulos térmicos a través de cambios en su forma o su estructura interna. Por ello, la adición a los hidrogeles de polímeros con comportamientos termosensibles pequeños utilizados en biomedicina les confiere la capacidad de ser termosensibles. Algunos de los polímeros termosensibles utilizados son PLGA-PEG (ácido láctico coglicólico-PEG) [29], poli(N,N-dietilacrilamida) [30], PNIPAAm (poli(N-isopropilacrilamida)) [31] y soluplus [32]. De estos polímeros el más empleado es PNIPAAm, ya que es un monómero típico con una excelente sensibilidad a la temperatura, y se ha convertido en el material más popular debido a su capacidad de traducción de fase sensible cuando la temperatura llega a 32 °C (temperatura de solución crítica más baja). La temperatura de transición de volumen-fase de un hidrogel sensible a la temperatura se puede ajustar cambiando la cantidad de monómero aniónico o la proporción de grupos hidrofílicos/hidrofóbicos en el gel [33].
- Hidrogeles activados por agentes de reticulación iónicos: la mayoría de los polisacáridos naturales derivados de las algas, como la agarosa y la carragenina, y algunas proteínas de origen animal, como la gelatina, la elastina y el colágeno, forman los hidrogeles térmicos. El hidrogel puede formarse por quelación o por interacción electrostática, facilitando la gelificación física espontánea debido a la presencia de especies cargadas eléctricamente [34]. Estos polímeros se conocen como polielectrolitos: contienen carga neta a lo largo de la espina dorsal del polímero, y se entrecruzan para formar complejos insolubles cuando se combinan con cationes o aniones multivalentes según la carga del polímero. Los agentes de reticulación iónicos producen la formación de enlaces intermoleculares iónicos, formando una red molecular tridimensional. La introducción de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en el sistema para formar enlaces de coordinación mejora la resistencia mecánica y las propiedades de tracción de los hidrogeles [35]. Además, la adición de iones minerales beneficia en muchas ocasiones la migración, proliferación y diferenciación celular, mostrando beneficios más allá de las propiedades físicas y mecánicas de los hidrogeles. Lo más importante del método de reticulación iónica es su capacidad de autorreparación, de manera que la red de gel puede destruirse con una fuerza de corte alta y repararse una vez que se elimina la fuerza de corte. Sin embargo, la mala propiedad mecánica limita seriamente la aplicación de hidrogeles en

---

huesos y otros tejidos duros debido al método de entrecruzamiento físico de interacción iónica [28].

- Hidrogeles activados por autoensamblaje: el autoensamblaje está impulsado por mecanismos no covalentes de enlace débil, como los enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y las interacciones electrostáticas, y se produce principalmente en los hidrogeles basados en péptidos y proteínas [36].

• **Hidrogeles reticulados por condiciones químicas**: presentan mejores propiedades mecánicas que los hidrogeles reticulados por condiciones físicas, y se conforman por la adición de polímeros que han sido modificados y la posterior formación de enlaces covalentes entre sus cadenas. La reticulación puede producirse por reticulación fotoinducido, reticulación inducida enzimáticamente o reticulación de moléculas pequeñas:

- Reticulación fotoinducida: los hidrogeles que pueden ser fotoactivados inducen la formación de una red tridimensional y cambios morfológicos del precursor del gel al ser activados por la luz en una longitud de onda específica, ya sea luz UV o luz visible. Tanto los hidrogeles naturales como los sintéticos y los híbridos pueden ser modificados mediante la adición de componentes fotorreticulables o fotoiniciadores para lograr la gelificación *in situ*. Según el mecanismo de reacción, los fotoiniciadores se dividen en dos grupos:
  - Tipo I o de escisión: la luz UV genera la escisión de los radicales iniciadores. Los fotoiniciadores de escisión más empleados en bioimpresión son I2959 y LAP. LAP es un sistema de iniciación de un solo componente con alta estabilidad térmica y buena solubilidad y es incoloro; sin embargo, se activa con la luz visible azul, que demostró tener cierto nivel de toxicidad [37].
  - Tipo II o de extracción de hidrógeno: necesitan menor energía de excitación que los fotoiniciadores de tipo I. Los más utilizados son la riboflavina y la eosina Y. La riboflavina, también conocida como vitamina B2, se reduce con la luz, lo que libera radicales libres, por lo que puede ser útil en la polimerización por radicales [38]. La eosina Y, por otro lado, es un sistema de iniciación de dos componentes, en el que la eosina Y actúa como fotosensibilizador. Es utilizado en combinación con trietanolamina (iniciador) y N-vinilcaprolactama (comonomero para acelerar la cinética de gelificación) para producir la reacción de reticulación fotoinducida bajo luz visible [39]. Cuando la absorción de la eosina Y se superpone con el espectro de luz irradiado, absorbe la luz y pasa a un estado de excitación. La eosina Y excitada extrae un radical de hidrógeno de trietanolamina, generando una radical trietanolamina, que sirve como iniciador de la reticulación [40].
- Reticulación inducida enzimáticamente: debido a la toxicidad celular que presentan los agentes de reticulación química, se plantea el empleo de los hidrogeles de reticulación enzimática para mejorar las propiedades de los materiales, incluido un tiempo de gelificación rápido y una biocompatibilidad excelente. Uno de los componentes empleados para la reticulación enzimática de los hidrogeles es la peroxidasa de rábano picante, capaz de formar enlaces covalentes entre polímeros modificados con tiramina en presencia de peróxido de hidrógeno [41]. Otro método enzimático de reticulación de hidrogeles es el empleo del factor transglutaminasa XIII en hidrogeles híbridos de condroitín sulfato y PEG. La adición de

grupos funcionales al condroitín sulfato junto con secuencias de sustrato específicas del factor transglutaminasa XIII se utilizan para permitir la reticulación del condroitín sulfato con precursores de hidrogeles [42].

- Reticulación de moléculas pequeñas: a menudo se emplean moléculas pequeñas de reticulación específica para llevar a cabo la reticulación de diferentes polímeros, que se introducen en sus redes para mejorar su rendimiento. Algunas de estas moléculas son la genipina, el ácido cafeico o la dopamina, y el ácido tánico.
  - Genipina: obtenida de plantas como *Genipa americana* o *Gardenia jasminoides*, se utiliza como agente de reticulación de alto rendimiento para conectar los polímeros con el grupo amino. Esta molécula tiene la capacidad de mantener la inyectabilidad a temperatura ambiente, garantizar una compatibilidad favorable y obtener un efecto antiinflamatorio. Reticula proteínas, colágeno, gelatina y quitosano [43], siendo capaz de reparar tejidos.
  - Dopamina y ácido cafeico: compuestos catecólicos. Poseen grupos funcionales catecol que presentan capacidad de adhesión. El ácido cafeico posee muchas ventajas en comparación con la dopamina, ya que es más fácilmente accesible, tiene un coste menor y una estética deseable, y presenta características biológicas internas como efectos antibacterianos, antiinflamatorios y antioxidantes [44].
  - Ácido tánico: deriva del té verde, las uvas, el vino, entre otros. Los compuestos fenólicos abundantes en el ácido tánico tienen una fuerte capacidad adhesiva superficies orgánicas o inorgánicas, permitiendo su desarrollo como potencial agente de reticulación para la ingeniería de hidrogeles funcionales. Además, debido a la gran cantidad de grupos de catecol presentes en la estructura, su capacidad de eliminación de radicales libres se puede utilizar en materiales para terapia anticancerosa y antiinflamatoria [28].

#### 4.2.6 Tecnologías de biofabricación

Los estudios de nuevas metodologías de biofabricación permiten perfeccionar cada vez más el acabado final de las estructuras bioimpresas, posibilitando con cada avance aumentar su parecido con las partes a las que imitan. Además, aseguran también una mayor viabilidad celular y una bioimpresión más eficiente, acercando a los investigadores a la meta de lograr la creación de órganos y estructuras biológicas listas para su trasplante. A continuación, se describen los métodos de bioimpresión más empleados actualmente:

- **Bioimpresión por inyección de tinta**: la bioimpresión de inyección de tinta es un método preciso, rápido y de bajo coste, que se basa en el proceso de sistemas microelectromecánicos con burbujas térmicas o moldeo por microgotas de inyección piezoeléctrica. Se divide en bioimpresión de gotas a demanda y la inyección de tinta continua:
  - Bioimpresión de gotas bajo demanda: la bioimpresión basada en gotas bajo demanda puede dividirse en bioimpresión térmica, piezoeléctrica, y de chorro electrohidrodinámico.

- En la bioimpresión térmica o la piezoeléctrica, la biotinta se convierte en forma de gotas aplicando un voltaje a un transductor de cristal piezoeléctrico para hacer vibrar los materiales o calentando la formulación a una temperatura superior a la de ebullición, creando así las gotas [45]. Las ventajas asociadas a este tipo de bioimpresión son su bajo coste y su capacidad para imprimir con rapidez conservando una alta viabilidad celular, y las desventajas son su escasa selectividad del material, las variaciones de temperatura durante el proceso de impresión y la frecuente obstrucción de los cabezales de impresión.
- La bioimpresión de chorro electrohidrodinámico consiste en la aplicación de un campo eléctrico en la boquilla de bioimpresión, de forma que la biotinta sale disparada y las células experimentan una corriente eléctrica muy baja que no tiene efectos negativos sobre la integridad, viabilidad y proliferación de las células [46].

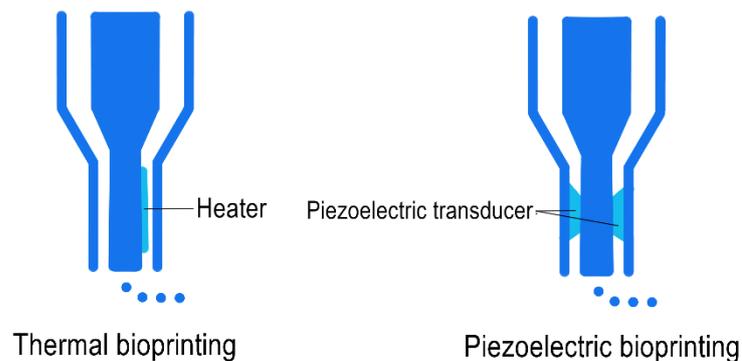


Figura 4-9: Bioimpresión de gotas bajo demanda: bioimpresión térmica y bioimpresión piezoeléctrica. Fuente propia.

- Inyección de tinta continua: esta técnica de bioimpresión, las gotas se forman mediante un transductor o un aparato de carga de gotas que produce un flujo continuo de gotas. A continuación, las gotas se dirigen a un elemento cargado eléctricamente para obtener la carga deseada y, finalmente, las gotas formadas llegan al sustrato y crean el producto 3D [45]. Al requerir biotintas conductoras, no se adapta bien a la bioimpresión; además, el riesgo de contaminación por recirculación de tinta es alto [1].
- **Bioimpresión por extrusión**: es el método más utilizado debido a su facilidad de uso, la disposición de una amplia gama de selección de materiales (polímero fundido, hidrogel, dECM, nanoarcilla, etc.) y un bajo coste de aplicación. El proceso comienza con la carga de la biotinta a imprimir en un cartucho o jeringa adecuados para la bioimpresora, junto con la colocación de la boquilla deseada. A través de un mecanismo neumático o mecánico, la biotinta se deposita sobre una plataforma formando la estructura previamente diseñada de forma digital. El resultado final es que se construyen diferentes estructuras a través de la extrusión de biotinta para formar fibras continuas. Este método presenta varias desventajas, como puede ser la alta tasa de muerte celular debido al esfuerzo de cizalla que sufren las

células durante su flujo por la jeringa hasta salir a través de la boquilla, y una resolución de impresión baja [47]. Esta última desventaja puede ser mejorada mediante la adición de nanopartículas que confieren mayor imprimibilidad. Además, la modificación del tamaño y la forma de la boquilla también pueden ayudar a disminuir el estrés celular producido durante la bioimpresión, consiguiendo un aumento de células viables tras la impresión.



## Extrusion-based bioprinting

Figura 4-10: Bioimpresión por extrusión. Fuente propia.

- **Bioimpresión asistida por láser:** esta técnica de bioimpresión emplea un láser como fuente de energía para depositar biomateriales en un sustrato, y consta de tres partes: una fuente de láser pulsado, una cinta recubierta con materiales biológicos líquidos que se depositan sobre la película metálica y un sustrato receptor. El principio físico de LAB se basa en la generación de una burbuja similar a la cavitación, en la profundidad de la película de biotinta, cuya expansión y colapso induce la formación de un chorro y, por lo tanto, la transferencia de la biotinta de la cinta al sustrato, formando una microgota [48].

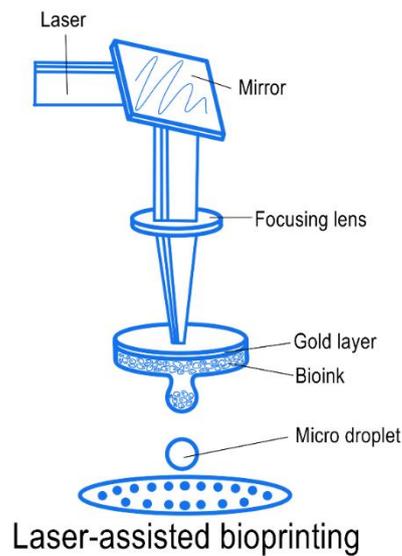


Figura 4-11: Bioimpresión asistida por láser. Fuente propia.

- **Bioimpresión por procesamiento de luz digital:** funciona mediante la proyección de gráficos transversales del producto sobre la superficie de la resina fotosensible líquida utilizando elementos de microespejos digitales para proyectar, lo que permite que la resina irradiada se fotopolimerice capa por capa, lo que da como resultado una velocidad de impresión relativamente rápida. Puede construir productos con características geométricas complejas al depositar materiales de acuerdo con los archivos digitales. Con esta tecnología de bioimpresión los tejidos y órganos artificiales se construyen con una estructura biónica precisa y una alta viabilidad celular [49].

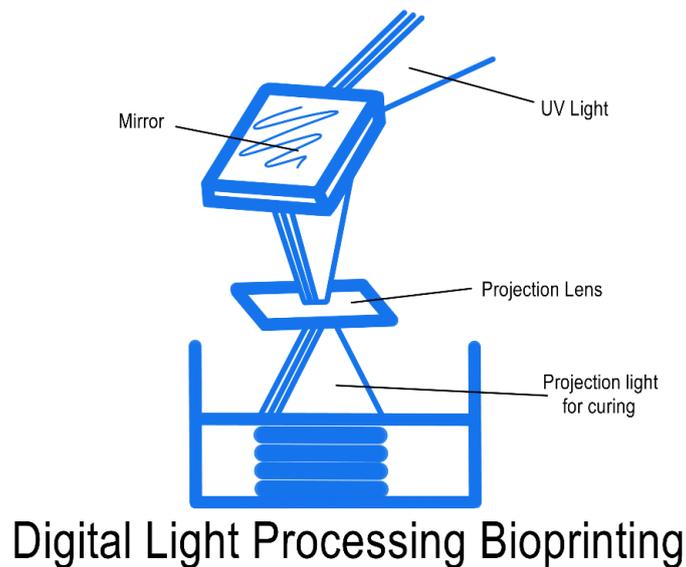


Figura 4-12: Bioimpresión por procesamiento de luz digital. Fuente propia.

---

#### 4.2.7 Conclusiones

Actualmente existe una gran variedad de hidrogeles para su uso en bioimpresión, con propiedades y características muy diferentes. Cada uno de ellos debe cumplir unos requisitos mínimos, como mantener una alta viabilidad celular tras el proceso de bioimpresión, lograr una buena estabilidad estructural, mimetizarse adecuadamente con el tejido a mimetizar y conseguir una estructura interna que permita la formación de vasos sanguíneos y el intercambio de moléculas, así como no mostrar toxicidad tras su implantación en el organismo y ser capaz de biodegradarse. Además, dependiendo del tipo de hidrogel, será más o menos adecuado para imitar una parte específica del organismo.

Además de los tipos de hidrogeles, existe una gran variedad de tipos de bioimpresión, cada uno de ellos con ventajas e inconvenientes dependiendo de la biotinta utilizada y de la estructura a bioimprimir. Debido a la variedad que presentan tanto las biotintas como los métodos de bioimpresión, junto con los nuevos descubrimientos que se realizan cada día en ambos conceptos, es importante seguir estudiando sus propiedades y combinaciones para estandarizar métodos que permitan reproducir partes específicas de tejidos humanos con las mayores tasas de éxito posibles, acercando cada vez más la bioimpresión a su aplicación estandarizada en laboratorios y hospitales como método para generar trasplantes personalizados.

#### 4.2.8 Bibliografía

- [1] A. Fatimi, O. V. Okoro, D. Podstawczyk, J. Siminska-Stanny, and A. Shavandi, "Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review," *Gels*, vol. 8, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/GELS8030179.
- [2] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 18–23, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.ADDR.2012.09.010.
- [3] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 18–23, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.ADDR.2012.09.010.
- [4] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, "Hydrogels in pharmaceutical formulations," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, vol. 50, no. 1, pp. 27–46, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.
- [5] A. Ribeiro et al., "Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting," *Biofabrication*, vol. 10, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/AA90E2.
- [6] L. Ning et al., "3D bioprinting of scaffolds with living Schwann cells for potential nerve tissue engineering applications," *Biofabrication*, vol. 10, no. 3, Jun. 2018, doi: 10.1088/1758-5090/AACD30.
- [7] A. L. Rutz, K. E. Hyland, A. E. Jakus, W. R. Burghardt, and R. N. Shah, "A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels," *Adv Mater*, vol. 27, no. 9, pp. 1607–1614, Mar. 2015, doi: 10.1002/ADMA.201405076.
- [8] K. M. Foster, D. v. Papavassiliou, and E. A. O'rear, "Elongational Stresses and Cells," *Cells 2021*, Vol. 10, Page 2352, vol. 10, no. 9, p. 2352, Sep. 2021, doi: 10.3390/CELLS10092352.
- [9] A. Schwab, R. Levato, M. D'Este, S. Piluso, D. Eglin, and J. Malda, "Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting," *Chemical Reviews*, vol. 120, no. 19, pp. 11028–11055, Oct. 2020, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.0C00084/ASSET/IMAGES/LARGE/CROC00084\_0009.JPEG.
- [10] J. Yang, X. Sun, Y. Zhang, and Y. Chen, "The application of natural polymer-based hydrogels in tissue engineering," *Hydrogels Based on Natural Polymers*, pp. 273–307, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-816421-1.00010-0.
- [11] J. Thakor et al., "Engineered Hydrogels for Brain Tumor Culture and Therapy," *Biodes Manuf*, vol. 3, no. 3, pp. 203–226, Sep. 2020, doi: 10.1007/S42242-020-00084-6.
- [12] E. García-Gareta, *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*, 1st Edition. Elsevier, 2019.
- [13] P. S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y. S. Zhang, A. Khademhosseini, and M. R. Dokmeci, "Bioinks for 3D bioprinting: An overview," *Biomaterials Science*, vol. 6, no. 5, pp. 915–946, May 2018, doi: 10.1039/C7BM00765E.

- [14] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, and A. Khademhosseini, "Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels," *Biomaterials*, vol. 31, no. 21, pp. 5536–5544, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.03.064.
- [15] V. Normand, S. Muller, J. C. Ravey, and A. Parker, "Gelation kinetics of gelatin: a master curve and network modeling," *Macromolecules*, vol. 33, no. 3, pp. 1063–1071, Feb. 2000, doi: 10.1021/MA9909455/ASSET/IMAGES/LARGE/MA9909455F00011.JPEG.
- [16] T. Rajangam and S. S. A. An, "Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications," *Int J Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3641–3662, Sep. 2013, doi: 10.2147/IJN.S43945.
- [17] M. Gruene et al., "Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions," *Tissue Engineering - Part C: Methods*, vol. 17, no. 10, pp. 973–982, Oct. 2011, doi: 10.1089/TEN.TEC.2011.0185/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPEG.
- [18] K. Yamamoto, Y. Yuguchi, B. T. Stokke, P. Sikorski, and D. C. Bassett, "Local Structure of Ca<sup>2+</sup> Alginate Hydrogels Gelled via Competitive Ligand Exchange and Measured by Small Angle X-Ray Scattering," *Gels*, vol. 5, no. 1, Mar. 2019, doi: 10.3390/GELS5010003.
- [19] J. Jia et al., "Engineering alginate as bioink for bioprinting," *Acta Biomater*, vol. 10, no. 10, pp. 4323–4331, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2014.06.034.
- [20] M. K. Cowman, T. A. Schmidt, P. Raghavan, and A. Stecco, "Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions," *F1000Res*, vol. 4, 2015, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.6885.1/DOI.
- [21] G. Sun and J. J. Mao, "Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair," *Nanomedicine (Lond)*, vol. 7, no. 11, pp. 1771–1784, Nov. 2012, doi: 10.2217/NNM.12.149.
- [22] D. F. D. Campos et al., "The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages," *Tissue Eng Part A*, vol. 21, no. 3–4, pp. 740–756, Feb. 2015, doi: 10.1089/TEN.TEA.2014.0231.
- [23] Y. Li, R. Deng, N. Chen, J. Pan, and J. Pang, "Review of Konjac Glucomannan: Isolation, Structure, Chain Conformation and Bioactivities," *Journal of Single Molecule Research*, vol. 1, no. 1, p. 7, 2013, doi: 10.12966/JSMR.07.03.2013.
- [24] L. Horvath, Y. Umehara, C. Jud, F. Blank, A. Petri-Fink, and B. Rothen-Rutishauser, "Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting," *Scientific Reports* 2015 5:1, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2015, doi: 10.1038/srep07974.
- [25] M. Müller, J. Becher, M. Schnabelrauch, and M. Zenobi-Wong, "Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting," *Biofabrication*, vol. 7, no. 3, p. 035006, Aug. 2015, doi: 10.1088/1758-5090/7/3/035006.

- [26] N. E. Fedorovich et al., "Evaluation of photocrosslinked Lutrol hydrogel for tissue printing applications," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1689–1696, Jul. 2009, doi: 10.1021/BM801463Q.
- [27] L. Voorhaar and R. Hoogenboom, "Supramolecular polymer networks: hydrogels and bulk materials," *Chemical Society Reviews*, vol. 45, no. 14, pp. 4013–4031, Jul. 2016, doi: 10.1039/C6CS00130K.
- [28] X. Xue, Y. Hu, S. Wang, X. Chen, Y. Jiang, and J. Su, "Fabrication of physical and chemical crosslinked hydrogels for bone tissue engineering," *Bioactive Materials*, vol. 12, pp. 327–339, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2021.10.029.
- [29] X. Li et al., "Efficacy of Poly(D,L-Lactic Acid-co-Glycolic acid)-Poly(Ethylene Glycol)-Poly(D,L-Lactic Acid-co-Glycolic Acid) Thermogel As a Barrier to Prevent Spinal Epidural Fibrosis in a Postlaminectomy Rat Model," *Clin Spine Surg*, vol. 30, no. 3, pp. E283–E290, 2017, doi: 10.1097/BSD.0000000000000221.
- [30] L. Hanyková, I. Krakovský, E. Šestáková, J. Šťastná, and J. Labuta, "Poly(N,N'-diethylacrylamide)-based thermoresponsive hydrogels with double network structure," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 1–19, Nov. 2020, doi: 10.3390/POLYM12112502.
- [31] B. L. Ekerdt et al., "Thermoreversible Hyaluronic Acid-PNIPAAm Hydrogel Systems for 3D Stem Cell Culture," *Adv Healthc Mater*, vol. 7, no. 12, Jun. 2018, doi: 10.1002/ADHM.201800225.
- [32] H. Wu et al., "Novel self-assembled tacrolimus nanoparticles cross-linking thermosensitive hydrogels for local rheumatoid arthritis therapy," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 149, pp. 97–104, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2016.10.013.
- [33] L. Zhou, Z.-Y. Lu, X. Zhang, and H. Dai, "Studies on the temperature sensitive of N-isopropylacrylamide copolymer," *Gaofenzi Cailiao Kexue Yu Gongcheng/Polymeric Materials Science and Engineering*, vol. 22, pp. 165–168, Mar. 2006.
- [34] J. M. Unagolla and A. C. Jayasuriya, "Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives," *Appl Mater Today*, vol. 18, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.APMT.2019.100479.
- [35] R. das Mahapatra, K. B. C. Imani, and J. Yoon, "Integration of Macro-Cross-Linker and Metal Coordination: A Super Stretchable Hydrogel with High Toughness," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 12, no. 36, pp. 40786–40793, Sep. 2020, doi: 10.1021/ACSAMI.0C11167/SUPPL\_FILE/AM0C11167\_SI\_001.PDF.
- [36] S. Zhang, "Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly," *Nature Biotechnology* 2003 21:10, vol. 21, no. 10, pp. 1171–1178, Sep. 2003, doi: 10.1038/nbt874.
- [37] V. Marek et al., "Blue light exposure in vitro causes toxicity to trigeminal neurons and glia through increased superoxide and hydrogen peroxide generation," *Free Radic Biol Med*, vol. 131, pp. 27–39, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.11.029.

- [38] J. L. Covre et al., "The effects of riboflavin and ultraviolet light on keratocytes cultured in vitro," *Arq Bras Oftalmol*, vol. 79, no. 3, pp. 180–185, 2016, doi: 10.5935/0004-2749.20160052.
- [39] C. S. Bahney, T. J. Lujan, C. W. Hsu, M. Bottlang, J. L. West, and B. Johnstone, "Visible light photoinitiation of mesenchymal stem cell-laden bioresponsive hydrogels," *Eur Cell Mater*, vol. 22, pp. 43–55, 2011, doi: 10.22203/ECM.V022A04.
- [40] S. Sharifi, H. Sharifi, A. Akbari, and J. Chodosh, "Systematic optimization of visible light-induced crosslinking conditions of gelatin methacryloyl (GelMA)," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-02830-X.
- [41] Y. Zhang et al., "An injectable BMSC-laden enzyme-catalyzed crosslinking collagen-hyaluronic acid hydrogel for cartilage repair and regeneration," *J Mater Chem B*, vol. 8, no. 19, pp. 4237–4244, May 2020, doi: 10.1039/D0TB00291G.
- [42] F. Anjum, P. S. Lienemann, S. Metzger, J. Biernaskie, M. S. Kallos, and M. Ehrbar, "Enzyme responsive GAG-based natural-synthetic hybrid hydrogel for tunable growth factor delivery and stem cell differentiation," *Biomaterials*, vol. 87, pp. 104–117, May 2016, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.01.050.
- [43] A. Lauto, L. J. R. Foster, L. Ferris, A. Avolio, N. Zwaneveld, and L. A. Poole-Warren, "Albumin-genipin solder for laser tissue repair," *Lasers Surg Med*, vol. 35, no. 2, pp. 140–145, 2004, doi: 10.1002/LSM.20081.
- [44] J. H. Ryu, P. B. Messersmith, and H. Lee, "Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 9, pp. 7523–7540, Mar. 2018, doi: 10.1021/ACSAMI.7B19865.
- [45] N. Samiei, "Recent trends on applications of 3D printing technology on the design and manufacture of pharmaceutical oral formulation: a mini review," *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 9, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/S43088-020-00040-4.
- [46] S. L. Sampson, L. Saraiva, K. Gustafsson, S. N. Jayasinghe, and B. D. Robertson, "Cell electrospinning: an in vitro and in vivo study," *Small*, vol. 10, no. 1, pp. 78–82, Jan. 2014, doi: 10.1002/SMLL.201300804.
- [47] J. Gong et al., "Complexation-induced resolution enhancement of 3D-printed hydrogel constructs," *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-14997-4.
- [48] V. Keriquel et al., "In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications," *Scientific Reports* 2017 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, May 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01914-x.
- [49] J. Zhang, Q. Hu, S. Wang, J. Tao, and M. Gou, "Digital Light Processing Based Three-dimensional Printing for Medical Applications," *International Journal of Bioprinting*, vol. 6, no. 1, pp. 12–27, 2020, doi: 10.18063/IJB.V6I1.242.

### 4.3 Metodología para caracterizar la imprimibilidad de hidrogeles



International Journal of Bioprinting

#### RESEARCH ARTICLE

### Methodology for characterizing the printability of hydrogels

Jesús M. Rodríguez-Rego<sup>1\*</sup>, Laura Mendoza-Cerezo<sup>1</sup>, Antonio Macías-García<sup>2</sup>, Juan P. Carrasco-Amador<sup>1</sup>,  
Alfonso C. Marcos-Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Graphic Expression, School of Industrial Engineering, University of Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Department of Mechanical, Energy and Materials Engineering, School of Industrial Engineering, University of Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

**Keywords:** Hydrogel; Bioprinting; Printability; Biofabrication window; Characterization

## Resumen

Actualmente, las técnicas de caracterización de hidrogeles utilizadas en bioimpresión son extensas, permitiendo obtener datos sobre sus propiedades físicas, químicas y mecánicas. Dentro de la caracterización de hidrogeles, el análisis de las propiedades de impresión es de gran importancia para determinar su potencial de bioimpresión. El estudio de las propiedades de impresión aporta datos sobre su capacidad para reproducir estructuras biomiméticas y mantener su integridad tras el proceso, así como las relaciona con la posible viabilidad celular tras la generación de las estructuras. El objetivo de este trabajo es proponer una metodología para bioimpresoras basadas en extrusión que permita determinar la imprimibilidad de hidrogeles que van a ser cargados con células. evaluación cuantitativa del estado de gelificación y precisión de impresión con la prueba de rejilla de impresión. Los datos obtenidos tras realizar esta metodología permiten comparar diferentes hidrogeles o diferentes concentraciones de un mismo hidrogel para determinar cuál tiene las propiedades más favorables para realizar estudios de bioimpresión.

**Palabras clave:** Hidrogel, bioimpresión, imprimibilidad, ventana de biofabricación, caracterización.

### 4.3.1 Introducción

La bioimpresión es una herramienta importante que está en constante evolución y será un gran avance para la humanidad en los campos de la medicina y la investigación. En el futuro, solucionará los problemas asociados a la escasez de donantes de órganos y tejidos, y proporcionará una herramienta para probar nuevos fármacos creados contra diferentes enfermedades, permitiendo el acceso a nuevas investigaciones. Se basa en la tecnología de fabricación aditiva, que permite crear objetos tridimensionales sólidos a partir de un modelo digital [1].

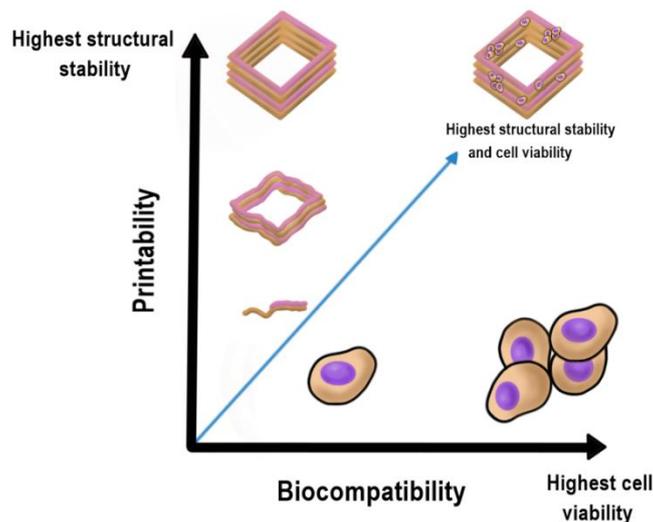
Esta metodología de fabricación aditiva es extremadamente útil en el campo de la ingeniería de tejidos, definida como la ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para la restauración funcional de órganos alterados y el reemplazo de estructuras dañadas por traumatismos y enfermedades [2]. Para un correcto avance en el campo de la ingeniería de tejidos es necesario desarrollar tanto técnicas de cultivo celular como andamios o estructuras 3D que permitan crecer a las células generando estructuras biomiméticas.

La bioimpresión puede ayudar en gran medida al desarrollo de este campo al generar estos andamios en los que las células deben crecer en las formas tridimensionales deseadas. Como tecnología de fabricación aditiva, el proceso implica la deposición de sucesivas capas de biomateriales, teniendo en cuenta la importancia de incluir células vivas en condiciones que aseguren su máxima supervivencia y posterior viabilidad [3]. En los procesos de bioimpresión se pueden utilizar como matrices de impresión materiales como PLA, resinas fotopolimerizables o

hidrogeles, aunque los hidrogeles son los más recomendables. Los hidrogeles proporcionan una matriz para que los tejidos se regeneren mientras controlan la difusión de moléculas y células [4].

En los estudios de bioimpresión, es importante conocer la capacidad de impresión de los hidrogeles para elegir el más adecuado. La imprimibilidad es la capacidad de formar y mantener andamios 3D reproducibles a partir de biotinta utilizando la técnica de bioimpresión [5].

En este estudio, los materiales utilizados como matriz de impresión para los estudios de imprimibilidad son los hidrogeles, ya que son los más apropiados para lograr una alta viabilidad celular. Para que los hidrogeles se consideren óptimos para su uso en bioimpresión, deben tener un equilibrio entre imprimibilidad (o fidelidad de forma) y biocompatibilidad, de modo que la estructura generada posea suficiente estabilidad estructural al tiempo que garantiza una alta viabilidad celular. Este rango entre alta capacidad de impresión y alta biocompatibilidad se conoce como la "ventana de biofabricación" [6] (Figura 3-13).



**Figura 4-13: Ventana de biofabricación.** En el eje Y mejoran la capacidad de impresión y la calidad del andamio bioimpreso, mientras que en el eje X mejoran la biocompatibilidad y la proliferación celular. Fuente: elaboración propia.

En la ventana de biofabricación, cuanto mayor sea la viscosidad del hidrogel, mayor será la calidad del andamio bioimpreso, pero mayor será el daño a la membrana celular [7], la mayor viabilidad celular posible. Después del ajuste de los parámetros de bioimpresión y la posterior generación de estructuras con la bioimpresora, la tasa de viabilidad celular se puede verificar mediante varias pruebas vivas/muertas que ofrecen algunas empresas comerciales y el uso de software de procesamiento de imágenes como ImageJ [8].

Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos y reticulados que pueden absorber e hincharse en agua y biofluidos, y transformarse en redes 3D insolubles [9] que les otorgan propiedades elásticas cuando se someten a diversas tensiones durante la bioimpresión. Además, pueden estar compuestos de materiales naturales, sintéticos o híbridos [6].

A la hora de elegir un hidrogel adecuado para la bioimpresión que garantice tanto la viabilidad celular como la integridad estructural, es importante que primero reúnan una serie de propiedades

que los hagan aptos para la regeneración celular [10]. Asimismo, se deben tener en cuenta las propiedades mecánicas del hidrogel, las cuales deben estar dentro de ciertos valores [11] (Tabla 3-1).

**Tabla 4-1: Propiedades mecánicas y de regeneración requeridas de un hidrogel apto para estudios de bioimpresión.**  
Fuente: elaboración propia.

Propiedades de regeneración celular [10].	Propiedades mecánicas [12]
No citotóxico y no inmunogénico.	Densidad
Imitar la matriz extracelular para lograr la adhesión celular, la propagación y la diferenciación osteogénica en el sitio de implantación	Porosidad
Degradable o hidrolizable por enzimas endógenas	Estabilidad
Estructuralmente estable y mecánicamente fuerte	Adhesión
Porosidad adecuada (a los efectos de la interacción celular, el control de la liberación del factor bioactivo, el intercambio nutricional y de oxígeno);	pH y temperatura
	Biodegradabilidad

Hay que tener en cuenta otras propiedades como la concentración y la viscosidad, ya que algunas de las propiedades mencionadas anteriormente dependen de ellas [13].

Existen determinadas pruebas que se pueden realizar para determinar la estabilidad de los hidrogeles utilizados en bioimpresión, de forma que se pueda hacer un cálculo de la estabilidad mecánica y una aproximación a la viabilidad celular que pueden aportar.

Otro parámetro importante a tener en cuenta al usar hidrogeles en bioimpresión es su imprimibilidad. Sin una buena capacidad de impresión, los hidrogeles no tienen la capacidad de reproducir estructuras biomiméticas.

A menudo, la medida de la imprimibilidad se puede realizar mediante diferentes estudios de reometría y viscosidad que requieren equipos muy específicos que son muy costosos y consumen una gran cantidad del material a estudiar. Tanto los hidrogeles comerciales listos para usar como los kits de reconstitución, ambos producidos en condiciones estériles y de alta calidad, tienen un precio muy alto que no todos los grupos de investigación pueden permitirse derrochar en pruebas. Además, las pruebas de viabilidad celular también suelen ser costosas, por lo que es importante contar con métodos más económicos que puedan determinar fácilmente si un hidrogel tiene la humectabilidad necesaria para permitir la supervivencia celular.

Por ello, este artículo propone una metodología basada en la unificación de diferentes ensayos realizados previamente por otros autores que permite caracterizar la imprimibilidad de los diferentes hidrogeles para estudiar sus propiedades y permitir la supervivencia celular con el menor desperdicio de material posible.

### **4.3.2 Objetivos**

El objetivo de este manuscrito es desarrollar una nueva metodología para configurar y caracterizar hidrogeles de diferentes pruebas existentes para lograr un compromiso óptimo entre imprimibilidad y viabilidad celular según sea necesario en un proceso optimizado para usar la menor cantidad de material posible durante el proceso.

Esta metodología permite clasificar nuevos materiales según diferentes ensayos de caracterización, como el método de la gota sécil, el ensayo de colapso del filamento, la evaluación cuantitativa del estado de gelificación y el ensayo de rejilla de impresión.

Para ello, se desarrollarán las técnicas mencionadas, se realizará la creación de una plataforma adaptada a la bioimpresora Bio X para el ensayo de colapso de filamentos y se explicarán los posibles resultados obtenidos en cada una de ellas, permitiendo obtener un valor numérico asignado para ayudar a determinar cuál de los hidrogeles en el estudio tiene las características más adecuadas para la bioimpresión.

### **4.3.3 Metodología**

Esta metodología está diseñada para caracterizar hidrogeles que se van a utilizar para bioimprimir células en su interior, es decir, aquellos que se pueden imprimir a temperaturas cercanas a los 37°C. Por ello, los parámetros de presión y temperatura serán previamente ajustados mediante el test de gota de la bioimpresora de extrusión, siempre dentro de los rangos que permitan la viabilidad celular. La bioimpresora utilizada para realizar esta metodología fue BIO X de CELLINK.

Este protocolo consiste en realizar diferentes pruebas que nos permitan ensayar y procesar numéricamente los hidrogeles, con el fin de poder realizar comparaciones precisas entre los diferentes hidrogeles que se analizan.

Para poder realizar el estudio de los diferentes hidrogeles y saber cuál es el más adecuado para la bioimpresión de estructuras biomiméticas, es necesario estudiar la imprimibilidad junto con otras características [13], como su resistencia a la tracción o compresión, o incluso la deformación que se puede producir. Para finalmente obtener un resultado cuantitativo y visual que asegure de manera exclusiva qué hidrogel presenta las mejores garantías estructurales, se requiere de una metodología que optimice la cantidad de material utilizado para reducir costos.

Además, la metodología propuesta también puede proporcionar datos sobre la viabilidad celular de los hidrogeles, ya sea para cargarlos con células o no, gracias al método de gota sécil, que permite descartar aquellos hidrogeles con malos resultados de viabilidad celular sin invertir tiempo y dinero en realizarlos. ensayos biológicos.

La presente revisión pretende brindar al investigador una unificación de metodologías para realizar la caracterización de la imprimibilidad de hidrogeles que serán cargados con células para bioimpresión.

#### 4.3.3.1 Método de gota sésil

El método de las gotas sésiles se basa en el ángulo de contacto de una gota de hidrogel sobre una superficie y proporciona datos sobre su humectabilidad [14] y sobre su capacidad para humedecer la superficie de un sólido.

Se ha encontrado que los ángulos de contacto entre  $0^\circ$  y  $90^\circ$  indican una superficie hidrofílica humectable, mientras que un ángulo entre  $90^\circ$  y  $180^\circ$  indica una superficie hidrofóbica no humectable [15], [16]. La hidrofiliidad o humectabilidad de los biomateriales se considera un parámetro muy importante para ciertas aplicaciones, como la adhesión celular en la ingeniería de tejidos [17].

Para medir el ángulo de contacto, a partir del estudio de la gota, se realizó una cámara, la cual permite colocar en su base una placa de vidrio, la cual no absorbe el material a estudiar. Al mismo tiempo, se coloca una luz en la parte superior de la cámara para generar una iluminación vertical sobre la gota de hidrogel que no genere sombras que puedan entorpecer el proceso de captura de la imagen (Figura 3-14).



**Figura 4-14:** Cámara generada para realizar el método de gota sésil utilizando un lecho no absorbente e iluminación adecuada. Fuente: elaboración propia.

Luego de agregar la gota a estudiar en la cámara, se capturan imágenes en ángulo perpendicular desde la placa de vidrio utilizando un microscopio digital USB 40X a 100X con software para su uso (amcap) que digitaliza la imagen en la computadora. De esta manera, se pueden tomar imágenes precisas de todas las gotas de hidrogel desde el mismo ángulo. Estas imágenes deben ser procesadas por un programa de procesamiento de imágenes, como ImageJ o Fiji, para medir el ángulo de contacto. También pueden medirse mediante un software CAD de diseño asistido por ordenador, en el que también puede proporcionarse la medición del ángulo de contacto.

Después de tomar 4 medidas de cada gota de hidrogel, con la mayor precisión posible, se pueden obtener los siguientes resultados [18]:

- Ángulo de contacto inferior a 35°: las superficies son demasiado hidrófilas, lo que impide interacciones con las células.
- Ángulo de contacto superior a 80°: las superficies son demasiado hidrófobas, lo que puede provocar la desnaturalización de las proteínas.
- Ángulo de contacto entre 35° y 80°: ideal para un hidrogel, propiedad de humectabilidad moderada (Figura 15).



Figura 4-15: Ángulo de contacto en la interfaz sólido-aire. Fuente: elaboración propia.

El estudio se puede realizar a diferentes temperaturas para cada hidrogel, lo que permite analizar el comportamiento de los hidrogeles en función de la temperatura de bioimpresión. Si el estudio se va a realizar en condiciones de viabilidad celular para la bioimpresión de hidrogeles cargados con células, la temperatura debe ser de 37 °C.

En la Tabla 3-2 se proporciona un ejemplo de caracterización de hidrogel utilizando el método de gota sécil.

Tabla 4-2: Ejemplo de caracterización de hidrogel utilizando el método de gota sécil. Fuente: elaboración propia.

Material	Temperatura [0C]	Angulo de contacto
Matrigel	9	45
	15	48

En este ejemplo de caracterización mediante el método de gota sécil se ha utilizado Matrigel. Es un material que requiere baja temperatura para su mantenimiento, ya que polimeriza a temperatura ambiente. Por tanto, su temperatura debe ser baja tanto al realizar el método de gota sécil como al utilizarlo como biotinta en la bioimpresora.

Aunque este hidrogel no es apto para bioimpresión con carga celular debido a su baja temperatura de bioimpresión, los buenos resultados obtenidos en el método de gota sécil indican que es apto para la posterior carga de células en la estructura generada por bioimpresora 35° y 80°.

### 4.3.3.2 Prueba de colapso de filamentos

Permite determinar la deflexión de los filamentos de hidrogel a medida que pasan a través de pilares espaciados a diferentes distancias. Estas distancias variarán de más cortas a más largas, siendo más probable que ocurra deflexión en distancias más largas.

Para obtener la tasa de colapso del hidrogel, el hidrogel debe depositarse sobre los pilares de la plataforma (Figura 16), de modo que pase primero por los pilares menos espaciados y termine en los pilares más espaciados.

De las diferencias entre el área teórica y el área real se obtiene el índice de colapso ( $C_f$ ) [19].

$$C_f = \frac{A_t^c - A_a^c}{A_t^c} \cdot 100\% \quad (1)$$

$A_t^c$ : Área total.

$A_a^c$ : Área generada después de depositar el filamento (área real).

En este método, si el área real y el área teórica coinciden mientras el filamento no colapsa, el coeficiente de colapso es 0%. Usando un programa de procesamiento de imágenes como ImageJ, o un programa de dibujo vectorial como AutoCAD que permite la medición de ángulos escalando imágenes, el área total ( $A_t^c$ ) del cuadrado formado por las columnas adyacentes y se calcula el área generada después de depositar el filamento ( $A_a^c$ ) (Figura 4).

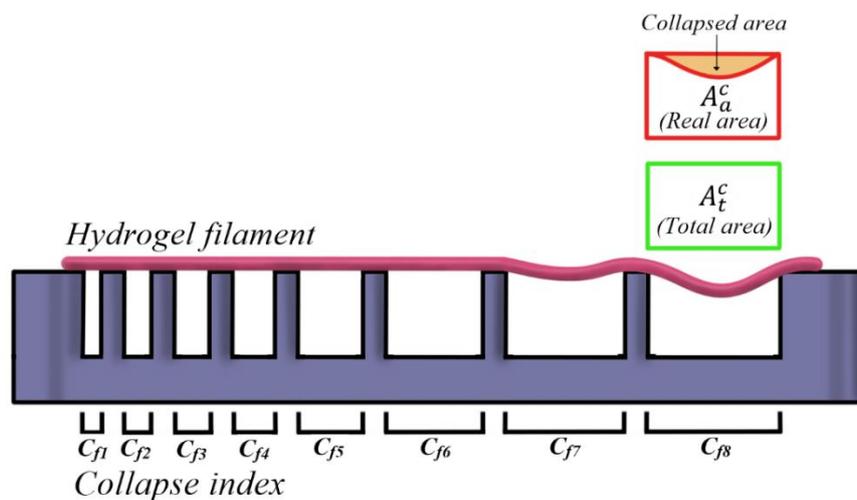


Figura 4-16: Cálculo del coeficiente de colapso sobre la base del real el área y el área teórica. Fuente: elaboración propia.

El hundimiento de cada separación de los pilares se calcula individualmente, comenzando por el extremo de la plataforma con menor separación entre los pilares y manteniendo el orden consecutivo en el que se toman las medidas ( $C_{f1}$ ,  $C_{f2}$ ,  $C_{f3}$ ...). Con los datos obtenidos se elabora una tabla en la que, tras calcular el  $C_f$  para cada separación, se puede observar el punto exacto en el que colapsa total o parcialmente el hidrogel.

Con los datos obtenidos de este ensayo se obtiene una tabla que permite la comparación de diferentes hidrogeles, brindando así un método cuantitativo para determinar la estabilidad mecánica de los hidrogeles, que permite compararlos con mayor precisión.

Un ejemplo de un hidrogel expuesto a la prueba de colapso de filamentos se puede ver en la siguiente tabla (Tabla 3-3). El hidrogel utilizado fue CELLINK START, un hidrogel de sacrificio con excelentes propiedades mecánicas que se utiliza para realizar pruebas con la bioimpresora, evitando el desperdicio de biotintas comerciales más caras.

**Tabla 4-3: Tabla de ejemplo para la prueba de colapso del filamento para CELLINK START, con los datos obtenidos después de los cálculos para cada Cf. Fuente: elaboración propia.**

hidrogel	$C_{f1}$	$C_{f2}$	$C_{f3}$	$C_{f4}$	$C_{f5}$	$C_{f6}$	$C_{f7}$	$C_{f8}$
<b>ÍNDICE DE COLAPSO</b>	0	0	0	0	2.43	5.64	9.83	10.30

Los resultados obtenidos indican que a partir de  $C_{f5}$  comienza a producirse un colapso notable, por lo que este ensayo es una guía de comparación entre diferentes hidrogeles y una indicación del punto en el que puede fallar el hidrogel al generar una estructura.

Para llevar a cabo este estudio, proponemos el desarrollo de una plataforma con la misma forma de placa de Petri que detecta la bioimpresora, pero con pilares en su interior que se separan una unidad cada vez más (Figura 3-17).

El uso de esta plataforma permite controlar:

- Presión de extrusión de hidrogeles.
- Velocidad de movimiento durante la aplicación de presión y por tanto durante la impresión.
- La temperatura en el momento de la prueba.
- La temperatura de la placa en la que se deposita la prueba es un factor importante porque algunos hidrogeles se entrecruzan con la temperatura y pueden ser engañosos si no se controlan.
- Aplicación de rayos UVC (rayos Ultravioleta C de Onda Corta) que provocan el entrecruzamiento en algunos hidrogeles.
- Por último, incluso podemos controlar la cantidad de hidrogel a bioimprimir para que en todas las pruebas esta cantidad sea la misma y podamos comparar todos los hidrogeles a estudiar de una forma más fiable.

Esta plataforma ha sido diseñada digitalmente mediante el software Inventor, ajustándola a la cama de la bioimpresora, y posteriormente impresa mediante una impresora 3D con PLA, tras lo cual se cubrieron con resina todos los poros generados por el PLA.

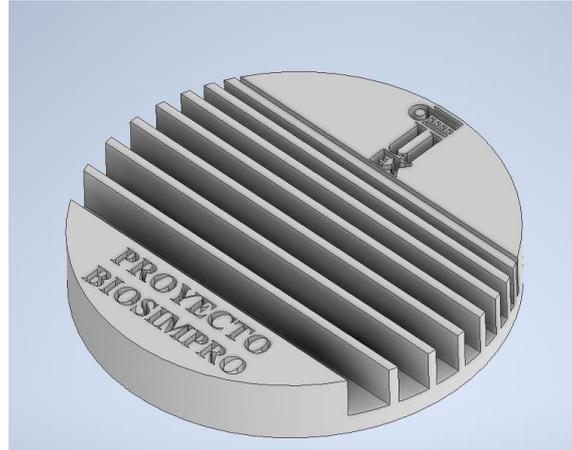


Figura 4-17: Plataforma diseñada para realizar el ensayo de colapso de los filamentos de hidrogel extruidos con la bioimpresora. Fuente: elaboración propia.

#### 4.3.3.3 Evaluación cuantitativa del estado de gelificación

Nos permite determinar la imprimibilidad de los diferentes hidrogeles a estudiar. Con este estudio es posible determinar si un hidrogel tiene un buen estado de gelificación y, por tanto, si tiene una superficie lisa y un ancho constante en las tres dimensiones, facilitando la bioimpresión de matrices regulares con agujeros cuadrados [20].

En esta prueba, la velocidad de alimentación, la distancia de impresión y la presión del aire afectaron la calidad de impresión de la web y, además de estos parámetros, la distancia entre líneas y el área de intersección de líneas también afectan la calidad de la web [21].

Para ello se bioimprime una matriz regular con agujeros cuadrados y se obtienen los datos necesarios para realizar el estudio mediante un programa de tratamiento de imágenes como los mencionados anteriormente.

Por lo tanto, la capacidad de impresión ( $Pr$ ) se define mediante la siguiente ecuación [22]:

$$Pr = \frac{\pi}{4} \cdot \frac{1}{C} = \frac{L^2}{16A} \quad (2)$$

Donde C (circularidad) es:

$$C = \frac{4\pi A}{L^2} \quad (3)$$

Donde L es: perímetro.

Donde A es: área.

$Pr = 1$  implica que la forma de impresión de los agujeros en la matriz es cuadrada y, por tanto, presenta una perfecta condición de gelificación [23]. Así, cuanto más cercano a 1 sea el valor obtenido, mayor será la imprimibilidad del hidrogel. Por otro lado, un hidrogel que obtenga un valor de imprimibilidad inferior a 1 exhibirá una gelificación baja, y un hidrogel que obtenga un valor superior a 1 exhibirá una gelificación excesiva (figura 18).

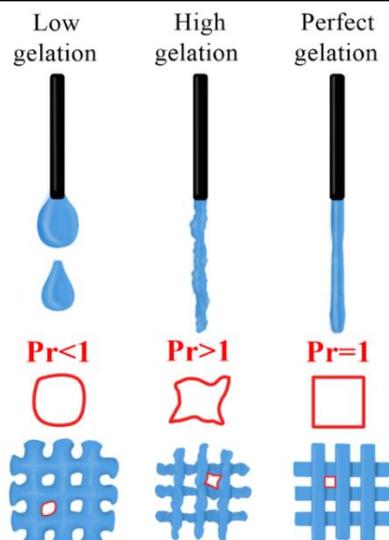


Figura 4-18: Visualización de un hidrogel con gelificación baja (A), gelificación perfecta (B) y gelificación excesiva (C). Fuente: elaboración propia.

Los datos obtenidos permiten estudiar las propiedades de gelificación de un mismo hidrogel cuando se modifican las concentraciones de los diferentes elementos que lo forman, o incluso comparar diferentes tipos de hidrogeles en función de estas propiedades para determinar cuál tiene mejores características de impresión.

Las imágenes para observar el valor de Pr se obtienen utilizando un microscopio digital USB 40X a 100X colocado perpendicularmente a la superficie donde se encuentra la matriz regular.

La plataforma utilizada para soportar el microscopio y permitir obtener las imágenes desde la misma posición y ángulo fue diseñada con Inventor.

En el siguiente ejemplo (Tabla 3-4) se observó la imprimibilidad de HAMA 5%. De acuerdo con el esquema presentado anteriormente en la Figura 6, y dependiendo de la forma amorfa de los cuadrados en la matriz, el valor Pr es inferior a 1 ( $Pr < 1$ ), por lo que la imprimibilidad es pobre.

Tabla 4-4: Caracterización de la imprimibilidad de HAMA 5% usando la evaluación cuantitativa de la prueba del estado de gelificación. Fuente: elaboración propia.

hidrogel	Imagen	PR	Estado de gelificación
HASTA 5%		<1	Bajo

#### 4.3.3.4 Prueba de cuadrícula de impresión

Permite determinar la capacidad de un hidrogel para reproducir un patrón dado y su tendencia a generar acumulaciones o clusters [24]. Se puede utilizar para comprobar si los hidrogeles en estudio tienen propiedades mecánicas suficientes para generar una cuadrícula o patrón de cuadrados y rectángulos de diferentes dimensiones como el de la siguiente figura (Figura 7):

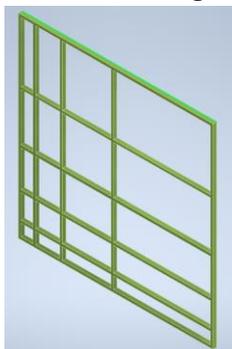


Figura 4-19: Cuadrícula o patrón de cuadrados y rectángulos de diferentes dimensiones. Fuente: elaboración propia.

Tras bioimprimir el patrón diseñado y conocer el tamaño real de la estructura generada, mediante un programa de procesamiento de imágenes se puede establecer la diferencia entre el valor real y el valor teórico en  $\text{mm}^2$  de los cuadrados generados dentro de la grilla.

El valor real se obtiene midiendo el área de cada uno de los cuadrados. Para ello, primero se compara la cuadrícula bioimpresa con un patrón milimétrico para obtener la medida de los lados de cada cuadrado. Posteriormente, utilizando un software de procesamiento de imágenes y conociendo la medida de los lados de los cuadrados, se puede obtener el valor real de cada uno de ellos.

El valor teórico es el establecido para cada cuadro durante el diseño de la cuadrícula mediante programas informáticos como AutoCAD.

Ambos valores pueden compararse entre sí mediante análisis estadístico de la desviación estándar, proporcionando datos sobre su grado de igualdad y obteniendo que, a menor desviación estándar, más similares son los valores teóricos y reales, y, por tanto, mayor es la capacidad de impresión del hidrogel (Tabla 3-5).

Tabla 4-5: Ejemplo de cálculo para la prueba de rejilla de impresión, donde el hidrogel utilizado fue GelMA 5%. En esta tabla, desde abajo (fila 1) hasta arriba (fila 5), se han incluido los datos de los cuadrados más grandes de la grilla (derecha). Fuente: elaboración propia

	Valor real ( $\text{mm}^2$ )	Valor teórico ( $\text{mm}^2$ )	Desviación Estándar
Fila 1	17.33	20.41	2.18
Fila 2	36.33	40.83	3,18
Fila 3	55.08	61.24	4.35
Fila	74.40	81.66	5,13
Fila 5	98.68	102.06	2.39

Los datos obtenidos de esta prueba pueden ser útiles para las comparaciones de capacidad de impresión entre diferentes hidrogeles.

#### 4.3.3.5 Evaluación cuantitativa del estado de gelificación + prueba de rejilla de impresión

Para optimizar el proceso de caracterización de las propiedades de impresión de los hidrogeles, es posible realizar la evaluación cuantitativa del estado de gelificación y la prueba de la rejilla de impresión juntas. Para ello, la impresión de la cuadrícula se lleva a cabo midiendo todos los lados de la cuadrícula, obteniendo los valores reales para compararlos con los valores teóricos después del análisis con el software de procesamiento de imágenes y luego calculando la desviación estándar. Al mismo tiempo, la capacidad de impresión se mide utilizando las ecuaciones descritas en la sección 3.3 ((2) y (3)) (Figura 20).

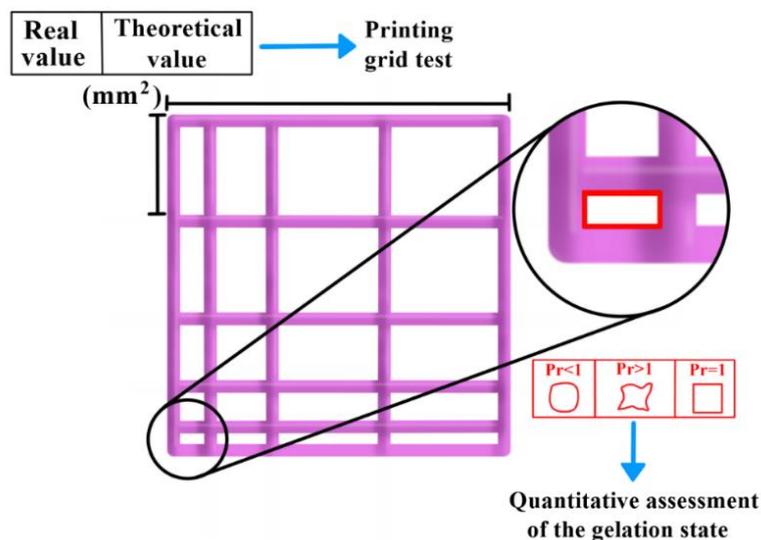


Figura 4-20: Realización simultánea de la prueba de rejilla y evaluación cuantitativa del estado de gelificación.  
Fuente: elaboración propia.

#### 4.3.4 Discusión

La imprimibilidad de las bioimpresoras es un parámetro que mide la precisión de las bioimpresoras en la generación de estructuras 3D biomiméticas con biomateriales. Para que una biotinta tenga una capacidad de impresión adecuada, debe tener ciertas propiedades que proporcionen resultados de impresión óptimos y fidelidad biomimética. Algunos de los parámetros que determinan estas propiedades son la concentración y la viscosidad, que por un lado aseguran la reproducibilidad del experimento y aumentan la imprimibilidad del hidrogel, y por otro lado determinan su fluidez [13].

Al imprimir un hidrogel, se deben ajustar los parámetros de impresión. Los parámetros de impresión deben elegirse en función de la composición de cada hidrogel para garantizar la mayor imprimibilidad posible en cada caso. Una buena capacidad de impresión con buenas propiedades de viabilidad celular dará como resultado estructuras adecuadas para ensayos de construcción de tejidos biomiméticos para futuras aplicaciones médicas. Los parámetros de impresión más relevantes son la temperatura, la presión y la velocidad de impresión. Por tanto, estos son los

parámetros que se ajustarán antes de realizar las diferentes pruebas de esta metodología, para poder posteriormente realizar comparaciones entre diferentes hidrogeles.

Se ha demostrado que la bioimpresión de biotintas cargadas en células tiene una alta tasa de viabilidad celular [25]-[27].

Por lo tanto, el desarrollo de esta metodología tiene en cuenta la posibilidad de cargar células en la biotinta para la bioimpresión de andamios con células en su interior que tengan una siembra celular en su superficie en una fecha posterior.

Gracias al test de gotas de la bioimpresora, es posible determinar las condiciones óptimas para bioimprimir el gel en condiciones de mínima viabilidad celular. En concreto, se obtienen los datos de presión más adecuados para esta biotinta a una temperatura de 37°C. El resto de las pruebas de la metodología se basan en esta caracterización previa.

Esta metodología propuesta comienza con el método de la gota sésil. En este método se mide el ángulo de contacto que genera una gota de hidrogel sobre la superficie sobre la que se deposita. Este ángulo puede proporcionar datos sobre la humectabilidad del hidrogel y, por lo tanto, si tiene las condiciones de humedad suficientes para permitir la viabilidad celular. Con los datos obtenidos con este ensayo se pueden descartar aquellos hidrogeles que por su concentración o composición no tengan una humectabilidad adecuada para permitir la viabilidad celular.

Una vez determinada la humectabilidad de los hidrogeles y, por tanto, seleccionados aquellos con mejores propiedades de humectabilidad para favorecer la supervivencia celular, se puede realizar el ensayo de colapso de filamentos. Gracias a esta prueba, se puede comprobar la estabilidad del filamento midiendo la deflexión en la mitad del tramo de un filamento de biotinta suspendido [28], además de permitir que se ajuste el parámetro de velocidad.

Esta prueba se puede utilizar tanto para comparar diferentes hidrogeles como para comparar variaciones en la concentración de un mismo hidrogel, permitiendo en cada caso elegir la combinación óptima para los requisitos de impresión.

Después de realizar la prueba de colapso del filamento, la evaluación cuantitativa de la prueba del estado de gelificación y la prueba de la rejilla de impresión se pueden realizar juntas.

Con la evaluación cuantitativa del estado de gelificación, la capacidad de impresión de un hidrogel se puede medir sobre la base de la circularidad de los cuadrados de una matriz de cuadrados. Cuanto más cerca estén los cuadrados de la matriz de la forma de un cuadrado perfecto, más cerca estará el valor de 1. Con una gelificación excesiva, el resultado será mayor que 1, y con una gelificación deficiente, el resultado será menor que 1.

Por otro lado, el grid test mide la imprimibilidad en términos del grado de similitud de la superficie en mm<sup>2</sup> de los cuadrados de una grilla bioimpresa (valor real) con los de su versión diseñada digitalmente (valor teórico). Por lo tanto, al comparar los dos datos, cuanto menor sea la desviación estándar, mayor será la imprimibilidad.

Como ambas pruebas se basan en la medida de parámetros relacionados con los cuadrados, se propone realizar ambas pruebas de forma conjunta mediante la impresión de una cuadrícula a la

que, por un lado, se mide la superficie de sus cuadrados para su posterior comparación con su versión digital, y, por otro lado, se mide la circularidad de los cuadrados.

Las pruebas de viabilidad celular se pueden realizar después de elegir el hidrogel con los mejores resultados, utilizando diferentes pruebas de viabilidad, como la prueba vivo/muerto que usa calceína-AM y yoduro de propidio (PI) [29].

Tras realizar las diferentes pruebas propuestas, es posible determinar qué hidrogel se adapta mejor a los parámetros de imprimibilidad requeridos. En este caso, se han adaptado las condiciones de bioimpresión de cada hidrogel para que tengan la mejor imprimibilidad posible a 37°C para permitir la impresión con carga celular.

#### **4.3.5 Conclusiones**

La caracterización de hidrogeles en bioimpresión puede ser costosa debido al alto costo de los hidrogeles y el equipo de análisis necesario. Además, el proceso de inclusión celular también puede ser costoso y tedioso debido al alto costo de los componentes a utilizar, los complicados procedimientos previos a la obtención de cultivos viables y las difíciles condiciones que deben mantenerse para asegurar la supervivencia celular. Por tanto, es necesario realizar estudios previos a la utilización del hidrogel para aumentar la probabilidad de éxito, tanto en términos de viabilidad celular como de integridad estructural.

Estudios como el método de gota sécil, el ensayo de colapso de filamentos, la evaluación cuantitativa del estado de gelificación y el ensayo de rejilla de impresión permiten, tras ajustar los parámetros de temperatura y presión, evaluar los hidrogeles a cargar con células de forma sencilla y rápida. manera manera, con un desperdicio de material bajo.

Con estos estudios se puede predecir en gran medida el comportamiento de los hidrogeles tras el proceso de bioimpresión, pudiendo descartarse aquellas formulaciones que no se comportan bien antes de realizar el proceso de inclusión celular. La metodología propuesta ahorra tiempo y dinero en la investigación de bioimpresión, acercando a los investigadores a un resultado positivo. El desarrollo de esta metodología para caracterizar la imprimibilidad de hidrogeles en el área de la bioimpresión ha sido posible gracias a la experiencia del grupo INMA en el análisis de hidrogeles [13], [30]-[33].

### 4.3.6 Bibliografía

- [1] B. Derby, "Printing and prototyping of tissues and scaffolds," *Science*, vol. 338, no. 6109, pp. 921–926, Nov. 2012, doi: 10.1126/SCIENCE.1226340.
- [2] A. H. Reddi, "Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials," *Tissue Eng*, vol. 6, no. 4, pp. 351–359, Jul. 2004, doi: 10.1089/107632700418074.
- [3] F. Ghorbani et al., "Bioprinting a cell-laden matrix for bone regeneration: A focused review," *J Appl Polym Sci*, vol. 138, no. 8, p. 49888, Feb. 2021, doi: 10.1002/APP.49888.
- [4] X. Li, J. Cai, K. Lois, M. Taaca, E. I. Prieto, and M. R. Vasquez, "Current Trends in Biomedical Hydrogels: From Traditional Crosslinking to Plasma-Assisted Synthesis," *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 2560, vol. 14, no. 13, p. 2560, Jun. 2022, doi: 10.3390/POLYM14132560.
- [5] S. Naghieh and X. Chen, "Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting," *J Pharm Anal*, vol. 11, no. 5, pp. 564–579, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.JPHA.2021.02.001.
- [6] J. Cha and P. Kim, "Biomimetic strategies for the glioblastoma microenvironment," *Front Mater*, vol. 4, p. 45, Dec. 2017, doi: 10.3389/FMATS.2017.00045/XML/NLM.
- [7] H. Shokrani, A. Shokrani, and M. R. Saeb, "Methods for biomaterials printing: A short review and perspective," *Methods*, vol. 206, pp. 1–7, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.YMETH.2022.07.016.
- [8] L. Jia et al., "Bioprinting and regeneration of auricular cartilage using a bioactive bioink based on microporous photocrosslinkable acellular cartilage matrix," *Bioact Mater*, vol. 16, pp. 66–81, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2022.02.032.
- [9] A. Fatimi, O. V. Okoro, D. Podstawczyk, J. Siminska-Stanny, and A. Shavandi, "Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review," *Gels* 2022, Vol. 8, Page 179, vol. 8, no. 3, p. 179, Mar. 2022, doi: 10.3390/GELS8030179.
- [10] X. Bai, M. Gao, S. Syed, J. Zhuang, X. Xu, and X. Q. Zhang, "Bioactive hydrogels for bone regeneration," *Bioact Mater*, vol. 3, no. 4, pp. 401–417, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2018.05.006.
- [11] Y. Cheng, X. Shi, X. Jiang, X. Wang, and H. Qin, "Printability of a Cellulose Derivative for Extrusion-Based 3D Printing: The Application on a Biodegradable Support Material," *Front Mater*, vol. 7, p. 86, Apr. 2020, doi: 10.3389/FMATS.2020.00086/BIBTEX.
- [12] X. Guan et al., "Development of hydrogels for regenerative engineering," *Biotechnol J*, vol. 12, no. 5, May 2017, doi: 10.1002/BIOT.201600394.
- [13] E. Mancha Sánchez et al., "Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, p. 776, Aug. 2020, doi: 10.3389/FBIOE.2020.00776/BIBTEX.
- [14] E. Russo, X. Qu, G. Chwalik-Pilszyk, and A. W. Wiśniewska, "Influence of Selected Ophthalmic Fluids on the Wettability and Hydration of Hydrogel and Silicone Hydrogel Contact

- 
- Lenses&mdash;In Vitro Study,” *Materials* 2022, Vol. 15, Page 930, vol. 15, no. 3, p. 930, Jan. 2022, doi: 10.3390/MA15030930.
- [15] L. González Yeguas, “Estudio de la bioimpresión de hidrogeles aplicados a la generación de piel artificial mediante impresión laser BA-LIFT,” Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 2020. Accessed: Aug. 03, 2022. [Online]. Available: <https://oa.upm.es/65708/>
- [16] H. E. Castillo, S. M. Carballo, M. E. Alfaro, M. Lopretti, and J. Vega Baudrit, “Hidrogeles híbridos de quitosano y polietilenglicol (quit:peg) para potenciales aplicaciones biomédicas,” *Rev. Iberoam. Polim*, vol. 22, no. 2, pp. 97–112, 2021.
- [17] M. Nakagawa, F. Teraoka, S. Fujimoto, Y. Hamada, H. Kibayashi, and J. Takahashi, “Improvement of cell adhesion on poly(L-lactide) by atmospheric plasma treatment,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 77, no. 1, pp. 112–118, Apr. 2006, doi: 10.1002/JBM.A.30521.
- [18] J. M. Rodríguez Rego, “Estudio de la bioimpresión 3d con aplicación en odontología a partir de una nueva metodología,” Universidad de Extremadura, Badajoz, 2021.
- [19] M. C. Morello, “Estudio del composite hidroxiapatita - acrílico como material de bioimpresión 3D,” Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2019.
- [20] G. J. Gillispie et al., “The Influence of Printing Parameters and Cell Density on Bioink Printing Outcomes,” *Tissue Eng Part A*, vol. 26, no. 23–24, pp. 1349–1358, Dec. 2020, doi: 10.1089/TEN.TEA.2020.0210.
- [21] Y. He, F. Yang, H. Zhao, Q. Gao, B. Xia, and J. Fu, “Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting,” *Scientific Reports* 2016 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Jul. 2016, doi: 10.1038/srep29977.
- [22] L. Ouyang, R. Yao, Y. Zhao, and W. Sun, “Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, Sep. 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/3/035020.
- [23] S. Kyle, Z. M. Jessop, A. Al-Sabah, and I. S. Whitaker, ““Printability” of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art,” *Adv Healthc Mater*, vol. 6, no. 16, Aug. 2017, doi: 10.1002/ADHM.201700264.
- [24] M. A. Habib and B. Khoda, “Development of clay based novel bio-ink for 3D bio-printing process,” *Procedia Manuf*, vol. 26, pp. 846–856, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.PROMFG.2018.07.105.
- [25] C. García Villegas and M. M. Vidarte Pastrana, “Informe 1. Estado del arte de la bioimpresión 3D,” Bogotá, 2011.
- [26] I. Yang-Lee et al., “Bioimpresión de órganos y tejidos en tercera dimensión: técnicas, aplicaciones y limitaciones,” *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 31, no. 3, pp. 41–51, Oct. 2018, doi: 10.18845/TM.V31I3.3900.
- [27] Á. A. César-Juárez et al., “Use and application of 3D printing and bioimpression technology in medicine,” *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 61, p. 9, Nov. 2018.
-

- 
- [28] D. Therriault, S. R. White, and J. A. Lewis, "Rheological Behavior of Fugitive Organic Inks for Direct-Write Assembly," *Applied Rheology*, vol. 17, pp. 10112-1-10112-8, Sep. 2007.
- [29] T. Billiet, E. Gevaert, T. de Schryver, M. Cornelissen, and P. Dubruel, "The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability," *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, pp. 49-62, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.09.078.
- [30] J. C. Gómez-Blanco et al., "Improving Cell Viability and Velocity in  $\mu$ -Extrusion Bioprinting with a Novel Pre-Incubator Bioprinter and a Standard FDM 3D Printing Nozzle," *Materials* 2021, Vol. 14, Page 3100, vol. 14, no. 11, p. 3100, Jun. 2021, doi: 10.3390/MA14113100.
- [31] M. Matamoros et al., "Temperature and Humidity PID Controller for a Bioprinter Atmospheric Enclosure System," *Micromachines* 2020, Vol. 11, Page 999, vol. 11, no. 11, p. 999, Nov. 2020, doi: 10.3390/MI11110999.
- [32] R. Agujetas, A. C. Marcos, J. I. Fernández-Vigo, and J. M. Montanero, "Influence of an iris-fixed phakic intraocular lens on the transport of nutrients by the aqueous humor," *Biomech Model Mechanobiol*, vol. 18, no. 2, pp. 491-502, Apr. 2019, doi: 10.1007/S10237-018-1099-3/TABLES/5.
- [33] J. M. Rodríguez Márquez, J. M. Rodríguez rego, R. Sánchez Sánchez, A. Macías García, and A. Díaz Parralejo, "Development of a device for the control of variables in the bioprinting of hydrogels," *25th International Congress on Project Management and Engineering*, p. 13, Jul. 2021.

#### 4.4 Comparación del potencial para la bioimpresión de diferentes tecnologías de impresión 3D



International Journal of Bioprinting

#### RESEARCH ARTICLE

### Comparison of the potential for bioprinting of different 3D printing technologies

Jesús M. Rodríguez-Rego<sup>1\*</sup>, Laura Mendoza-Cerezo<sup>1</sup>, Antonio Macías-García<sup>2</sup>, Alfonso C. Marcos-Romero<sup>1</sup>,  
Juan P. Carrasco-Amador<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Graphic Expression, School of Industrial Engineering, University of Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Department of Mechanical, Energy and Materials Engineering, School of Industrial Engineering, University of Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

**Keywords:** Printability, Bioprinting, 3D printing, Hydrogel, PCL, Matrigel.

## Resumen

Las tecnologías de fabricación aditiva ofrecen multitud de aplicaciones médicas debido a los avances conseguidos en el desarrollo de los materiales utilizados para reproducir a medida los productos modelo.

El principal problema que tienen estas tecnologías es la obtención de valores correctos de viabilidad celular, y es aquí donde la bioimpresión 3D surge como una herramienta muy interesante que debe ser ampliamente estudiada, ya que presenta desventajas significativas con respecto a la imprimibilidad.

En este trabajo se plantea la comparación de la tecnología de bioimpresión 3D en hidrogeles y termoplásticos para el desarrollo de piezas biomiméticas. Para ello, se plantea el estudio de la imprimibilidad de diferentes materiales ampliamente utilizados en la bibliografía, para posteriormente comprobar y analizar los parámetros que nos indican si dichos materiales pudieran postularse para obtener una estructura biomimética con garantías estructurales.

Para analizar los materiales estudiados se han diseñado diferentes herramientas que facilitan la caracterización cuantitativa de su imprimibilidad mediante el uso de impresión 3D.

Para ello, se han desarrollado diferentes estructuras y se ha seguido una metodología de caracterización que permite cuantificar el valor de imprimibilidad de cada material en cada prueba, para posteriormente ir descartando los materiales que no obtengan un valor mínimo en el resultado.

Tras el estudio, se comprobó que solo el GelMA 5% podría generar estructuras biomiméticas fieles al modelo 3D diseñado. Además, al comparar los resultados de impresión de los diferentes materiales empleados en bioimpresión 3D y, en consecuencia, establecer el planteamiento de diferentes estrategias, se demuestra que actualmente los hidrogeles deben seguir desarrollándose para igualar los resultados conseguidos mediante la impresión de materiales termoplásticos útiles para la bioimpresión.

**Palabras clave:** Imprimibilidad, Bioimpresión, Impresión 3D, Hidrogel, PCL, Matrigel.

### 4.4.1 Introducción

Los seres humanos se encuentran en una carrera constante para superar los límites de la ciencia y el conocimiento con el fin de obtener herramientas que les permitan superar la adversidad con mayor eficacia. obtener herramientas que les permitan superar la adversidad con mayor eficacia. Por este motivo y gracias a un gran avance en las tecnologías de fabricación, ha surgido la impresión tridimensional (3D). Esta impresión se basa en la tecnología de fabricación aditiva que permite crear objetos sólidos en 3D a partir de un modelo digital [1].

Los métodos de impresión 3D actuales pueden producir piezas en una sola operación, produciéndolas completamente ensambladas o, alternativamente, facilitando el proceso de

ensamblaje [2]. Además, los objetos se modelan e imprimen con un alto grado de control estructural y espacial, creando y optimizando objetos que no se pueden construir con los procesos tradicionales.

Esta tecnología tiene amplias aplicaciones en diferentes campos [3]: automoción (producción de repuestos, creación de mecanismos de producción); aeroespacial (creación de piezas complejas); asistencia sanitaria (planificación de operaciones, desarrollo de implantes y prótesis, bioimpresión de tejidos, formación médica); venta al por menor (juguetes personalizados, uso en reparaciones simples); etc.

La impresión 3D está expandiendo su uso en el campo de la salud gracias a la fabricación de prótesis médicas debido a la alta adaptabilidad de cada pieza creada a las características exactas del paciente [4]. La integración de la impresión 3D y la biomimética promueve mejoras en la fabricación de materiales y estructuras funcionales, lo que supondrá avances en diversas aplicaciones en la industria biomédica [5,6]. La ingeniería de tejidos también ofrece soluciones muy interesantes para la medicina regenerativa al combinar células, factores de crecimiento, biomateriales y tecnología de impresión 3D para producir construcciones biológicas con la forma deseada, dando así lugar a la bioimpresión 3D.

La bioimpresión 3D es un proceso de fabricación de tejidos y órganos funcionales a partir de biomateriales por medio de un software informático que genera un modelo 3D. El proceso consiste en la adición de sucesivas capas de biomaterial, con la dificultad añadida de que, al ser material vivo, debe realizarse en condiciones que aseguren la supervivencia y proliferación de las células [7-9].

Para ello, en primer lugar, se digitaliza el tejido u órgano mediante alguna tecnología de procesamiento de imágenes (resonancia magnética, ultrasonidos...) para generar un modelo 3D. Posteriormente, este modelo digital se convierte a un archivo en formato Standard Triangle Language (STL) o, en su defecto, al tipo de archivo que lee la bioimpresora que vayamos a utilizar. Finalmente, la parte biológica consiste en la obtención y cultivo de las células. Este paso es clave, ya que requiere elegir las biotintas adecuadas para emular el tejido a fabricar. Una vez que se ha impreso el tejido u órgano, se mantiene en la bioimpresora para que madure antes de que pueda ser utilizado o estudiado [10].

La aplicación de estas tecnologías de impresión aditiva, por ejemplo, se ha disparado en popularidad en el sector dental, que ha comenzado a utilizarlas en los últimos años. La Federación Dental Mundial (FDI) afirma que la salud bucal es primordial para el mantenimiento de la salud y el bienestar general. Una dentición sana y funcional es un indicador clave de la calidad de vida.

El objetivo de este trabajo es, en primer lugar, estudiar la imprimibilidad de diferentes materiales con potencial para su uso en bioimpresión 3D. Para ello, se diseñarán herramientas mediante impresión 3D que permitan la caracterización completa de diferentes materiales biocompatibles mediante una bioimpresora 3D. Esto permitirá cuantificar y estandarizar los resultados obtenidos al poder controlar diferentes variables, como la humedad ambiental, la temperatura de impresión o la cantidad de material impreso. El segundo objetivo es comparar los resultados obtenidos y estudiar los usos de las estructuras de hidrogel y termoplástico obtenidas mediante tecnologías de fabricación aditiva (impresión 3D y bioimpresión 3D).

Estas dos líneas de estudio están cobrando cada vez más importancia en el campo de la medicina. Para llevarlos a cabo, se considerará la combinación de la bioimpresión 3D con software especializado en diseño asistido por ordenador (CAD), que permita fabricar estructuras 3D biomiméticas.

## 4.4.2 Materiales y métodos

### 4.4.2.1 Materiales

En este estudio se utilizaron los siguientes materiales de origen:

#### ➤ **Liofilizador ColMA**

El colágeno tipo 1 metacrilado (ColMA), suministrado por CELLINK, es un hidrogel híbrido, que se obtiene mediante la adición de grupos metacrilatos fotoactivos, lo que permite reticularlo mediante la activación de un fotoiniciador para dotar al hidrogel de propiedades estructurales mejoradas [11].

#### ➤ **Fotoiniciador LAP**

La sal de litio LAP trimetilbenzoilfosfinato es un fotoiniciador de radicales libres que se utiliza para iniciar la reacción de polimerización en cadena tras la exposición a la luz y se combina con las diferentes biotintas metacriladas, como ColMA o la gelatina metacrilato (GelMA), para producir un fotopolímero utilizado en bioimpresión [12]. El fotoiniciador LAP fue suministrado por CELLINK.

#### ➤ **Agentes de reconstitución A y P**

El Agente de reconstitución A es una solución de ácido acético para disolver y diluir biotintas CELLINK liofilizadas que incluyen colágeno en su composición, como el liofilizado Coll1 y el liofilizado ColMA. Las soluciones de colágeno reconstituido, en combinación con el tampón de colágeno, hacen que la biotinta sea isotónica y el pH más fácil de neutralizar.

El agente de reconstitución P es ideal para disolver y diluir el liofilizado GelMA y el liofilizado de metacrilato de ácido hialurónico (HAMA) para la formulación de biotintas. Tener pH fisiológico e isotonicidad debido a su composición basada en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y tampón HEPES, el Agente de reconstitución P hace que la biotinta sea adecuada para aplicaciones de cultivo celular.

Los agentes de reconstitución A y P fueron suministrados por CELLINK [13,14].

#### ➤ **Tampón de colágeno**

El tampón de colágeno permite que tanto ColMA como Coll1 tengan las condiciones de pH adecuadas para el cultivo celular.

La utilidad de los tampones, tanto en la regulación del equilibrio ácido-base en los organismos vivos como en el trabajo de laboratorio, radica en la posibilidad de mantener la concentración de iones de hidrógeno (H<sup>+</sup>) dentro de límites muy estrechos. Gracias al rojo de fenol de su composición, permiten ajustar el pH para que sea el adecuado tanto a la viscosidad de la biotinta como a la supervivencia celular.

El tampón de colágeno fue suministrado por CELLINK [15].

➤ **Hidróxido de sodio (NaOH)**

El hidróxido de sodio (NaOH) en lentejas fue suministrado por PanReac AppliChem[16]. Tanto NaOH como HCl se usaron para ajustar la solución a un pH apropiado [17].

➤ **GelMA Liofilizado**

GelMA Lyophilizate es un hidrogel híbrido a base de gelatina porcina que proporciona a las células un medio óptimo para el crecimiento celular. Los enlaces de esta biotinta se modifican con grupos metacrilatos para reticularse con un fotoiniciador cuando se exponen a la luz ultravioleta, confiriendo una mayor capacidad estructural.

El liofilizado GelMA fue suministrado por CELLINK [18].

➤ **Cellink START**

CELLINK Start es un gel soluble en agua que se utiliza como material de soporte para estructuras complejas, construcciones con porosidad en los tres ejes y construcciones cargadas de celdas. Este gel se imprime a temperatura ambiente [19].

➤ **HAMA Liofilizado**

HAMA Lyophilizate es un hidrogel híbrido a base de ácido hialurónico con metacrilato reticulable en presencia de un fotoiniciador.

El liofilizado HAMA fue suministrado por CELLINK [20].

➤ **PCL**

La policaprolactona es un poliéster termoplástico lineal biodegradable de alto peso molecular con un punto de fusión de 60°C y proporciona una estructura de refuerzo para construcciones de carga de tejidos [21].

➤ **Matrigel**

Matrigel es un extracto derivado de un tumor murino de Engelbreth- Holm-Swarm (EHS) [22]. Contiene todos los componentes principales conocidos de muchas membranas basales de tejidos. Es un sustrato muy útil para el cultivo de células 3D en vivo y estudios para analizar vías de diferenciación, de desarrollo y patológicas, así como para probar inhibidores/estimuladores de estos procesos y para detección de drogas, pruebas de toxicología o modelado de enfermedades [23]. Este material se convierte en estado sólido a 37°C.

#### 4.4.2.2 Equipos

Se utilizó el siguiente equipo para la realización del trabajo:

(i) Impresora 3D Ender 3 Pro [24], que permite la impresión de numerosos tipos de filamentos, como PLA, acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), entre otros.

(ii) Bioimpresora BIO X [25], que está equipado con tres cabezales intercambiables que permiten el uso de hasta tres materiales o herramientas diferentes para la bioimpresión de tejidos.

(iii) Escaneo 3D Einscan-SE [26], que permite el escaneo dual, es decir, exploración automática y exploración fija.

(IV) Autograph AG IS, que es una máquina de ensayo universal para estudios de compresión y tracción.

#### 4.4.2.3 Métodos

##### ➤ Reconstitución de liofilizado ColMa

Se añadió el volumen deseado del Agente de reconstitución A al vial de ColMA para lograr la concentración objetivo de la solución madre (CS). Se añadió una barra de agitación estéril para mezclar suavemente durante la noche a 4 °C sin generar burbujas de aire. Se mezcló la cantidad adecuada de tampón de colágeno y fotoiniciador. La mezcla se filtró a través de filtros de jeringa de 0,22 µm. La solución de colágeno se neutralizó en hielo agregando la mezcla a la cantidad adecuada de solución madre para obtener la concentración final deseada. El pH se ajustó agregando NaOH 1 M hasta alcanzar un color indicativo de pH 6,9-7,3 y PBS, y la mezcla se homogeneizó para obtener el hidrogel ColMa neutralizado. El contenido se transfirió a una jeringa.

##### ➤ Reconstitución de liofilizado GelMA

La cantidad deseada de fotoiniciador se disolvió en el volumen correspondiente de Agente de reconstitución P. La solución se filtró a través de filtros de jeringa de 0,22 µm. La mezcla filtrada se añadió al vial de GelMA Lyophilizate y la mezcla se calentó a 50 °C durante 60 min. El pH se ajustó mediante el uso de NaOH o HCl al rango óptimo de 7,0 a 7,4. La solución de GelMA se transfirió a una jeringa.

##### ➤ HAMA Liofilizado

La cantidad deseada de fotoiniciador se disolvió en el volumen correspondiente de Agente de reconstitución P. La solución se filtró a través de filtros de jeringa de 0,22 µm. La mezcla filtrada se añadió al vial de GelMA Lyophilizate y la mezcla se calentó a temperatura ambiente durante 60 min. El pH se ajustó mediante el uso de NaOH o HCl al rango óptimo de 6,5 a 7,4. La solución de HAMA se transfirió a una jeringa.

#### 4.4.3 Resultados

##### ➤ Materiales de partida y formación de hidrogel.

Los hidrogeles utilizados en este estudio fueron GelMA, ColMA, HAMA y Matrigel ya que son capaces de obtener una mayor viabilidad o proliferación celular en comparación con otros. Además, como referencia, se utilizó un hidrogel soluble en agua estándar llamado CELLINK Start, que a menudo se usa como material de sacrificio para construcciones debido a su facilidad de uso y capacidad de impresión [27]. Además de los hidrogeles, se utilizó PCL, que es un termoplástico hidrófobo y biodegradable compuesto de policaprolactona terminada en éster, como material de andamiaje. GelMA al cinco por ciento y al 10 %, ColMA con una concentración objetivo de 5 mg/ml

y 10 mg/ml, y finalmente HAMA al 5 % se reconstituyeron siguiendo los protocolos proporcionados por CELLINK.

Para saber cuál de los hidrogeles utilizados en este trabajo es el más adecuado para imprimir una estructura biomimética, es necesario estudiar su imprimibilidad y algunas de sus características.[28]. De esta forma, podremos comparar el hidrogel que mejores garantías ofrece con PCL. En otras palabras, podemos comparar entre la impresión 3D utilizando la tecnología de modelado por deposición fundida (FDM) y la bioimpresión 3D utilizando la tecnología FDM.

Para caracterizar los hidrogeles se utilizó una bioimpresora 3D BIO X en una cámara que permite el control de diferentes variables clave en el proceso de bioimpresión [29], como la humedad ambiental, la temperatura de impresión, la temperatura de la cama sobre la que se deposita el material impreso y la presión aplicada.

Teniendo en cuenta que una de las principales líneas de investigación dentro de la bioimpresión es la optimización de la tecnología de impresión 3D para la introducción de células en hidrogeles, cada hidrogel fue bioimpreso en condiciones específicas que permitieron la máxima viabilidad celular, con el objetivo de comparar cada hidrogel en su punto óptimo de imprimibilidad. al tiempo que asegura la viabilidad celular del hidrogel.

➤ **Método de la gota sésil**

El ángulo de contacto de una gota de hidrogel es una medida de la capacidad de un líquido para humedecer la superficie de un sólido. Los valores de ángulo entre 0° y 90° indican una superficie hidrofílica humectable, mientras que un ángulo entre 90°y 180°indica una superficie hidrófoba no humectable [9,30].



Figura 4-21: Cámara generada para aislar las gotas de los hidrogeles y permitir



Figura 4-22: Obtención del ángulo de contacto en la interfaz sólido-aire.

Para realizar una correcta medición del ángulo de contacto de la gota de hidrogel, se diseñó y fabricó un cubo con una de sus caras abierta de manera que en su base se pudiera colocar una placa de vidrio u otro material que no genere absorción de los hidrogeles. Este diseño evita la generación de sombras provocadas por la iluminación de la estancia. Además, en la parte superior del cubo se coloca un diodo emisor de luz (LED) para generar una iluminación vertical sobre la gota de hidrogel a analizar (Figura 3-22).

Las pruebas se realizaron en la interfaz sólido-aire y las imágenes del ángulo de contacto se tomaron perpendiculares a la placa de soporte de gotas de hidrogel y luego se procesaron con el software CAD. Se tomaron cuatro medidas con cada hidrogel para obtener una medida precisa y real (Figura 22).

Las superficies demasiado hidrofílicas ( $<35^\circ$ ) evitan las interacciones con las células, y las superficies demasiado hidrofóbicas ( $>80^\circ$ ) provocan la desnaturalización de las proteínas, por lo que los ángulos de contacto ideales para la biocompatibilidad se encuentran aproximadamente en el rango de  $35^\circ$  a  $80^\circ$ , lo que se conoce como humectabilidad moderada [31].

Aunque esta prueba no es determinante para saber si el hidrogel va a presentar una correcta viabilidad celular, sí nos muestra, a un bajo coste económico, otras características interesantes:

(i) Presión que debe aplicarse para que se libere una gota de hidrogel. Cuanto mayor sea la cantidad de presión generada, mayores serán las fuerzas originales dentro de la jeringa, por lo que puede reducirse la supervivencia celular.

(ii) Viscosidad del hidrogel. Aunque esta prueba no nos permite cuantificar la viscosidad del hidrogel ni su gelificación, sí nos permite predecir visualmente qué hidrogeles van a presentar un mayor estado de gelificación. Esta es una característica muy importante para obtener una correcta imprimibilidad.

(iii) Humectabilidad del hidrogel. Está relacionado con la adhesión celular y la propagación [32].

La Tabla 3-6 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 4-6: Resultados del ángulo de contacto para hidrogeles estudiados.**

Material	Temperature [°C]	Contact angle
GelMA 5%	Ambient	116
	30	54
	40	51
GelMA 10%	Ambient	120
	30	109
	40	37
ColMA (Cs=5)	9	32
	15	31
ColMA (Cs=10)	9	45
	15	46
HAMA 5%	9	46
	Ambient	42
	30	40
	40	40
Matrigel	9	45
	15	48

Tanto Matrigel como ColMA con diferentes concentraciones no pudieron ser analizados a la temperatura de 25°C en la sala donde se realizó el experimento, ya que ambos se entrecruzaron a una temperatura superior a 15°C. GelMA al diez por ciento a una temperatura de 40°C mostró un ángulo de contacto interesante, pero una temperatura de impresión superior a 37°C sometería a las

células a un alto estrés que conduciría a la muerte celular. Los materiales a base de colágeno tenían una viscosidad muy baja por encima de los 30°C, lo que dificultaba su bioimpresión. Por lo tanto, se debe considerar su combinación con otros materiales.

A la vista de los resultados de la Tabla 6, los hidrogeles más interesantes para obtener una buena viabilidad y proliferación celular son GelMA al 5%, ColMA con una concentración diana de 10 mg/ml, HAMA al 5% y Matrigel, por lo que el resto de hidrogeles, por presentar peores características en esta primera prueba, fueron descartados en este estudio.

Matrigel es un material que requiere baja temperatura para su mantenimiento, ya que polimeriza a temperatura ambiente. Por lo tanto, su temperatura debe ser baja tanto cuando se realice el método de la gota sésil como al usarlo como biotinta en la bioimpresora. Debido a su baja temperatura de bioimpresión, este hidrogel no es adecuado para bioimpresión con carga celular, pero los buenos resultados obtenidos en el método de gota sésil indican que es adecuado para la carga posterior de células en la estructura generada por bioimpresora, porque los ángulos de contacto son entre 35° y 80°.

#### ➤ Prueba de colapso de filamentos

El objetivo de esta prueba es analizar la deflexión del filamento de hidrogel a analizar para diferentes distancias. Para ello se ha desarrollado una plataforma de las mismas dimensiones que una placa de Petri, formada por pilares que se van separando progresivamente una unidad (figura 3-23).

Esta plataforma se diseñó con Inventor, se imprimió con PLA y se recubrió con resina. Esta plataforma, diseñada para ser colocado y ajustado a la cama de impresión de la bioimpresora BIO X, nos permite controlar, para cada hidrogel analizado en este estudio, las condiciones en las que se realiza el estudio, ya que la bioimpresora nos permite ajustar la cantidad de material extruido, la velocidad de extrusión y colocación en la plataforma, la temperatura y la presión ejercida sobre la jeringa que contiene la biotinta. De esta forma, este estudio puede ser fácilmente reproducido por cualquier centro de investigación con acceso a una bioimpresora para comparar los resultados (Figura 24).

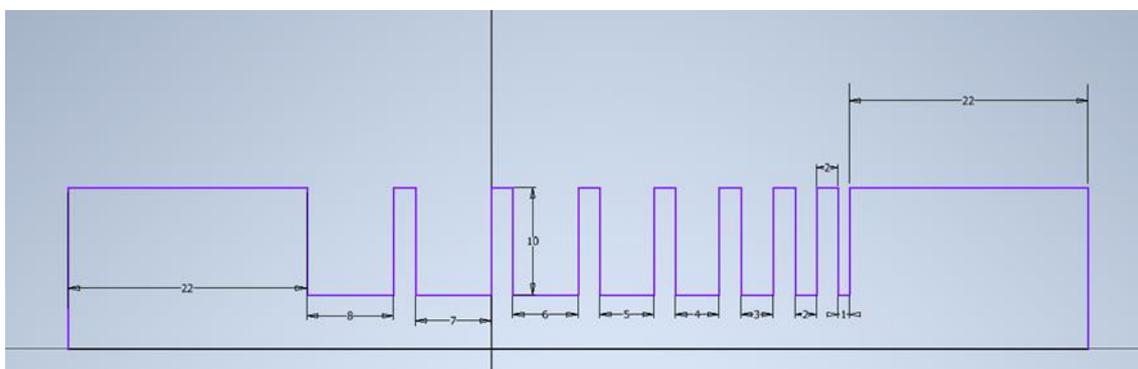


Figura 4-23: Diseño de plataforma para la prueba de colapso usando Inventor. Fuente de elaboración propia.

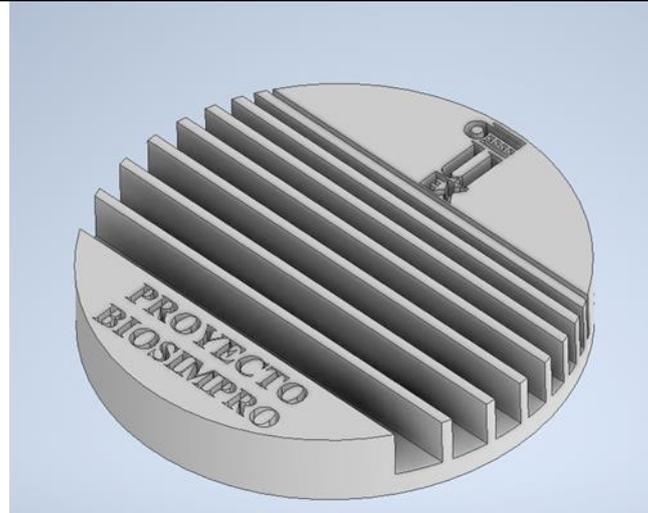


Figura 4-24: Modelo final de la plataforma en forma de placa de Petri que se utilizará junto con una bioimpresora para realizar la prueba de colapso mediante el control de los diferentes parámetros influyentes en la bioimpresión 3D. Imagen obtenida con el software Inventor. Fuente: elaboración propia.

Para determinar el área colapsada, se depositó un filamento de hidrogel sobre todos los pilares, y se determinó cuándo diferían mucho el área teórica y el área real. De esta manera, la tasa de colapso se puede obtener [33]:

$$C_f = \frac{A_t^c - A_a^c}{A_t^c} \cdot 100\% \quad (1)$$

$A_t^c$ : Área total.

$A_a^c$ : Área generada después de depositar el filamento (área real).

Figuras 25 y 26 muestran un ejemplo de cómo se realiza la prueba y una muestra de cómo quedaría, respectivamente. Si el filamento no colapsa, coincidiendo el área real y el área total, el coeficiente de colapso es 0%. La Tabla 3-7 muestra los resultados de la prueba.

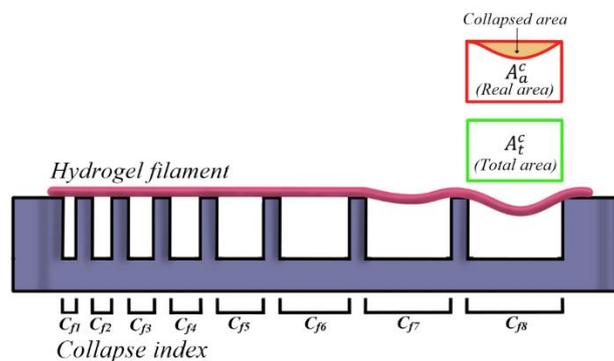


Figura 4-25: Medición del área colapsada. Fuente: elaboración propia.

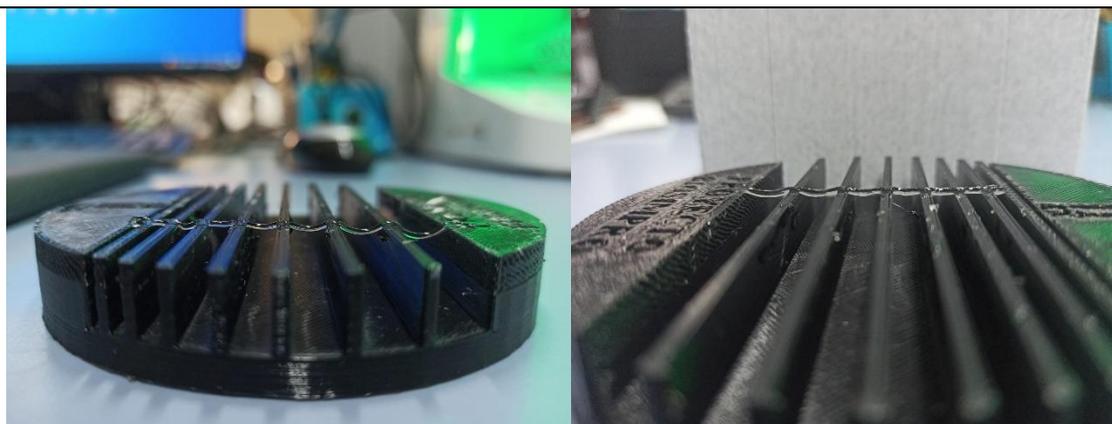


Figura 4-26: Ensayo de colapso de filamentos. La imagen de la izquierda muestra el hidrogel estándar y la imagen de la derecha muestra el GelMA (5%). Fuente: elaboración propia.

Para este estudio, y con base en los resultados del método de gota sésil que se muestra en la Tabla 3-6, se descartaron GelMA al 10% y ColMA con una concentración objetivo de 5 mg/ml, ya que no estaban dentro del rango de 35°–80° del método de gota sésil.

El uso de esta prueba, junto con la plataforma propuesta, nos permite cuantificar la deflexión de los hidrogeles, así como analizar su capacidad para generar puentes y cuál sería el puente más grande que podrían soportar, obteniendo así un resultado inferido. para ser colocado y ajustado a la cama de impresión de la

La Tabla 3-7 muestra que los únicos hidrogeles que aseguran condiciones de resistencia al colapso son el hidrogel estándar y el GelMA al 5%, y que el hidrogel con peor resultado de colapso fue el ColMA ( $C_s = 10$ ).

Tabla 4-7: Prueba de colapso de filamentos probada en diferentes hidrogeles.

Hydrogel	$C_{f1}$	$C_{f2}$	$C_{f3}$	$C_{f4}$	$C_{f5}$	$C_{f6}$	$C_{f7}$	$C_{f8}$
CELLINK Start	0	0	0	0	2.43	5.64	9.83	10.302
ColMA ( $C_s = 10$ )	0	100	100	100	100	100	100	100
HaMA 5%	0	0	100	100	100	100	100	100
GelMA 5%	0	0	0	0	0	2.49	3.59	7.33
Matrigel	0	0	100	100	100	100	100	100

Analizando el estado de gelificación podemos obtener la imprimibilidad ( $Pr$ ), que se define como:

$$Pr = \frac{\pi}{4} \cdot \frac{1}{C} \quad (2)$$

$$\text{If the figure is square} \rightarrow C = \frac{4\pi}{16} \rightarrow Pr = \frac{\pi}{4} \cdot \frac{16}{4\pi} = 1 \quad (3)$$

Esta prueba también determina si el hidrogel tiene propiedades mecánicas suficientes para generar una “cuadrícula” o matriz de cuadrados o rectángulos de diferentes dimensiones, similar a la que se muestra en Figura 3-28 [35]. Para realizar esta prueba, primero, el área en mm<sup>2</sup> de la grilla fue obtenido/diseñado, el cual será referido como el valor teórico. Posteriormente, se mide el área bioimpresa real, que se denominará valor real, y se comparan ambos valores utilizando la herramienta estadística de la desviación estándar. En paralelo, se puede determinar el valor de Pr.

Una vez conocidas las dimensiones de la matriz diseñada (valor teórico), se utiliza un programa de procesamiento de imágenes para obtener las dimensiones reales (valor real) que genera el hidrogel al crear la matriz. Para este estudio se eliminó el ColMA (Cs = 10), por ser el que peores resultados dio en la prueba de colapso del filamento (Cuadro 3). De los resultados en la Tabla 3-7, se puede ver que ni HAMA ni Matrigel gelifican adecuadamente, es decir, no tienen un Pr igual a 1 o cercano a 1 para obtener una estructura biomimética compleja.

El GelMA al 5% fue capaz de imprimir una cuadrícula con ángulos cercanos a los 90°C, aunque el estado de gelificación fue un poco alto ya que eran visibles pequeños coágulos de hidrogel. A la vista de los resultados, sólo se cuantificó la “red” del GelMA al 5%, ya que, por un lado, el hidrogel estándar es soluble en agua y por tanto no sirve para hacer una estructura biomimética que pudiera ser utilizable, y por otro Por otro lado, el resto de los materiales no mostró un comportamiento aceptable en las pruebas anteriores. Respecto al GelMA al 5%, la cuantificación de la “grid” nos ayuda a determinar si su estado de gelificación, que es algo elevado, podría ser un problema para generar estructuras biomiméticas.

Los cuadrados se midieron de izquierda a derecha y de abajo hacia arriba, comenzando con el cuadrado de la esquina inferior izquierda, en la fila 1, y terminando con el cuadrado de la esquina superior derecha, en la fila 5. Las medidas realizadas se tabulan en la Tabla 7, en el que no hay gran diferencia entre el valor real y el valor teórico.

Cabe señalar que al imprimir el 5% GelMA con la bioimpresora, la cuadrícula más pequeña de área teórica de 0,42 mm<sup>2</sup> capas superpuestas generadas y bioimpresión no se pudo realizar correctamente. La diferencia entre el valor teórico y el valor real en las medidas de área se debe, en la mayoría de los casos, a que el hidrogel no lograba ángulos perfectos de 90° y que en algunos puntos se superponían varias capas de hidrogel generando pequeños desbordamientos.

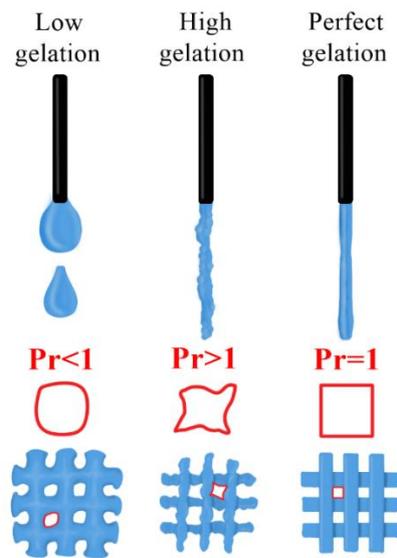


Figura 4-27: Estudio comparativo de imprimibilidad. Fuente: elaboración propia.

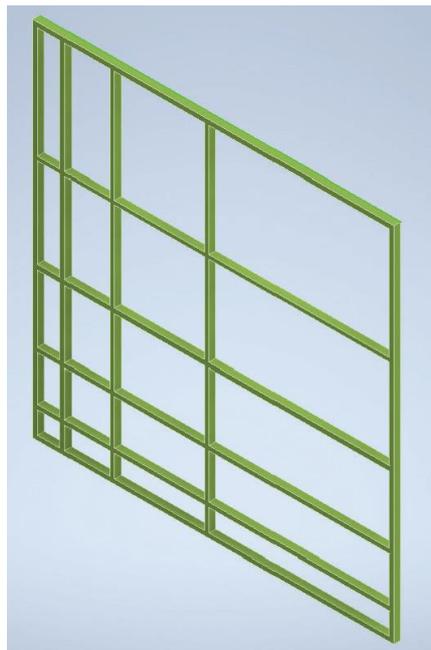


Figura 4-28: Matriz formada por cuadrados y rectángulos de diferentes dimensiones. Imagen obtenida con el software Inventor. Fuente: elaboración propia.

Tabla 4-8: Resultados del estudio de imprimibilidad.

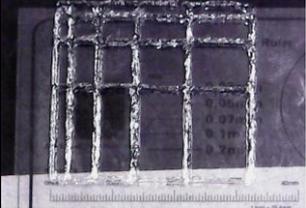
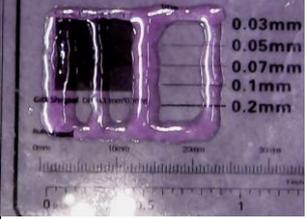
Hydrogel	Image	Pr	State of gelation
CELLINK Start		1	Appropriate
HaMA 5%		<1	Low
GelMA 5%		1	Appropriate/High
Matrigel		<1	Low

Tabla 4-9: Tabla resumen de la diferencia de los valores real y objetivo al realizar la prueba de rejilla.

	Real value (mm <sup>2</sup> )	Theoretical value (mm <sup>2</sup> )	Standard deviation
Row 1	0,42	2,55	1,51
	4,26	5,10	0,59
	8,05	10,20	1,52
	17,33	20,41	2,18
Row 2	4,48	5,10	0,44
	9,98	10,21	0,16
	17,52	20,41	2,04
	36,33	40,83	3,18
Row 3	6,50	7,65	0,81
	14,66	15,31	0,46
	25,78	30,62	3,42
	55,08	61,24	4,35
Row 4	8,96	10,20	0,88
	19,45	20,41	0,68
	36,23	40,83	3,26
	74,40	81,66	5,13
Row 5	10,36	12,76	1,69
	23,71	25,52	1,28
	48,80	51,03	1,58
	98,68	102,06	2,39

---

➤ **Estudio de imprimibilidad de termoplásticos**

En este estudio, utilizamos PCL como un termoplástico no tóxico debido a su buena biocompatibilidad y lentas características de biodegradación. Esta última característica es muy interesante para los objetivos propuestos, ya que permitiría que nuestro andamio biomimético se biodegradara a medida que se produce la regeneración ósea. Además, se ha demostrado que PCL mejora y promueve la regeneración ósea [36].

Para comprobar la idoneidad de PCL para la bioimpresión y ver las diferencias significativas con respecto a los hidrogeles, se utilizaron las pruebas mencionadas anteriormente. La única prueba que no se utilizó es el método de gota sésil, que no proporciona ninguna información relevante sobre los termoplásticos.

En la tabla 3-10 se muestran los resultados de la prueba de rejilla de impresión PCL, donde se puede afirmar que se reprodujo la estructura previamente diseñada prácticamente sin diferencia entre el área teórica y el área real. La prueba de colapso del filamento que se muestra en la Tabla 3-11 demuestra que PCL tiene una gran capacidad para generar puentes con una alta resistencia al colapso. Además, mostró una muy buena imprimibilidad sin diferencia entre el valor teórico y el valor real.

Tabla 4-10: Tabla resumen de la diferencia de los valores real y objetivo al realizar la prueba de rejilla.

	Real value (mm <sup>2</sup> )	Theoretical value (mm <sup>2</sup> )	Standard deviation
Row 1	2,53	2,55	0,01
	5	5,10	0,07
	10,19	10,20	0,01
	20	20,41	0,29
Row 2	4,9	5,10	0,14
	10,12	10,21	0,06
	20,14	20,41	0,19
	40,9	40,83	0,05
Row 3	7,7	7,65	0,04
	15,25	15,31	0,04
	31	30,62	0,27
	62,2	62,24	0,03
Row 4	10	10,20	0,14
	20,44	20,41	0,02
	40,82	40,83	0,01
	81,62	81,66	0,03
Row 5	12,71	12,76	0,04
	25,55	25,56	0,01
	51	51,03	0,02
	102,02	102,06	0,03

Tabla 4-11: Prueba de colapso de filamentos probada en los diferentes hidrogeles.

Material	$C_{f1}$	$C_{f2}$	$C_{f3}$	$C_{f4}$	$C_{f5}$	$C_{f6}$	$C_{f7}$	$C_{f8}$
PCL	0	0	0	0	0	0	0	0

➤ **Resultados de la impresión de una estructura biomimética**

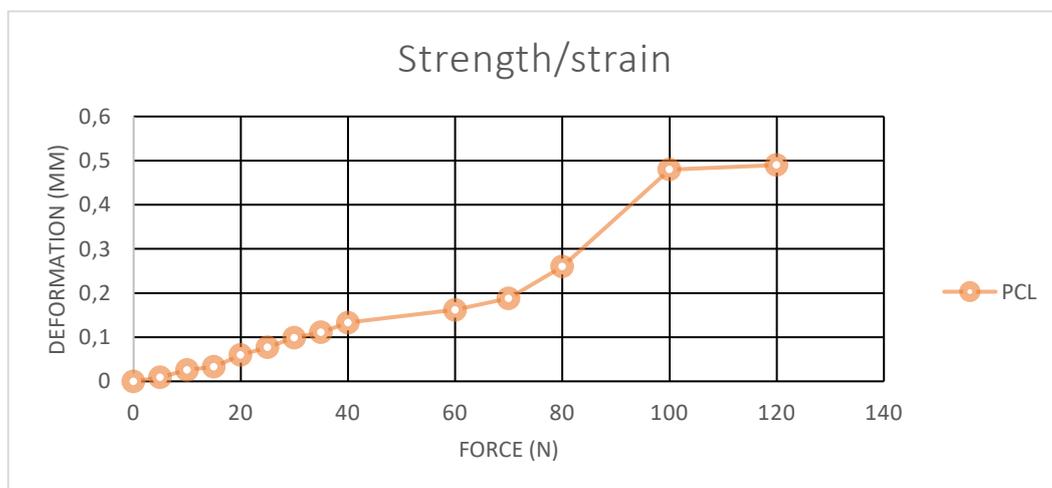
Los buenos resultados, que solo se obtuvieron en la bioimpresión del hidrogel a base de gelatina (GelMA) después de seguir la metodología de imprimibilidad, muestran que la estructura bioimpresa tenía características estructurales suficientemente aceptables para una estructura compleja. Antes de intentar bioimprimir una estructura biomimética, se ajustaron los parámetros de velocidad, temperatura y presión para asegurar la correcta bioimpresión de un andamio simple con los diferentes hidrogeles creados. Posteriormente, utilizando el escáner 3D Einscan-SE, se desarrolló un modelo digital de un ejemplo de estructura biomimética, en este caso un diente humano (Figura 3-29).



**Figura 4-29: Bioimpresión utilizando hidrogel GelMA al 5%. Fuente: elaboración propia.**

Como se muestra en la Figura 3-29, el hidrogel GelMA al 5% forma un diente con una forma fiable con respecto al diente real. Después de la impresión, se aplicó luz ultravioleta de 405 nm durante 30s para endurecer el hidrogel. La dureza de la estructura generada era muy baja, ya que no era posible aplicar ninguna presión sin provocar una pérdida de su forma.

El PCL, por otro lado, muestra resultados de compresión muy aceptables, como se muestra en la Figura 3-30. Por lo tanto, las características de dureza no son un problema de este material, que tiene una deformación insignificante cuando se aplica un rango de presiones.



**Figura 4-30: Deformación del PCL bajo diferentes fuerzas aplicadas.**

La Figura 3-31 muestra el diente impreso con PCL después del estudio de compresión.

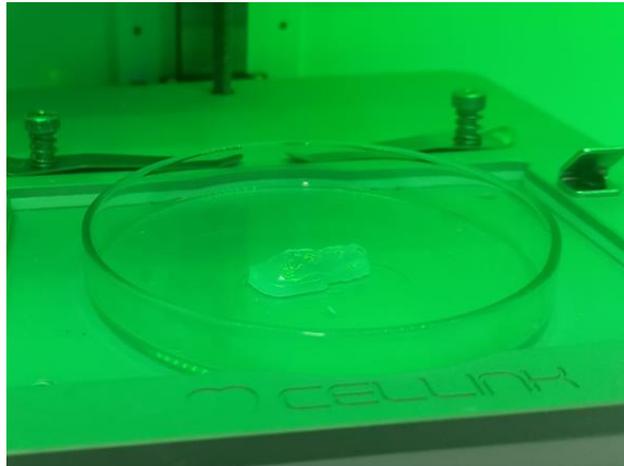


Figura 4-31: Diente impreso con PCL.

#### 4.4.4 Conclusiones

En conclusión, de todos los materiales utilizados en este estudio, PCL y el GelMA al 5% son válidos para la metodología propuesta y para la fabricación de un andamio con forma biomimética. Aunque los hidrogeles estudiados son mejores que los termoplásticos en términos de viabilidad celular, lo que indica la capacidad de introducir células en su interior durante el proceso de bioimpresión, tienen propiedades mecánicas bajas para generar estructuras biomiméticas, ya sea por deficiente gelificación que conduce a una baja imprimibilidad o porque son incapaces de generar puentes sin colapsarse.

Sólo el 5% de GelMa permitió la realización de estructuras complejas. estructuras complejas, ya que superó todas las pruebas propuestas en este estudio. Tras bioimprimir una estructura en forma de diente estructura en forma de diente, se comprobó que tiene gran capacidad para reproducir estructuras sin causar problemas durante la impresión, pero la forma 3D de la estructura generada cambiaría al aplicar fuerzas sobre ella.

El PCL, debido a su alta imprimibilidad, su alta resistencia, su capacidad de producir puentes sin colapsarse, y sus ideales características biológicas, es el más interesante de todos los materiales estudiados. Por otra parte, cabe señalar que la bioimpresión 3D, en combinación con hidrogeles híbridos presenta una mayor capacidad de evolución y un alto potencial en ingeniería tisular, por lo que debería ser el foco de nuestros esfuerzos en el desarrollo de esta metodología. Además, el uso de hidrogeles proporciona buenas propiedades de viabilidad celular al imitando mejor la matriz extracelular de los diferentes tejidos del organismo, por lo que su mejora y desarrollo debe ser una prioridad en el estudio de la bioimpresión.

#### 4.4.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Derby, "Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds," *Science* (1979), vol. 338, no. 6109, pp. 921–926, Nov. 2012, doi: 10.1126/SCIENCE.1226340.
- [2] A. J. Robson, "Complex evolutionary systems and the Red Queen," *Economic Journal*, vol. 115, no. 504, Jun. 2005, doi: 10.1111/J.1468-0297.2005.01002.X.
- [3] Y. Yang et al., "Recent Progress in Biomimetic Additive Manufacturing Technology: From Materials to Functional Structures," *Advanced Materials*, vol. 30, no. 36, Sep. 2018, doi: 10.1002/ADMA.201706539.
- [4] R. A. López, "Impresión 3D y sus aplicaciones en Medicina", [Online]. Available: [www.timetoast.com/timelines/linea-del-](http://www.timetoast.com/timelines/linea-del-)
- [5] Y. Zhu et al., "3D printing biomimetic materials and structures for biomedical applications," *Biodes Manuf*, vol. 4, no. 2, pp. 405–428, Jun. 2021, doi: 10.1007/S42242-020-00117-0.
- [6] P. X. Ma, "Biomimetic Materials for Tissue Engineering," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 60, no. 2, p. 184, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.ADDR.2007.08.041.
- [7] F. Ghorbani et al., "Bioprinting a cell-laden matrix for bone regeneration: A focused review," *J Appl Polym Sci*, vol. 138, no. 8, Feb. 2021, doi: 10.1002/APP.49888.
- [8] R. Rego et al., "DEVELOPMENT OF A DEVICE FOR THE CONTROL OF VARIABLES IN THE BIOPRINTING OF HYDROGELS," pp. 6–9, 2021.
- [9] S. Lauzurica, S. Rocío, and C. Simón, "Lucía González Yeguas," 2020. [Online]. Available: <https://oa.upm.es/65708/>
- [10] S. Vijayavenkataraman, W. C. Yan, W. F. Lu, C. H. Wang, and J. Y. H. Fuh, "3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 132, pp. 296–332, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.ADDR.2018.07.004.
- [11] "PhotoCol® Methacrylated Type I Collagen - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/photocol-methacrylated-type-i-collagen/>
- [12] A. K. Nguyen, P. L. Goering, R. K. Elespuru, S. S. Das, and R. J. Narayan, "The Photoinitiator Lithium Phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) Phosphinate with Exposure to 405 nm Light Is Cytotoxic to Mammalian Cells but Not Mutagenic in Bacterial Reverse Mutation Assays," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 7, pp. 1–13, Jul. 2020, doi: 10.3390/POLYM12071489.
- [13] "Agente de Reconstitución P 50 ml - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/reconstitution-agent-p-50-ml/> (accessed Aug. 09, 2022).
- [14] "Agente de reconstitución A - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/reconstitution-agent-a-30-ml/> (accessed Aug. 09, 2022).
- [15] "Solución Coll 1 10 mg/ml - CELLINK." <https://www.cellink.com/product/coll-1-solution-10-mg-ml/>

- [16] “Sodio Hidróxido CAS 1310-73-2 - PanReac AppliChem.” <https://itwreagents.com/iberia/es/product/sodio-hidroxido-lentejas-reag-usp-para-analisis-ac-s-iso/131687>
- [17] N. Bodenberger, D. Kubiczek, and F. Rosenau, “Easy manipulation of architectures in protein-based hydrogels for cell culture applications,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2017, no. 126, Aug. 2017, doi: 10.3791/55813.
- [18] “GelMA Lyophilizate - 3D Cell Culturing and Bioprinting CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/gelma-lyophilizate/>
- [19] “CELLINK START - CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/cellink-start/>
- [20] “PhotoHA® Stiff Methacrylated Hyaluronic Acid - CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/photoha-methacrylated-hyaluronic-acid/>
- [21] “CELLINK PCL - CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/cellink-pcl/> (accessed Oct. 24, 2022).
- [22] K. G. Danielson, A. Martinez-Hernandez, J. R. Hassell, and R. v. Iozzo, “Establishment of a cell line from the EHS tumor: biosynthesis of basement membrane constituents and characterization of a hybrid proteoglycan containing heparan and chondroitin sulfate chains,” *Matrix*, vol. 12, no. 1, pp. 22–35, 1992, doi: 10.1016/S0934-8832(11)80101-0.
- [23] A. Passaniti, H. K. Kleinman, and G. R. Martin, “Matrigel: history/background, uses, and future applications,” *J Cell Commun Signal*, pp. 1–6, Aug. 2021, doi: 10.1007/S12079-021-00643-1/FIGURES/4.
- [24] “Creality Ender 3 Pro-mejor impresora 3d profesional 2021|Impresora 3D.” <https://www.creality3dofficial.com/es/products/creality-ender-3-pro-3d-printer>
- [25] “BIO X Bioprinter - Product Page - CELLINK.” <https://www.cellink.com/product/bio-x/>
- [26] “Shining 3D | EINSCAN-SE | Sicnova.” <https://tienda.sicnova3d.com/einscan-s-se-y-sp/2842-einscan-se>
- [27] E. A. Kiyotake, A. W. Douglas, E. E. Thomas, S. L. Nimmo, and M. S. Detamore, “Development and quantitative characterization of the precursor rheology of hyaluronic acid hydrogels for bioprinting,” *Acta Biomater*, vol. 95, pp. 176–187, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.01.041.
- [28] E. Mancha Sánchez et al., “Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, p. 776, Aug. 2020, doi: 10.3389/FBIOE.2020.00776/BIBTEX.
- [29] M. Matamoros et al., “Temperature and Humidity PID Controller for a Bioprinter Atmospheric Enclosure System,” *Micromachines* 2020, Vol. 11, Page 999, vol. 11, no. 11, p. 999, Nov. 2020, doi: 10.3390/MI11110999.

- 
- [30] M. Esquivel, M. Lopretti, and J. Roberto Vega-Baudrit, "HIDROGELES HÍBRIDOS DE QUITOSANO Y POLIETILENGLICOL (QUIT:PEG) PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS", [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/351765144>
- [31] D. E. Barrido, "CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE ALEACIONES PARA IMPLANTES MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO".
- [32] M. Mehdizadeh Omrani et al., "Polyether ether ketone surface modification with plasma and gelatin for enhancing cell attachment," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 109, no. 5, pp. 622–629, May 2021, doi: 10.1002/JBM.B.34726.
- [33] U. Nacional De Córdoba, P. Integrador, A. : Morello, and M. Candela, "Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales MATERIAL DE BIOIMPRESIÓN 3D".
- [34] S. Kyle, Z. M. Jessop, A. Al-Sabah, and I. S. Whitaker, "'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art," *Adv Healthc Mater*, vol. 6, no. 16, Aug. 2017, doi: 10.1002/ADHM.201700264.
- [35] M. A. Habib and B. Khoda, "Development of clay based novel bio-ink for 3D bio-printing process," *Procedia Manuf*, vol. 26, pp. 846–856, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.PROMFG.2018.07.105.
- [36] Eduardo Silva Beltrá, "Obtención y caracterización de un material compuesto de PCL/MWCNT/nHA por impresión 3D," Instituto Tecnológico de Zacatepec, Zacatepec, Morelos, 2019.

## 4.5 Relación entre las propiedades reológicas de cizallamiento de las biotintas y los parámetros de bioimpresión



International Journal of Bioprinting

### RESEARCH ARTICLE

## Relationship between shear-thinning rheological properties of bioinks and bioprinting parameters

Raúl Sánchez-Sánchez<sup>2</sup>, Jesús M. Rodríguez-Rego<sup>1</sup>, Antonio Macías-García<sup>2</sup>, Laura Mendoza-Cerezo<sup>1</sup>, Antonio Díaz-Parralejo<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>Department of Graphic Expression, School of Industrial Engineering, University of Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Department of Mechanical, Energy and Materials Engineering, School of Industrial Engineering, University of Extremadura, Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz, Spain

**Keywords:** *Bioprinting; Bioinks; Rheology; Computer simulation; Fluid dynamics*

## Resumen

Debido a su extraordinario potencial para revolucionar la medicina regenerativa. Permite la fabricación mediante la deposición aditiva de productos bioquímicos, materiales biológicos y células vivas para la generación de estructuras en bioingeniería. Existen diversas técnicas y biomateriales o biotintas que son adecuados para la bioimpresión. Sus propiedades reológicas están directamente relacionadas con la calidad de estos procesos. En este estudio, se prepararon hidrogeles a base de alginato utilizando  $\text{CaCl}_2$  como agente reticulante iónico. Se estudió su comportamiento reológico y se realizaron simulaciones de los procesos de bioimpresión en condiciones predeterminadas, buscando posibles relaciones entre los parámetros reológicos y las variables utilizadas en los procesos de bioimpresión. Se encontró una clara relación lineal entre la presión de extrusión y el parámetro reológico de índice de consistencia de flujo,  $k$ , y entre el tiempo de extrusión y el parámetro reológico de índice de comportamiento de flujo,  $n$ . Esto permitiría simplificar los procesos repetitivos aplicados actualmente para optimizar la presión de extrusión y la velocidad de desplazamiento del cabezal dispensador, ayudando así a reducir el tiempo y el material utilizados, así como a optimizar los resultados de bioimpresión requeridos.

**Palabras clave:** Bioimpresión, Biotintas Reología, Simulación computacional, Dinámica de fluidos.

### 4.5.1 Introducción

La evolución de la tecnología de deposición de materiales capa a capa denominada impresión tridimensional (3D) o fabricación aditiva [1] ha llevado a su aplicación (como bioimpresión 3D) en el ámbito sanitario. La principal motivación ha sido la limitada disponibilidad de órganos para trasplantes [2]. La bioimpresión 3D es una tecnología en constante desarrollo con el potencial de revolucionar la medicina regenerativa [3].

La bioimpresión puede definirse como la deposición de productos bioquímicos, materiales biológicos y células vivas a través de la fabricación aditiva para la generación de estructuras de bioingeniería, que están hechas de materiales biológicos y biológicamente relevantes [4]. Permite imprimir células, tejidos y órganos a voluntad en función de las necesidades, aunque esta tecnología actualmente no está lo suficientemente maduro como para imprimir estructuras para su uso en humanos. Algunas de las aplicaciones más buscadas son la bioimpresión de piel [5,6], tejido cardíaco [7], injertos vasculares cartílago [8], y tejidos duros como el hueso [9,10].

En las técnicas de bioimpresión, generar la geometría deseada en modelos 3D mediante ingeniería tisular es tan importante como la proliferación celular en el paso posterior, ambos son la supervivencia del tejido impreso y su éxito funcional. La tecnología de bioimpresión elegida también influye en la estrategia adoptada para abordar el proceso de bioimpresión y la selección de los materiales que se van a utilizar. Las técnicas de bioimpresión se clasifican en técnicas de inyección de tinta, microextrusión ( $\mu$ -extrusión) y técnicas asistidas por láser [11]. La más utilizada por la comunidad científica es la microextrusión [12]. razones por las que se eligió esta tecnología para la simulación en el presente estudio.

Un aspecto importante del proceso de bioimpresión es utilizar materiales que permitan reproducir la matriz extracelular nativa (MEC) extracelular (MEC) nativa como medio para el desarrollo un medio que tenga las propiedades biológicas, físicas y mecánicas ideales para un buen proceso de bioimpresión. propiedades biológicas, físicas y mecánicas idóneas para un que emule el desarrollo del sistema deseado. En concreto, la definición de bioink se atribuye a un biomaterial que contiene una determinada carga celular.

Los materiales más utilizados como biotintas para fabricar estructuras 3D son polímeros, cerámicas, lípidos, elastómeros e hidrogeles [13]. Los hidrogeles se distinguen de los demás como los materiales que mejor simulan la MEC y se han y se han consolidado como la opción prácticamente universal para los procesos de bioimpresión [14-16].

Los biomateriales formados por cadenas poliméricas no suelen tienen muy buenas propiedades mecánicas ya que no tienen estructuras 3D bien formadas. Esto suele remediarse aplicando un proceso de reticulación. Se trata de una reacción en la que se forma una red tridimensional entrelazando diferentes cadenas poliméricas lineales o poco ramificadas. Uno de los procesos más utilizados se basa en la reticulación iónica [17], en la que la adición de cationes multivalentes a la solución polimérica provoca una rápida gelificación debido a la alta solubilidad de los cationes en soluciones acuosas [18]. El agente de reticulación más utilizado con el alginato, por ejemplo, es el cloruro cálcico (cloruro de calcio). ejemplo, es el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

La composición final resultante de los hidrogeles influye directamente en la calidad de la bioimpresión. influye directamente en la calidad de la bioimpresión e indica los pasos para conseguir una determinada estructura 3D. Por lo tanto, es necesaria una caracterización reológica exhaustiva. Gracias a la reología, se puede analizar el comportamiento de los fluidos, y los distintos parámetros obtenidos permiten clasificarlos, conocer sus propiedades y predecir sus aplicaciones. Así, un hidrogel específico, como el alginato, se considera tixotrópico [19-22], viscoelástico [23-25] y con adelgazamiento por cizallamiento [26-30].

Estas propiedades resultan muy interesantes para la bioimpresión. Un hidrogel imprimible ideal debería ser altamente tixotrópico, lo que significa que la viscosidad del hidrogel disminuye rápidamente cuando se aplica una fuerza de cizallamiento, pero se recupera rápidamente una vez eliminada la fuerza de cizallamiento. También es importante saber cómo se comporta la viscosidad cuando el hidrogel se seca antes de empezar a imprimir la siguiente capa [31].

El comportamiento viscoelástico favorecerá que el fluido mantener las propiedades de desplazamiento típicas de un fluido a la vez que tiene las propiedades estructurales de un sólido elástico. En De esta forma, será capaz de fluir cuando se aplique una deformación, lo que permitirá realizar el proceso de extrusión extrusión, recuperando además parte de la energía absorbida debido a las características del sólido elástico para formar una estructura 3D consistente.

Los fluidos pseudoplásticos se vuelven menos viscosos cuando se aplica una fuerza de deformación. cuando se aplica una fuerza deformadora. Esto implica que cuando el hidrogel se somete a presión en la bioimpresora, esta deformación del fluido, reduciendo su viscosidad y, por tanto, el fluido fluye más fácilmente por la boquilla de impresión.

Una vez que el fluido ha sido extruido, ya no está sometido a la fuerza de deformación y vuelve a su consistencia viscosa.

Los fluidos con esta propiedad de adelgazamiento por cizallamiento se rigen por el modelo matemático de la ley de potencia de Ostwald-de Waele de Ostwald-de Waele [32]. La ecuación representada en escala lineal o logarítmica se muestra en la Ecuación 1:

$$\tau = k \cdot (\gamma)^n \text{ or } \log(\tau) = \log(k) + n \cdot \log(\gamma) \quad (1)$$

Donde  $\tau$  y  $\gamma$  son el esfuerzo cortante y la velocidad de corte, respectivamente. Estas variables están, a su vez, relacionadas con la viscosidad del fluido, y  $k$  y  $n$  son los parámetros reológicos del modelo que representan la consistencia del flujo y los índices de comportamiento del flujo, respectivamente. El índice,  $n$ , sirve para clasificar los fluidos en función de su comportamiento, de forma que, si  $n$  es igual a la unidad, se dice que el fluido tiene un comportamiento newtoniano, y cuando es menor que la unidad, el fluido presentará propiedades de cizallamiento-adelgazamiento.

De lo anterior se deduce que las propiedades reológicas están directamente relacionadas con la calidad de la bioimpresión. Sin embargo, el tratamiento y la deducción matemática de la geometría de bioimpresión y las condiciones de aplicación para cada tipo de hidrogel constituyen un proceso largo y tedioso. Esto ha llevado a utilizar cada vez más los recursos que proporciona la simulación, con la que se pueden realizar cálculos complejos a gran velocidad, acortando los tiempos de cálculo y reduciendo o simplificando los ensayos rutinarios.

Las simulaciones por ordenador utilizan técnicas matemáticas que permiten imitar el comportamiento de prácticamente cualquier proceso. También permite estudiar el comportamiento de sistemas reales mediante la construcción de modelos que consiguen imitar el escenario deseado. En el presente estudio, utilizamos el paquete de software multifísico COMSOL. COMSOL. Esto permite definir el modelo en términos geometría, las restricciones y las condiciones físicas del fluido. del fluido. Aplica un mallado adaptativo que permite resolver el problema mediante el método de los elementos finitos.

En resumen, el propósito de este estudio era formar y caracterizar diferentes hidrogeles a base de alginato, determinar y catalogar sus parámetros de comportamiento reológico y finalmente simular procesos de bioimpresión bajo determinadas condiciones. Se pretendía analizar la posible existencia de relaciones entre los parámetros reológicos o comportamiento del hidrogel y los parámetros de los procesos de bioimpresión utilizados.

## 4.5.2 Materiales y métodos

### 4.5.2.1 Reconstitución del hidrogel

Se seleccionaron y utilizaron hidrogeles a base de alginato, porque son los hidrogeles más utilizados por la comunidad científica para la bioimpresión [12]. Se eligieron las proporciones de 3,5%, 4,0% y 5,0%, combinadas con 3,5% de  $\text{CaCl}_2$ , para estudiar la influencia de estas variaciones, ya que estas proporciones se utilizan habitualmente.

Los principales materiales para reconstituir el biomaterial fueron alginato liofilizado, un agente de reconstitución de tipo M (se preparó una solución tampón para que la solución final tuviera pH fisiológico, haciendo que la biotinta resultante fuera apta para cultivo celular) y el agente reticulante iónico  $\text{CaCl}_2$ , todos ellos de la marca Cellink®.

El protocolo seguido para conformar el hidrogel a base de alginato hidrogel con agente reticulante iónico  $\text{CaCl}_2$  comienza por preparando 2 ml del agente reconstituyente M. Esta solución se mezcló con 70 mg de  $\text{CaCl}_2$  para alcanzar una proporción de 3,5% p/v. Una vez mezclada, la solución se filtró en un tubo Falcon estéril de 15 ml utilizando una jeringa y un estéril de 0,22  $\mu\text{m}$ . A continuación, se mezclaron 2 ml de la solución filtrada con 100 mg de alginato liofilizado, previamente templado a temperatura ambiente, para obtener el hidrogel a base de alginato al 5% p/v. Esta mezcla se agitó con un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1 h o hasta la completa disolución del material liofilizado. completamente disuelto. Para obtener hidrogeles en otras proporciones, se modificaron las proporciones correspondientes y se mezclaron correspondientes.

Una vez formado el hidrogel, se midió el pH y se ajustó dentro del rango fisiológico de entre 7,0 y 7,4. El pH también es un factor importante para obtener la viscosidad adecuada del material. Los materiales resultantes se enumeran en la Tabla 3-12.

#### 4.5.2.2 Caracterización reológica

Las propiedades reológicas de los hidrogeles se determinaron con un reómetro rotacional (Discovery DHR 2, TA Instruments), utilizando una placa paralela de 40 mm con una separación de 550  $\mu\text{m}$ . Antes de la prueba, las muestras se dejaron en reposo durante 5 minutos para que alcanzaran el equilibrio mecánico y térmico.

Los experimentos de viscosidad de cizallamiento se llevaron a cabo con velocidades de cizallamiento entre 0,01 y 1000  $\text{s}^{-1}$ , a una temperatura de 37°C, para obtener la relación matemática entre el esfuerzo cizallamiento y la velocidad de cizallamiento y, por tanto, la viscosidad dinámica de los hidrogeles. de los hidrogeles.

#### 4.5.2.3 Modelado

Se utilizó COMSOL multiphysics para construir un modelo axisimétrico 2D axisimétrico en 2D junto con un nivel de flujo bifásico de flujo bifásico. Partimos del modelo real (Figura 3-32) que consiste en la unión de la jeringa que contiene el biomaterial, donde la bioimpresora ejerce presión, la boquilla (modelo 22G, Cellink®), y la zona de extrusión de aire en condiciones ambientales. La geometría se modeló trapezoides, rectángulos y elipses, teniendo en cuenta las diferentes subdivisiones de la zona de extrusión para obtener una malla adaptativa.

Tabla 4-12: Composition and pH of the hydrogels used.

Nomenclatura hidrogel	% alginato	% cloruro cálcico	pH
Alginato 3.5% (3.5% $\text{CaCl}_2$ )	3.5	3.5	7.23
Alginato 4.0% (3.5% $\text{CaCl}_2$ )	4.0	3.5	7.21
Alginato 5.0% (3.5% $\text{CaCl}_2$ )	5.0	3.5	7.19

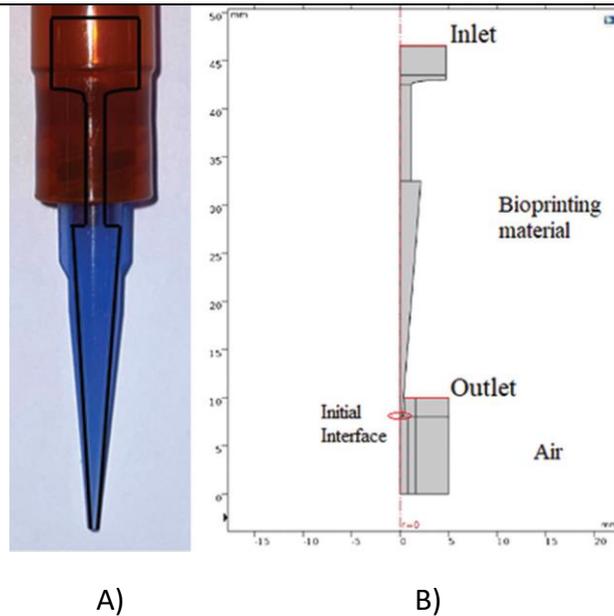


Figura 4-32: (A) Modelo real. (B) La representación multifísica COMSOL.

#### 4.5.2.4 Dominios y condiciones límite

El modelo considera dos ámbitos. El primero se refiere a la unión de la jeringa y la boquilla donde se encuentra el biomaterial, y el segundo al exterior de la boquilla en la zona de extrusión.

Los parámetros característicos de los materiales se configurados en los dominios seleccionados. En el de la jeringa y la boquilla, se especificaron las densidades y parámetros reológicos correspondientes, y en el segundo dominio, las condiciones del aire. Los parámetros reológicos se obtuvieron mediante ensayos de caracterización reológica y un ajuste a la ley de potencia newtoniana (Ecuación I), donde  $k$  y  $n$  son los parámetros reológicos del modelo, que representan los índices de consistencia y comportamiento del flujo, respectivamente.

Además, los bordes de las geometrías correspondientes a la entrada, la salida, las paredes y la interfaz inicial del sistema se definieron en las condiciones de contorno.

#### 4.5.2.5 Malla

Para las simulaciones del modelo se creó una malla 2D de tipo triangular, optando por un mallado adaptativo ya que este tipo permite obtener resultados de mayor resolución en la zona de extrusión del biomaterial y un mallado más grueso para las zonas, donde no se requieren resultados medibles o de precisión, reduciendo así reduciendo así la carga computacional de la simulación.

#### 4.5.2.6 Simulación

Se realizaron numerosas simulaciones para los diferentes materiales, variando la presión de entrada del sistema, que presión ejercida por la bioimpresora sobre el biomaterial. sobre el biomaterial. El intervalo de presiones utilizado fue de 400 kPa a 1200 kPa, reflejando resultados muy diferentes para los distintos biomateriales estudiados.

Estas simulaciones proporcionaron resultados tales como la fracción volumétrica de fluido en la extrusión. A bajas presiones se produce el desprendimiento de una gota, contrariamente al caso a altas presiones. Por esta razón, la presión de entrada correspondiente a alcanzar el límite de desprendimiento de la gota para cada biomaterial.

La velocidad de desplazamiento del cabezal dispensador es otra variable de la bioimpresora que debe controlarse, ya que cuanto más rápido sea el desplazamiento, más fina será la línea de impresión, y viceversa. Para ello, una vez definidas y ajustadas las presiones están definidas y ajustadas, el tiempo de extrusión con el que las muestras dan como resultado una geometría similar, es decir alcanzando un determinado espesor o nivel, se obtiene. De este modo determinar la rapidez o lentitud con que se extruye cada material, y esto puede relacionarse con la velocidad de desplazamiento del cabezal.

### 4.5.3 Resultados y discusión

Los hidrogeles a base de alginato se prepararon con  $\text{CaCl}_2$  con distintas concentraciones de alginato (Tabla 3-12). Las muestras eran de color amarillento claro y transparente. Se utilizaron numerosas muestras de hidrogeles. Se utilizaron numerosas muestras de hidrogeles y se realizaron pruebas preliminares variando la composición y las proporciones de  $\text{CaCl}_2$  y alginato. la composición y las proporciones de  $\text{CaCl}_2$  y alginato.

En algunos casos, los hidrogeles no mostraron diferencias significativas en su comportamiento reológico. en su comportamiento reológico. Por lo tanto, para beneficio de una mejor representatividad y claridad computacional, se muestran los resultados de los hidrogeles que ofrecieron relevantes.

#### 4.5.3.1 Caracterización reológica

Las curvas de flujo en estado estacionario mostraron que los hidrogeles a base de alginato a base de alginato dependían de la velocidad de cizallamiento y comportamiento de adelgazamiento característico de los fluidos con adelgazamiento por cizallamiento. Las tres curvas de viscosidad mostraron tendencias similares (Figura 3-34), pero la viscosidad aparente aumentó al aumentar la proporción de alginato.

A modo de ejemplo, la Figura 3-32 muestra un gráfico de la tensión de cizallamiento frente a la velocidad de cizallamiento para la muestra de alginato al 4%. Se observa que los hidrogeles muestran una evolución de cizallamiento marcadamente decreciente que se ajusta a una ley de potencia newtoniana. A partir del ajuste correspondiente, se pueden determinar los parámetros, es decir, el índice de consistencia,  $k$ , y el índice de comportamiento,  $n$ , que caracterizan el comportamiento de la viscosidad del fluido. Estos, junto con el dato correspondiente a la densidad de los hidrogeles, constituyen los valores representativos del comportamiento de los materiales utilizados en la simulación.

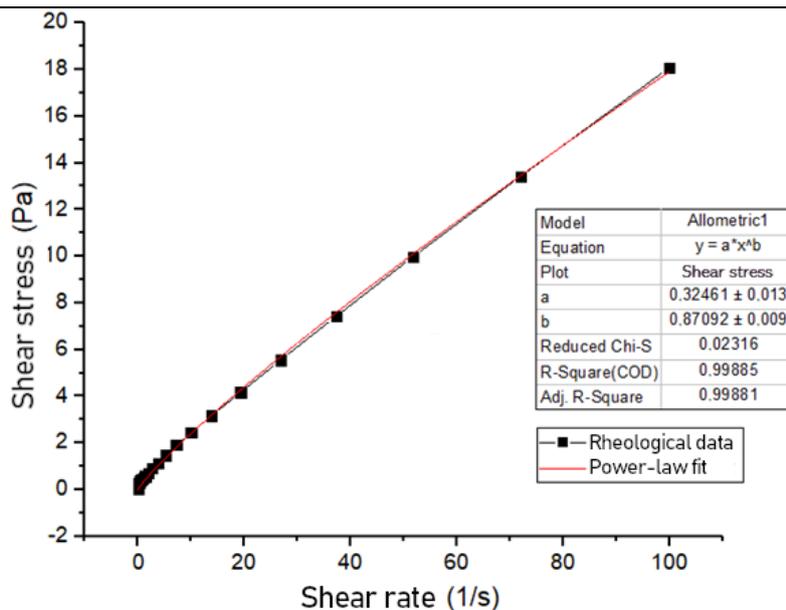


Figura 4-33: Respuesta del hidrogel de alginato al 4,0% (p/v) y CaCl<sub>2</sub> al 3,5% (p/v).

El índice de consistencia del flujo, k, aumentó y el índice de comportamiento del flujo, n, disminuyó con el aumento del porcentaje de alginato (Tabla 3-13). Así, cuanto menor es el porcentaje de alginato, más se aproxima el índice de comportamiento a la unidad, comportamiento típico de un fluido newtoniano. Esto es atribuible a las propiedades e influencia de la proporción de agua presente en las muestras. La densidad de los hidrogeles también aumentó ligeramente con el aumento del porcentaje de alginato.

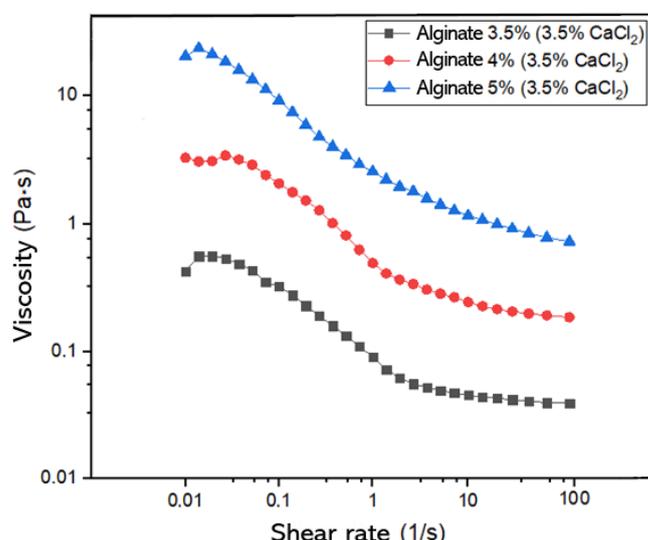


Figura 4-34: Viscosidad frente a la velocidad de cizallamiento de los hidrogeles a base de alginato al 3,5%, 4,0% y 5,0% (p/v), todos ellos con un 3,5% de CaCl<sub>2</sub>.

Tabla 4-13: Densidad del hidrogel y parámetros de la ley de potencia (ecuación 1).

Hydrogels	Density (kg/m <sup>3</sup> )	k	n
Alginate 3.5% (3.5% CaCl <sub>2</sub> )	1009.9	0.05321	0.92846
Alginate 4% (3.5% CaCl <sub>2</sub> )	1010.8	0.32461	0.87092
Alginate 5% (3.5% CaCl <sub>2</sub> )	1016.6	2.10303	0.75444

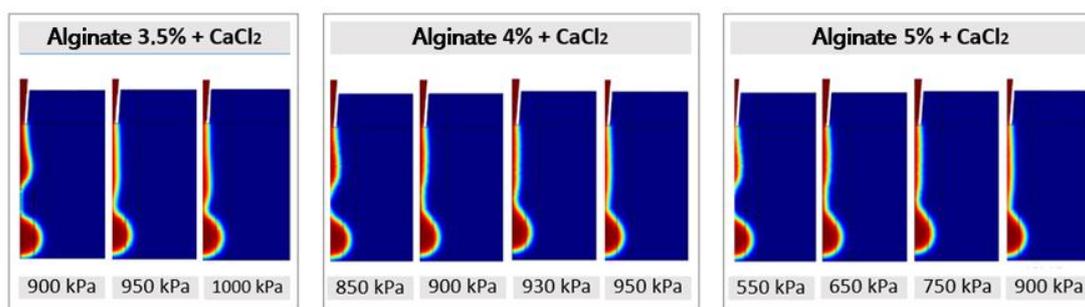
### 4.5.3.2 Simulación computacional

El objetivo era relacionar los datos reológicos que caracterizan a los hidrogeles con aquellos parámetros de simulación que tienen una posible relación con los programados en la bioimpresora. Para ello, fue necesario crear un modelo de la bioimpresora utilizando el paquete de software COMSOL Multiphysics, tal y como se ha descrito anteriormente.

En primer lugar, se estableció una malla adaptativa para lograr un equilibrio entre una buena resolución del modelo y una carga computacional aceptable, con el fin de diferenciar la fracción volumétrica del hidrogel de la del aire. El tiempo de simulación osciló entre 6 y 10 horas.

Se observó que para presiones bajas (en torno a 200 kPa) la muestra creaba una gota a la salida de la boquilla que acababa cayendo. Sin embargo, para presiones altas (alrededor de 5000 kPa), se creaba un flujo uniforme que terminaba depositándose en el lecho de bioimpresión simulado. Por lo tanto, para poder comparar las presiones a las que los hidrogeles mostraban este comportamiento, se buscó el límite de desprendimiento de las gotas.

Para poder comparar los resultados de la extrusión de los diferentes hidrogeles, fue necesario aplicar diferentes presiones a la entrada en el rango de 650-1000 kPa, y analizar las geometrías de los patrones de extrusión resultantes para que fueran similares entre sí. La figura 3-35 muestra los resultados más significativos de las muestras con diferentes porcentajes de alginato y  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 4-35: Fracción volumétrica en la zona de extrusión de la boquilla de los diferentes hidrogeles para diferentes presiones de entrada. El rojo oscuro representa el hidrogel y el azul oscuro la presencia de aire.**

Las observaciones y los datos muestran que el límite de desprendimiento de las gotas se produce a presiones más bajas cuanto mayor es el porcentaje de alginato en las muestras. En particular, la muestra con 5% de alginato más  $\text{CaCl}_2$  necesita menos presión que la de 4% más  $\text{CaCl}_2$  para alcanzar el límite de desprendimiento de las gotas. Además, se observa que las muestras con mayor porcentaje de alginato presentan un cambio en el comportamiento de extrusión menos sensible a la presión que las de menor porcentaje. En concreto, cuando la presión en la entrada aumenta en 50 kPa, la muestra con un 5% de alginato experimenta una menor variación en la geometría de extrusión que la mostrada por las muestras con un 4% y un 3,5% de alginato. Esto es coherente con el aumento de la viscosidad al aumentar el porcentaje de alginato.

Comparando las geometrías de extrusión de los diferentes hidrogeles en el límite de desprendimiento de las gotas que son más similares (Figura 35), se obtienen las presiones que sería necesario aplicar a cada biomaterial para conseguir el mismo flujo de bioimpresión.

Otra de las variables de la bioimpresora que hay que controlar es la velocidad de desplazamiento del cabezal: cuanto más rápida es la velocidad, más fina es la línea de impresión que se deposita.

Por esta razón, se determinó el tiempo de extrusión al que se alcanza la marca de 3 mm de altura (escala de ordenadas en la Figura 3-36 para muestras definidas con las presiones ajustadas de modo que dieran lugar a geometrías similares. A continuación, se averiguaría cuánto más rápido o lento se realiza la extrusión, lo que podría relacionarse con la velocidad de movimiento del cabezal.

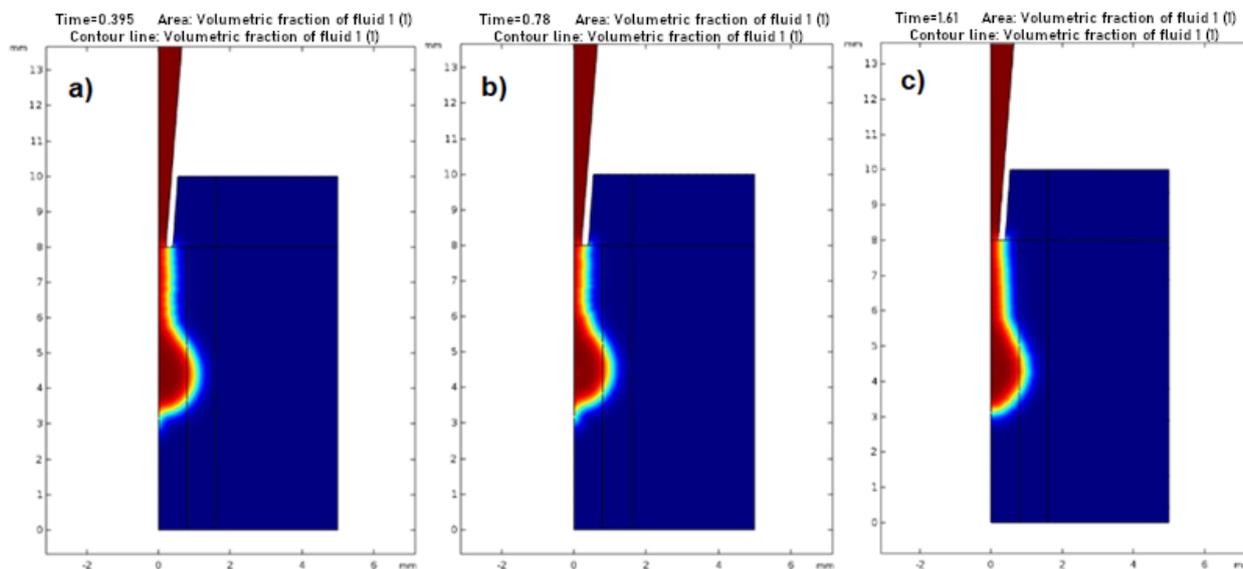


Figura 4-36: Tiempo de extrusión para alcanzar la marca de 3 mm en muestras de hidrogel con 3,5% de alginato con  $\text{CaCl}_2$  a una presión de entrada de 950 kPa (a), de hidrogel con 4% de alginato con  $\text{CaCl}_2$  a una presión de entrada de 930 kPa (b), y de hidrogel con 5% de alginato con  $\text{CaCl}_2$  a una presión de entrada de 750 kPa (c).

Los tiempos necesarios para pasar la marca se fijaron en 0,395 segundos para la muestra de alginato al 3,5%, 0,780 segundos para la muestra de alginato al 4% y 1,610 segundos para la muestra de alginato al 5%. En otras palabras, para conseguir el mismo grosor de línea en la muestra de alginato al 4%, es necesario aplicar 1,97 veces la velocidad definida para la muestra al 3,5%, y 4,07 veces para la muestra de alginato al 5%.

Los parámetros de presión y tiempo resultantes relacionados con la bioimpresión para los diferentes hidrogeles se enumeran en la Tabla 3-14.

Tabla 4-14: Parámetros relacionados con la bioimpresión de los hidrogeles.

Hydrogels	Pressure (kPa)	Time (s)
Alginate 3.5% (3.5% $\text{CaCl}_2$ )	950	0.395
Alginate 4% (3.5% $\text{CaCl}_2$ )	930	0.780
Alginate 5% (3.5% $\text{CaCl}_2$ )	750	1.610

### 4.5.3.3 Relación entre los parámetros reológicos y la bioimpresión

Una vez caracterizados y obtenidos los parámetros reológicos de los hidrogeles (Tabla 13) y hallados los valores relacionados con la bioimpresión para extrusión similar de los distintos biomateriales (Tabla 14), se buscó la posible existencia de una relación entre los mismos.

En primer lugar, se buscó una relación entre la presión aplicada por la bioimpresora a la entrada y el índice de comportamiento de flujo,  $n$ , presentado por las distintas muestras. La figura 37 muestra un ajuste rectilíneo de esta relación.

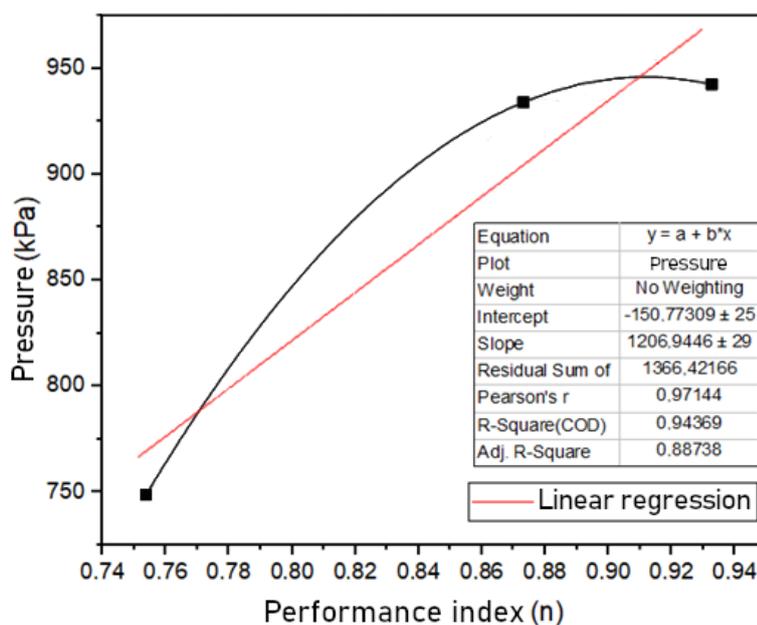
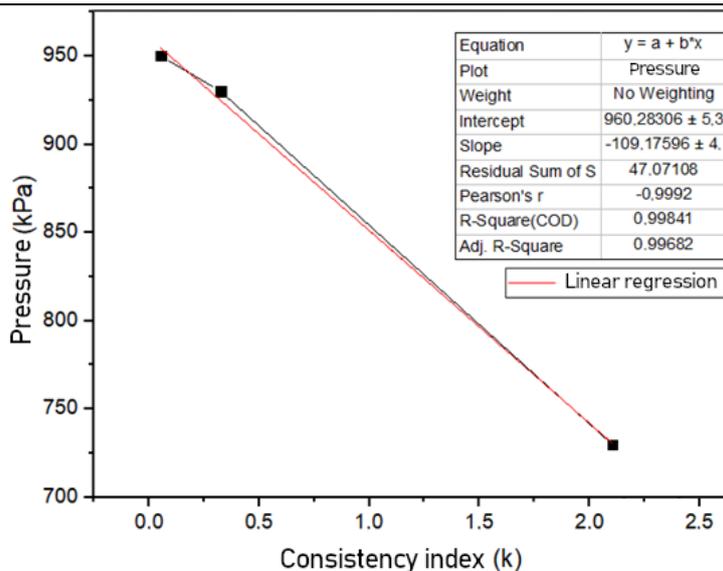


Figura 4-37: Relación entre la presión aplicada por la bioimpresora a la entrada del sistema y el índice de comportamiento al flujo,  $n$ , presentado por los biomateriales estudiados.

Como puede verse en la Figura 3-37, el ajuste lineal no es suficientemente aceptable para afirmar que existe una relación clara entre ambos parámetros. Del mismo modo, se buscó una relación entre esta presión y el segundo parámetro reológico obtenido, es decir, el índice de consistencia,  $k$  (véase la Figura 3-38).



**Figura 4-38: Relación entre la presión aplicada por la bioimpresora a la entrada del sistema y el índice de consistencia de flujo, k, presentado por los biomateriales estudiados.**

De acuerdo con la Figura 3-38, que muestra un buen ajuste lineal para dichos parámetros, se puede decir que el parámetro reológico del índice de consistencia, k, está directamente relacionado con la presión que la bioimpresora debe aplicar al biomaterial para su extrusión. De esta forma, con un solo ensayo reológico que utilice 0,620 ml de material es posible determinar la presión de entrada que permitirá una buena bioimpresión con cualquier biotinta. Actualmente, se suele aplicar una técnica de ensayo y error para encontrar dicha presión de entrada, lo que conlleva una gran cantidad de biomaterial desperdiciado. Aplicando la relación presentada anteriormente, se puede reducir la cantidad de material y el tiempo empleado.

El segundo parámetro que pretendemos relacionar es la velocidad de desplazamiento del cabezal dispensador que permite que la línea de material extruido tenga el espesor deseado. Esta variable está ligada al tiempo de extrusión reflejado en la Tabla 14, y se buscó la posible relación con los parámetros reológicos antes mencionados.

La Figura 3-39 representa el tiempo de extrusión frente al parámetro reológico índice de consistencia, k. No se aprecia una relación claramente concluyente.

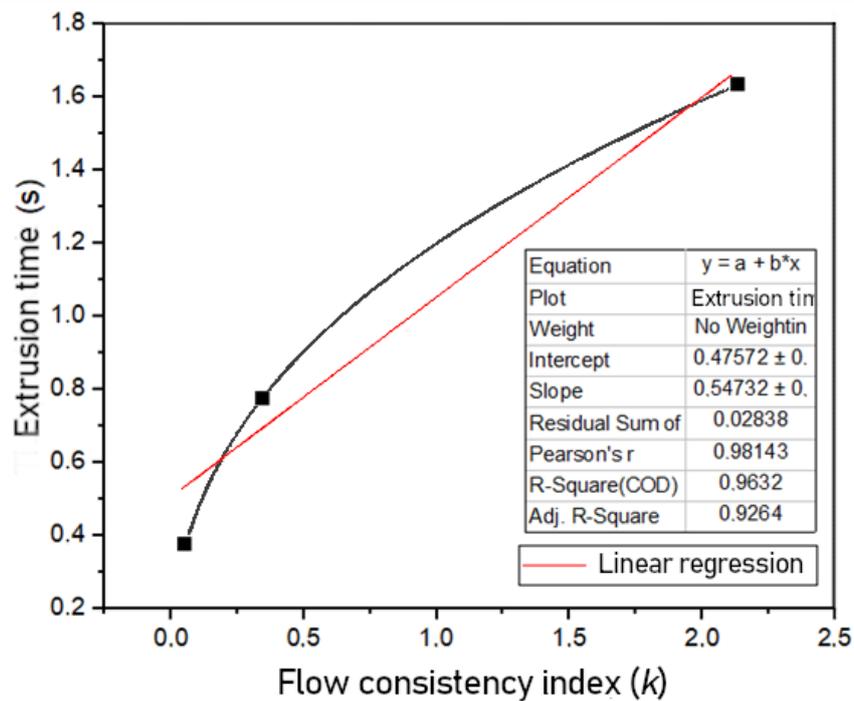


Figura 4-39: Relación entre el tiempo de extrusión del hidrogel y el índice de consistencia,  $k$ , presentado por los biomateriales estudiados.

Por último, se buscó la posible relación con el parámetro reológico índice de comportamiento,  $n$ . Como se puede observar en la Figura 3-40, existe una clara relación lineal entre el tiempo de extrusión (y por tanto la velocidad de desplazamiento del cabezal) con el índice de comportamiento,  $n$ . A través de esta relación, con un solo ensayo reológico es posible calcular la velocidad equivalente para diferentes biomateriales para conseguir el mismo grosor de línea en el proceso de bioimpresión.

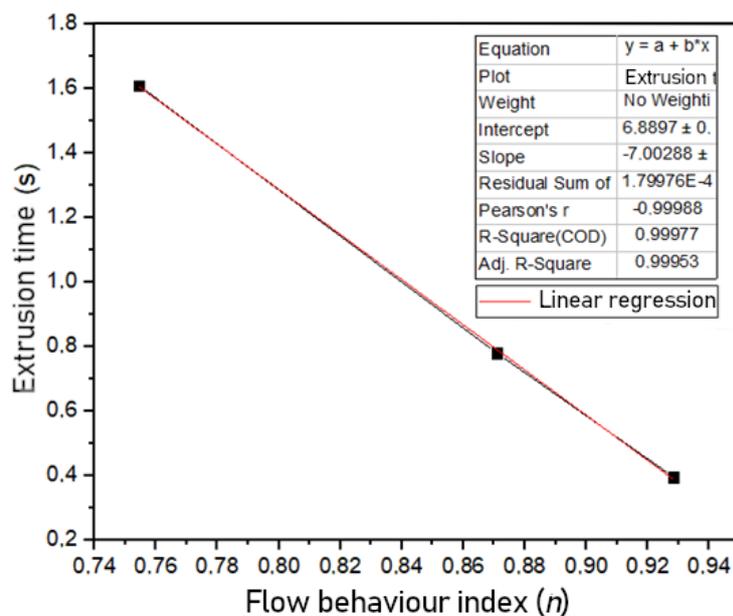


Figura 4-40: Relación entre el tiempo de extrusión del hidrogel y el índice de comportamiento,  $n$ , que presentan los biomateriales estudiados.

#### 4.5.4 Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, en el que se caracterizó reológicamente y se simuló el comportamiento de diferentes hidrogeles a base de alginato con 3,5% de  $\text{CaCl}_2$ , se extrajeron las siguientes conclusiones:

Los hidrogeles a base de alginato con agente reticulante, compuestos por 3,5%, 4,0% y 5,0% (p/v) de alginato y 3,5% (p/v) de  $\text{CaCl}_2$ , muestran un comportamiento típico de un fluido pseudoplástico no newtoniano. Además, la viscosidad y la densidad aumentan con el incremento de la proporción de alginato.

Estos hidrogeles presentan un índice de consistencia de flujo,  $k$ , que aumenta con la proporción de alginato, y un índice de comportamiento de flujo,  $n$ , que disminuye. Así, cuanto menor es la proporción de alginato, más se aproxima a la unidad el índice de comportamiento,  $n$ , es decir, más se corresponde con el comportamiento fluido newtoniano.

Una bioimpresión correcta requiere encontrar una presión de extrusión óptima. Por una parte, los hidrogeles extruidos a baja presión dan lugar a gotitas que se liberan posteriormente. Por otro lado, si la presión de extrusión es excesiva, la velocidad a la que sale el fluido es tan alta que produce salpicaduras al depositarse sobre la placa. Asimismo, los hidrogeles con menor proporción de alginato presentan una mayor sensibilidad a la presión aplicada en la entrada, por lo que, al aumentar la presión en rangos menores, presentan una mayor variación en el flujo de extrusión, a diferencia de lo que ocurre con las muestras de mayor porcentaje de alginato.

Los biomateriales con menores porcentajes de alginato necesitan mayores presiones de bioimpresión para conseguir un flujo uniforme. Con ello, los tiempos de extrusión, que están directamente relacionados con la velocidad de desplazamiento del cabezal necesaria para conseguir un determinado grosor de línea, son menores que los de los hidrogeles de mayor porcentaje de alginato.

Se ha comprobado que existe una clara relación lineal entre la presión que debe aplicarse al biomaterial a la entrada del sistema y el parámetro reológico índice de consistencia de flujo,  $k$ . Asimismo, también existe una relación lineal entre el tiempo de extrusión, relacionado a su vez con la velocidad de desplazamiento del cabezal dispensador, y el parámetro reológico índice de comportamiento de flujo,  $n$ . Esto permite reducir y simplificar los procesos actualmente repetitivos empleados para optimizar la presión de extrusión y la velocidad de desplazamiento del cabezal necesarias para conseguir los resultados de bioimpresión requeridos.

#### 4.5.5 Bibliografía

- [1] J. Fontrodona, F. Raül, and B. Díaz, “Estado actual y perspectivas de la impresión en 3D,” 2014. Accessed: May 10, 2021. [Online]. Available: [www.cege.es](http://www.cege.es)
- [2] J. Li, M. Chen, X. Fan, and H. Zhou, “Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 14, no. 1, p. 271, Sep. 2016, doi: 10.1186/s12967-016-1028-0.
- [3] N. Tasnim et al., “3D Bioprinting Stem Cell Derived Tissues,” *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 11, no. 4. Springer New York LLC, pp. 219–240, Aug. 01, 2018. doi: 10.1007/s12195-018-0530-2.
- [4] E. Hoch, G. E. M. Tovar, and K. Borchers, “Bioprinting of artificial blood vessels: Current approaches towards a demanding goal,” *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 46, no. 5. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, pp. 767–778, Nov. 01, 2014. doi: 10.1093/ejcts/ezu242.
- [5] S. Vijayavenkataraman, W. F. Lu, and J. Y. H. Fuh, “3D bioprinting of skin: A state-of-the-art review on modelling, materials, and processes,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 3. Institute of Physics Publishing, p. 032001, Sep. 07, 2016. doi: 10.1088/1758-5090/8/3/032001.
- [6] N. Cubo, M. Garcia, J. F. Del Cañizo, D. Velasco, and J. L. Jorcano, “3D bioprinting of functional human skin: Production and in vivo analysis,” *Biofabrication*, vol. 9, no. 1, p. 015006, Mar. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/9/1/015006.
- [7] M. Izadifar, D. Chapman, P. Babyn, X. Chen, and M. E. Kelly, “UV-Assisted 3D Bioprinting of Nanoreinforced Hybrid Cardiac Patch for Myocardial Tissue Engineering,” *Tissue Engineering - Part C: Methods*, vol. 24, no. 2, pp. 74–88, Feb. 2018, doi: 10.1089/ten.tec.2017.0346.
- [8] J. Xiongfa, Z. Hao, Z. Liming, and X. Jun, “Recent advances in 3D bioprinting for the regeneration of functional cartilage,” *Regenerative Medicine*, vol. 13, no. 1. Future Medicine Ltd., pp. 73–87, Jan. 01, 2018. doi: 10.2217/rme-2017-0106.
- [9] X. Wang et al., “3D bioprinting technologies for hard tissue and organ engineering,” *Materials*, vol. 9, no. 10. MDPI AG, p. 802, Sep. 27, 2016. doi: 10.3390/ma9100802.
- [10] N. Ashammakhi et al., “Advancing Frontiers in Bone Bioprinting,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8, no. 7. Wiley-VCH Verlag, p. 1801048, Apr. 11, 2019. doi: 10.1002/adhm.201801048.
- [11] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, and M. Xing, “3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances,” *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 2. KeAi Communications Co., pp. 144–156, Jun. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.
- [12] S. C. Pedroza-González, M. Rodríguez-Salvador, B. E. Pérez-Benítez, M. Moisés Alvarez, and G. T. de Santiago, “Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress,” *International Journal of Bioprinting*, vol. 7, no. 2, pp. 68–91, 2021, doi: 10.18063/IJB.V7I2.337.

- [13] M. Mobaraki, M. Ghaffari, A. Yazdanpanah, Y. Luo, and D. K. Mills, "Bioinks and bioprinting: A focused review," *Bioprinting*, vol. 18. Elsevier B.V., p. e00080, Jun. 01, 2020. doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00080.
- [14] N. Annabi et al., "25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine," *Advanced Materials*, vol. 26, no. 1. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 85–124, Jan. 08, 2014. doi: 10.1002/adma.201303233.
- [15] O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, R. Langer, and N. A. Peppas, "Bioinspired materials for controlling stem cell fate," *Accounts of Chemical Research*, vol. 43, no. 3, pp. 419–428, Mar. 2010, doi: 10.1021/ar900226q.
- [16] B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, and N. A. Peppas, "Hydrogels in regenerative medicine," *Advanced Materials*, vol. 21, no. 32–33. *Adv Mater*, pp. 3307–3329, Sep. 04, 2009. doi: 10.1002/adma.200802106.
- [17] Ý. A. Mørch, I. Donati, B. L. Strand, and G. Skjåk-Bræk, "Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 5, pp. 1471–1480, May 2006, doi: 10.1021/bm060010d.
- [18] F. E. Freeman and D. J. Kelly, "Tuning alginate bioink stiffness and composition for controlled growth factor delivery and to spatially direct MSC Fate within bioprinted tissues," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17286-1.
- [19] M. H. Kim, Y. W. Lee, W. K. Jung, J. Oh, and S. Y. Nam, "Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 98, pp. 187–194, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.06.014.
- [20] T. Gonzalez-Fernandez, A. J. Tenorio, K. T. Campbell, E. A. Silva, and J. K. Leach, "Alginate-Based Bioinks for 3D Bioprinting and Fabrication of Anatomically Accurate Bone Grafts," *Tissue Engineering Part A*, Feb. 2021, doi: 10.1089/ten.tea.2020.0305.
- [21] H. Li, Y. J. Tan, R. Kiran, S. B. Tor, and K. Zhou, "Submerged and non-submerged 3D bioprinting approaches for the fabrication of complex structures with the hydrogel pair GelMA and alginate/methylcellulose," *Additive Manufacturing*, vol. 37, p. 101640, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.addma.2020.101640.
- [22] H. Li, Y. J. Tan, K. F. Leong, and L. Li, "3D Bioprinting of Highly Thixotropic Alginate/Methylcellulose Hydrogel with Strong Interface Bonding," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, no. 23, pp. 20086–20097, Jun. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b04216.
- [23] A. A. Aldana, F. Valente, R. Dilley, and B. Doyle, "Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties," *Bioprinting*, vol. 21, p. e00105, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00105.
- [24] C. Antich et al., "Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs," *Acta Biomaterialia*, vol. 106, pp. 114–123, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.046.

- [25] J. Adhikari, M. S. Perwez, A. Das, and P. Saha, "Development of hydroxyapatite reinforced alginate–chitosan based printable biomaterial-ink," *Nano-Structures and Nano-Objects*, vol. 25, p. 100630, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.nanoso.2020.100630.
- [26] S. M. R. Mousavi, A. Rafe, and S. Yeganehzad, "Structure-rheology relationships of composite gels: Alginate and Basil seed gum/guar gum," *Carbohydrate Polymers*, vol. 232, p. 115809, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115809.
- [27] H. Karimi, "Numerical analysis of mix convection of sodium alginate non-Newtonian fluid with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticle in a channel with block," *Journal Of Applied and Computational Sciences in Mechanics*, vol. 0, May 2021, doi: 10.22067/JACSM.2021.40042.
- [28] L. Silva Batalha et al., "Encapsulation in alginate-polymers improves stability and allows controlled release of the UFV-AREG1 bacteriophage," *Food Research International*, vol. 139, p. 109947, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109947.
- [29] S. Sugiono, M. Masruri, T. Estiasih, and S. B. Widjarnako, "Structural and Rheological Characteristics of Alginate from *Sargassum cristaefolium* Extracted by Twin Screw Extruder," *Journal of Aquatic Food Product Technology*, vol. 28, no. 9, pp. 944–959, Oct. 2019, doi: 10.1080/10498850.2019.1665603.
- [30] S. Sugiono, M. Masruri, T. Estiasih, and S. B. Widjanarko, "Optimization of extrusion-assisted extraction parameters and characterization of alginate from brown algae (*Sargassum cristaefolium*)," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 56, no. 8, pp. 3687–3696, Aug. 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03829-z.
- [31] H. Li, S. Liu, and L. Li, "Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide," *International Journal of Bioprinting*, vol. 2, no. 2, pp. 54–66, Jun. 2016, doi: 10.18063/IJB.2016.02.007.
- [32] M. Yürüsoy and M. Pakdemirli, "Group classification of a non-Newtonian fluid model using classical approach and equivalence transformations," *International Journal of Non-Linear Mechanics*, vol. 34, no. 2, pp. 341–346, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0020-7462(98)00037-7.

## **4.6 Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D (U202300008)**

### **4.6.1 Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención se engloba en el campo de la bioingeniería y la salud, para la caracterización de los materiales utilizados en la bioimpresión de estructuras biomiméticas. Más concretamente, se describe un dispositivo capaz de caracterizar los materiales usados en la bioimpresión 3D, bajo unas condiciones controladas de temperatura, presión, humedad y CO<sub>2</sub>, generando un informe sobre las propiedades a tener en cuenta para generar estructuras bioimpresas.

De esta forma, además de caracterizar propiedades mecánicas del hidrogel en un entorno estéril adecuado para la posterior incorporación de células, informa de las condiciones óptimas de presión y temperatura aplicadas a dicho hidrogel para que la extrusión sea correcta.

### **4.6.2 Problema técnico a resolver y antecedentes de la invención**

La bioimpresión 3D es un proceso de fabricación de tejidos funcionales y órganos a partir de biomateriales, por medio de un software computarizado que genera un modelo 3D. El proceso consiste en la adición de capas sucesivas de biomaterial, con la dificultad añadida de que, al tratarse de material vivo, debe realizarse en unas condiciones que aseguren la supervivencia y proliferación de las células. Es por ello que los materiales utilizados deben tener un equilibrio entre imprimibilidad (o fidelidad de forma) y biocompatibilidad, de manera que la estructura generada posea suficiente estabilidad estructural a la vez que garantiza una alta viabilidad celular.

Debido a estos condicionantes y a que los biomateriales comerciales usados en la bioimpresión 3D tienen un alto coste, se hace necesario llevar a cabo una correcta caracterización de los mismos que permita, en primer lugar, analizar la utilidad del biomaterial para los objetivos, y, en segundo lugar, asegurar mediante la aplicación de unas condiciones de contorno bien definidas una correcta bioimpresión 3D de la estructura previamente diseñada.

La elección de los biomateriales usados en bioimpresión 3D es compleja debido a que deben poseer propiedades muy específicas. Normalmente suelen usarse hidrogeles, polímeros hidrófilos y reticulados, que pueden absorber e hincharse en agua y biofluidos, y transformarse en redes tridimensionales insolubles que les confieren propiedades elásticas cuando se someten a diferentes tensiones durante la bioimpresión. Pueden estar compuestos de materiales naturales, sintéticos o híbridos. Además, deben asegurar una correcta viabilidad celular e integridad estructural cuando se ven sometidos a condiciones de contorno específicas.

Antes de iniciar el proceso de bioimpresión 3D de estructuras, lo cual supone un gasto elevado de recursos, se deben realizar ciertos ensayos para determinar la estabilidad de los hidrogeles. Lo más comunes son los estudios de reometría y viscosidad y los ensayos de viabilidad celular.

El principal problema radica en que esos ensayos requieren de un equipamiento muy caro que consume gran cantidad del material a estudiar.

Actualmente los dispositivos más empleados para analizar la idoneidad de los hidrogeles son los reómetros.

Los reómetros son instrumentos de medición muy precisos que pueden determinar y analizar el comportamiento de diferentes materiales en procesos de deformación y flujo. Con el conocimiento de estos datos, sería posible determinar qué hidrogel tiene las mejores características de imprimibilidad para las condiciones de impresión que se van a utilizar de forma muy específica. La desventaja de utilizar equipos de medición como reómetros o viscosímetros es su elevado precio, que puede estar fuera del alcance de muchos equipos de investigación que deseen determinar la imprimibilidad de los hidrogeles a estudiar, así como la necesidad de gastar grandes cantidades de hidrogel, normalmente a un coste elevado, para llevar a cabo su estudio. Además, los reómetros no aseguran una correcta reproducibilidad de resultados, debido a que analizan el material objeto de estudio sin salvaguardar las condiciones de contorno a la que debe ser sometido el hidrogel cuando se le introduzcan células en su interior.

Por otro lado, las bioimpresoras son dispositivos que permiten imprimir los hidrogeles, pero no analizar la imprimibilidad ni la capacidad estructural de los biomateriales comúnmente utilizados para la bioimpresión.

Es por ello que actualmente no existe una normativa de caracterización en la bioimpresión 3D, por lo que se requiere de un dispositivo capaz de analizar los biomateriales usados en bioimpresión, con el objetivo de obtener valores de imprimibilidad y capacidad estructural, asegurando las condiciones de esterilidad para las pruebas de viabilidad celular y salvaguardando las condiciones de contorno óptimas para el proceso de bioimpresión, para poder analizar su potencial de uso en la bioimpresión de tejidos biomiméticos. Se hace también necesario que todo el proceso de caracterización se realice con una baja cantidad de material gastado para conseguir una optimización del uso de recursos, y que los resultados del proceso de caracterización sean reproducibles y normalizables, asegurando que esos mismos resultados puedan ser reproducidos para el mismo material con independencia del lugar de realización del ensayo.

En la bibliografía se encuentran artículos que explican el uso de determinadas invenciones aplicadas al análisis de biomateriales, pero no realizan estudios específicos para bioimpresión ni controlan las condiciones de contorno que generan cambios significativos en los hidrogeles.

Algunos dispositivos, como el descrito en el documento ES 2 603 603 B1, están basados en la medición de las propiedades viscoelásticas de los materiales analizados, sin el control de las condiciones de contorno, siendo necesarios para el análisis de la bioimpresión otros análisis como el de imprimibilidad en ambientes controlados.

Así mismo, el documento ES 2 928 610 A1 describe un dispositivo utilizado para la bioimpresión de hidrogeles con cámara estéril, pero que no analiza las propiedades de dichos hidrogeles ni controla las condiciones ambientales.

No se conoce pues, en el mercado y el estado de la técnica, ningún instrumento o dispositivo que resuelva el problema planteado de una forma completamente satisfactoria.

### 4.6.3 Descripción de la invención

La invención propuesta se refiere a un dispositivo especialmente diseñado para analizar y testear los materiales utilizados para la bioimpresión 3D de estructuras biomiméticas en condiciones controladas de humedad, temperatura, CO<sub>2</sub> y esterilidad. Las mayores ventajas asociadas son la polivalencia de su utilización, la optimización del material utilizado y la reproductibilidad de los resultados al realizar todas las pruebas en condiciones controladas.

La presente invención supone una solución integral para la caracterización estandarizada de los materiales utilizados para bioimpresión 3D, optimizando la cantidad de material utilizado. El resto de los dispositivos no ofrecen una caracterización estandarizada y reproducible de la imprimibilidad y de las propiedades mecánicas. Por otra parte, el resto de los dispositivos no está optimizado para el estudio de los materiales de bioimpresión 3D, por lo que necesitan la combinación de varias tecnologías y un elevado gasto de material, además de no controlar las condiciones de contorno que afectan a los hidrogeles durante la duración de las pruebas, no siendo del todo estandarizable los resultados que ofrecen.

Con el dispositivo de la invención se eliminan todas las problemáticas mencionadas anteriormente, y se facilita la monitorización de los resultados obtenidos mediante la conexión del equipo a un ordenador o de forma remota a una página web.

Para resolver los problemas de los sistemas actualmente conocidos, la presente invención propone una máquina de ensayo conformada por una cámara que mantiene las condiciones de esterilidad y ambientales requeridas. Además, dispone de una estructura fija que contiene la electrónica de la invención, dos soportes móviles y un extrusor.

Este equipo comprende un sistema de filtrado de aire; una luz ultravioleta; unos medios de generación y medición de condiciones ambientales; unos medios de visualización y transmisión remota de los parámetros recogidos; una cámara; una electrónica de control; dos plataformas móviles; y un extrusor.

En esta memoria se propone igualmente un método de medición de los parámetros para caracterizar los hidrogeles mediante un equipo como el definido, que comprende una primera fase que comienza con la colocación de un portamuestras en la cámara, del hidrogel en el extrusor (siempre que éste no sea sensible a la luz ultravioleta) y del cierre de la cámara que permite la activación del proceso de análisis.

A continuación, una segunda fase continúa con el encendido de los ventiladores con los filtros HEPA de aire y de la luz ultravioleta para conseguir la esterilización dentro de la cámara.

Seguidamente se realiza una tercera fase consistente en la activación de las resistencias térmicas, el humidificador y el generador de ozono para conseguir las condiciones ambientales deseadas.

La cuarta fase consiste en dar comienzo al primer test o estudio del flujo que realiza el dispositivo. Para ello el extrusor comienza a aumentar gradualmente la presión aplicada sobre la jeringuilla que contiene el hidrogel con el objetivo de visualizar mediante una cámara el flujo que presenta dicho hidrogel. De esta forma, siempre y cuando la fluidez del hidrogel sea la correcta, el dispositivo registra las condiciones ambientales a las que estaba sometido el hidrogel y la presión aplicada

cuando se consiguió la fluidez buscada. El dispositivo podrá repetir el proceso a diferentes temperaturas, registrando todos los parámetros recogidos.

La quinta fase consiste en abrir la cámara siguiendo los protocolos de esterilidad conocidos y sustituir el portamuestras por otro portamuestras (llamado en esta memoria como portamuestras 1). Posteriormente se da paso al comienzo del test 2 o estudio de la imprimibilidad, y a la aplicación de las condiciones de contorno y presión sobre la jeringuilla. En este punto el dispositivo, tras generar y controlar la temperatura, humedad, CO<sub>2</sub> y presiones aplicadas, comienza a realizar la impresión de una estructura en forma de rejillas de diferentes dimensiones, mediante el control del movimiento de las plataformas móviles en todos los ejes y de la presión que aplica el extrusor sobre la jeringuilla. Este test permite analizar la capacidad del hidrogel para reproducir geometrías previamente configuradas, mediante la medición y comparación cuantitativa de las áreas teóricas y las áreas reales de los polígonos generados en el interior de la rejilla. Los resultados de esta prueba quedan grabados y fotografiados por la cámara integrada en la plataforma superior móvil.

La sexta fase consiste nuevamente en abrir la cámara y sustituir el portamuestras 2 por un tercer portamuestras (portamuestras 3). El dispositivo, tras el cierre de la cámara, vuelve a aplicar las condiciones de contorno marcadas, y tras ello comienza el test 3 o estudio de colapso. Consiste en imprimir una única línea de hidrogel sobre el portamuestras 3, conformado por una estructura con pilares a diferentes distancias. De esta forma, mediante el fotografiado final de la prueba, se visualiza la capacidad del hidrogel para generar puentes y no colapsar.

Por último, y tras terminar las pruebas, el dispositivo informa de los datos recogidos.

Con la máquina de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D y el método de análisis que aquí se propone se obtiene una mejora significativa del estado de la técnica.

Esto es así, pues se consigue un modo de calcular la capacidad de un hidrogel o biomaterial para ser válido para la bioimpresión, e incluso discernir qué aplicaciones podría llevar a cabo y cuáles son las condiciones de contorno a aplicar para obtener los mejores resultados.

Se logra un equipo eficaz, con el que es posible la obtención de una caracterización y estandarización de los resultados de imprimibilidad de los materiales utilizados en la bioimpresión 3D.

Este equipo logra corregir los defectos existentes en el estado de la técnica encontrados, y facilita la correcta caracterización de los biomateriales mediante la ejecución de una serie de pruebas controladas y monitorizadas.

#### **4.6.4 Breve descripción de las figuras**

Con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se aporta como parte integrante de dicha descripción una serie de dibujos donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La Figura 1.- Muestra una primera vista en perspectiva del dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D que se compone de una cámara que envuelve, aísla y protege al dispositivo completo, una estructura fija que contiene la electrónica de la invención, los generadores de

humedad y CO<sub>2</sub> y la parte donde se acoplan los dos soportes móviles que permiten, junto con el extrusor, la impresión de los hidrogeles, para una realización preferente de la invención.

La Figura 2.- Muestra una segunda vista en perspectiva del dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D con la cámara abierta y uno de los portamuestras que utiliza el dispositivo colocado, para una realización preferente de la invención.

La Figura 3.- Muestra una tercera vista en perspectiva del dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D donde se muestra la cámara cerrada y la parte trasera e inferior del dispositivo, para una realización preferente de la invención.

La Figura 4A y la Figura 4B muestran una vista de los dos portamuestras que utiliza el dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D, para una realización preferente de la invención.

A continuación, se proporciona una lista numerada de los distintos elementos representados en las figuras que integran la invención:

1. Estructura fija
  - 1.1. Sensores de Temperatura, humedad y CO<sub>2</sub>
  - 1.2. Ventiladores con filtro HEPA
  - 1.3. Luces ultravioletas UVC
  - 1.4. Salida de generación de humedad
  - 1.5. Salida de generación de CO<sub>2</sub>
  - 1.6. Estructura giratoria
  - 1.7. Cámara multifunción de la estructura fija
  - 1.8. Resistencia generadora de calor
  - 1.9. Célula refrigeradora
  - 1.10. Pantalla de control
  - 1.11. Sensores de posición
  - 1.12. Bus de comunicaciones
  - 1.13. Toma de corriente
2. Cámara
  - 2.1. Apertura de la cámara
3. Soporte móvil superior
  - 3.1. Cámara
  - 3.2. Rieles

- 
4. Extrusor
    - 4.1. Soporte de movimiento eje x del extrusor
    - 4.2. Accionador de presión del extrusor
    - 4.3. Depósito del extrusor
    - 4.4. Tapón del extrusor
  5. Soporte móvil inferior
    - 5.1. Apertura del soporte móvil inferior
  6. Portamuestras de colapso
    - 6.1. Pilares del test de colapso
  7. Portamuestras de imprimibilidad

#### **4.6.5 Descripción detallada**

La presente invención no debe verse limitada a la forma de realización y materiales aquí descritos. Otras configuraciones pueden ser realizadas por los expertos en la materia a la vista de la presente descripción. En consecuencia, el ámbito de la invención queda definido por las siguientes descripciones.

En la figura 1 se ha representado una vista del dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D que aquí se propone, con todos los elementos colocados y bien posicionados para realizar la prueba de imprimibilidad que comprende una estructura fija (1) adecuada para el acoplamiento de una cámara (2), que puede ser giratoria o con tapa, un soporte móvil inferior (5) y un soporte móvil superior (3) que conecta con un extrusor (4).

La estructura fija (1) comprende varios sensores de temperatura, humedad y CO<sub>2</sub> (1.1) para el control de las condiciones de contorno de la cámara, unos ventiladores con filtro HEPA (1.2) y luces ultravioletas (1.3) para generar, en primer lugar, un flujo positivo de aire filtrado, y en segundo lugar, condiciones de esterilidad. Además, dispone de una cámara multifunción de la cámara fija (1.7) que contiene los dispositivos de generación de humedad y CO<sub>2</sub> y unos controladores integrados que permiten monitorizar, controlar y guardar los resultados de las pruebas. De esta forma la estructura fija (1) genera las condiciones ambientales que el usuario requiera mediante la combinación de lo anteriormente expuesto y el uso de la salida de generación de humedad (1.4), la salida de generación de CO<sub>2</sub> (1.5), la resistencia generadora de calor (1.8) y la célula refrigeradora (1.9).

La estructura fija (1) permite la alimentación eléctrica del dispositivo mediante la toma de corriente (1.13) que conecta el dispositivo a la red eléctrica o mediante el bus de comunicaciones (1.12) que conecta el dispositivo a un ordenador o a baterías.

La cámara (2) envuelve el dispositivo completo y salvaguarda las condiciones ambientales y de esterilidad que la estructura fija (1) ha generado. Para ello, presenta una apertura de la cámara (2.1) que coincide en dimensiones con la parte trasera de la cámara multifunción de la cámara fija (1.7), quedando de esta forma un aislamiento casi completo. Así, el aire entra filtrado dentro de la cámara

(2) y es expulsado continuamente al exterior, generando un flujo de aire que impide la entrada de aire contaminado en el interior.

El soporte móvil superior (3) sujetado a la estructura fija (1) se mueve de forma controlada en el eje Y de la cámara mediante motores en el interior de la estructura fija (1), y dispone de una cámara (3.1) que permite la grabación y toma de resultados.

El extrusor (4), sostenido al soporte móvil superior (3), se mueve de forma controlada en el eje X de la cámara, y comprende un soporte de movimiento eje X del extrusor (4.1) que permite el movimiento del extrusor (4). Además, dispone de un accionador de presión del extrusor (4.2) que consigue aplicar una presión controlada a la jeringuilla introducida en el depósito del extrusor (4.3) e inmovilizarla en dicho depósito mediante el tapón del extrusor (4.4), que puede estar roscado o a presión. De esta forma, al aplicar la presión necesaria, el contenido de la jeringuilla comenzará a salir, produciéndose la impresión del material.

Por último, el soporte móvil inferior (5), que se mueve de forma controlada sobre el eje Z de la cámara mediante un motor en el interior de la estructura fija, presenta una apertura del soporte móvil inferior (5.1) que habilita la introducción del portamuestras de colapso (6) o del portamuestras de imprimibilidad (7).

En la figura 2 se muestra una vista del dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D que aquí se propone, donde apertura de la cámara (2.1) se encuentra abierta y el portamuestras de colapso (6) está colocado sobre la base del soporte móvil inferior (5).

Además, se visualizan la salida de generación de CO<sub>2</sub> (1.5) y la célula refrigeradora (1.9), que al igual que el resto de los elementos que componen el dispositivo se encuentran desactivadas hasta que la electrónica contenida en el interior de la cámara multifunción de la estructura fija (1.7) detecte, mediante los sensores de posición (1.11), que la apertura de la cámara (2.1) se encuentra fuera del alcance de dichos sensores de posición (1.11).

En la figura 3 se muestra una vista del dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D que aquí se propone, donde se pueden observar las partes inferior y trasera del dispositivo, mostrando de esta forma la entrada de aire de los ventiladores con filtro HEPA (1.2) y la estructura giratoria (1.6) que permite la conexión entre la estructura fija (1) y la cámara (2), posibilitando de esta forma el movimiento giratorio de la cámara (2).

Además, se visualiza la pantalla de control (1.10) que conecta con la electrónica integrada en la cámara multifunción de la estructura fija (1.7), y faculta al usuario el control de las pruebas y la visualización de los resultados tanto de forma remota al enviar los resultados a una página web, como mediante la conexión con un PC por el bus de comunicaciones (1.12) al finalizar las pruebas. Por otro lado, se observan los sensores de posición (1.11), que controlan que la apertura de la cámara (2.1) se encuentre en la posición correcta antes de comenzar las pruebas.

Por último, se distinguen los rieles (3.2) que facilitan el movimiento controlado del extrusor (4) sobre el soporte móvil superior (3), el depósito del extrusor (4.3) y el tapón del extrusor (4.4), que aseguran el buen agarre de las jeringuillas en el dispositivo de la invención.

En la figura 4 se muestra el portamuestras de colapso (6), que utiliza el dispositivo para analizar la deflexión de los filamentos de hidrogel a su paso por los pilares del test de colapso (6.1) espaciados

a diferentes distancias. Estas distancias irán de más cortas a más largas, siendo más probable que la deflexión se produzca a distancias más largas. El dispositivo de la invención deposita el material a estudiar sobre los pilares de la plataforma, de forma que pase primero por los pilares menos espaciados y termine en los pilares más espaciados.

En la figura 5 se muestra el portamuestras de imprimibilidad (7) tras haber realizado la prueba de imprimibilidad. De esta forma este portamuestras, junto con el dispositivo de la invención, permiten realizar una prueba que determina la capacidad de un hidrogel para reproducir un patrón dado y su tendencia a generar acumulaciones. Se puede utilizar para comprobar si los hidrogeles objeto de estudio tienen propiedades mecánicas suficientes para generar una cuadrícula o patrón de cuadrados y rectángulos de diferentes dimensiones. Además, permite conocer si un hidrogel o biomaterial presenta un buen estado de gelificación y, por tanto, si tiene una superficie lisa y una anchura constante en las tres dimensiones, facilitando la bioimpresión de matrices regulares con orificios cuadrados.

Así pues, el equipo de ensayo de la invención está formado por elementos de diferentes tamaños (diferentes tallas) y diferentes formas según las preferencias y necesidades del usuario.

Preferentemente, la estructura fija (1) es un elemento rígido y la cámara (2) puede ser rígida o flexible. El soporte móvil superior (3), el extrusor (4), el soporte móvil inferior (5), el portamuestras de colapso (6) y el portamuestras de imprimibilidad (7) son elementos que pueden variar su forma y tamaño según las necesidades.

El uso del dispositivo de la invención está dirigido principalmente a laboratorios y centros tecnológicos del sector de la biología, biotecnología, ingeniería de materiales, ingeniería mecánica, empresas que se dediquen a la fabricación aditiva, a la medicina regenerativa o la ingeniería tisular, entre otros sectores. Por lo tanto, el dispositivo permite ser utilizado tanto por empresas privadas como centros tecnológicos públicos o universidades que requieran de la realización de pruebas de caracterización de materiales o biomateriales.

Una de las ventajas asociadas a la invención es que, como permite asegurar unas condiciones de contorno durante y después del ensayo, se consigue obtener resultados reproducibles en cada una de las pruebas con independencia del lugar donde está instalado el dispositivo, por lo que los resultados podrían llegar a ser estandarizables y normalizados. Además, debido a que el dispositivo está especialmente diseñado para la realización de análisis de biomateriales comúnmente usados en la bioimpresión 3D, se consigue optimizar la cantidad de material utilizado y reducir costes en su fabricación, consiguiendo un dispositivo de bajo coste en comparación con las máquinas de ensayos de materiales que existen actualmente.

En conclusión, este dispositivo permitiría realizar una caracterización normalizada y centrada en la bioimpresión 3D, donde los resultados se podrán visualizar de dos formas:

- Visualización remota mediante un módulo de conexión wifi conectado a un router móvil dentro de la cámara multifunción de la estructura fija (1.7) y un soporte web.
- Visualización en PC mediante la conexión del dispositivo que aquí se presenta con un ordenador mediante un bus de comunicaciones (1.12).

En una realización posible el equipo que aquí se describe está formado por una estructura fija (1) fabricada de un material rígido e inoxidable que encapsula herméticamente toda la electrónica de control y monitorización, un soporte móvil superior (3) y un soporte móvil inferior (5), fabricados con resina o termoplásticos rígidos mediante técnicas de fabricación aditiva, que permiten la limpieza mediante productos químicos desinfectantes.

El extrusor (4) conectado al soporte móvil superior (3), el depósito del extrusor (7.1) y el tapón del extrusor (7.2) son elementos rígidos que están fabricados con resinas o termoplásticos con alto punto de fusión que permiten su limpieza con productos químicos desinfectantes. Además, el depósito del extrusor (7.1) y el tapón del extrusor (7.2) son elementos con rosca.

La cámara (2) está fabricada de un material plástico transparente capaz de proteger de los rayos UVC para la correcta visualización del proceso, y se encuentra anexa a la estructura giratoria (1.6), lo que permite su movimiento sobre el eje vertical de la cámara (2).

El portamuestras de colapso (6) y el portamuestras de imprimibilidad (7) están fabricados de resina o plástico bioinerte que no absorba al material bioimpreso ni afecte a sus propiedades.

En otro ejemplo de realización, el equipo que así se describe está formado por una estructura fija (1), un soporte móvil superior (3), un extrusor (4) y un soporte móvil inferior (5) fabricados de un acero inoxidable. La cámara (2) está fabricada de vidrio con filtro UVC y los portamuestras, denominados portamuestras de colapso (6) y portamuestras de imprimibilidad (7), están fabricados de vidrio.

En otro ejemplo de realización, el portamuestras de colapso (6) y el portamuestras de imprimibilidad (7) están fabricados de plástico bioinerte.

#### 4.6.6 Reivindicaciones

1. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D que contiene una estructura fija (1) adecuada para el acoplamiento de una cámara (2), y que permiten comprender:
  - Un soporte móvil superior (3);
  - Un extrusor (4);
  - Un soporte móvil inferior (5);
  - Un portamuestras de colapso (6) y un portamuestras de imprimibilidad (7);

Donde la estructura fija (1) presenta:

- Sensores de temperatura, humedad y CO<sub>2</sub> (1.1) que monitorizan las condiciones ambientales en el interior de la cámara (2), además de registrar y enviar los datos a un soporte web.
- Ventiladores con filtro HEPA acoplados o adheridos (1.2);
- Luces ultravioletas UVC (1.3) a ambos lados del cuerpo de la estructura fija (1);
- Una cámara multifunción de la estructura fija (1.7) que protege a la electrónica de control y monitorización además de contener un generador de humedad y CO<sub>2</sub> que expulsan, a través

---

de la salida de generación de humedad (1.4) y la salida de generación de CO<sub>2</sub> (1.5), la cantidad de humedad y CO<sub>2</sub> necesarias para conseguir las condiciones ambientales deseadas dentro de la cámara, gracias a una resistencia generadora de calor (1.8) y una célula refrigeradora (1.9) que generan calor y frío;

- Una estructura giratoria (1.6) que conecta con la cámara y permite que gire para que los sensores de posición (1.11) no detecten las paredes de la cámara (2), quedando de esta forma la apertura de la cámara (2.1) en la parte trasera del dispositivo;
- Una pantalla de control (1.10) que permite al usuario marcar los valores de humedad, temperatura y CO<sub>2</sub> deseados dentro de la cámara, y dar comienzo a las diferentes pruebas;
- Una toma de corriente (1.13) que permite conectar el equipo a la red eléctrica y un bus de comunicaciones (1.12) con la función de descargar los datos de las pruebas en una unidad de almacenamiento de datos o alimentar el dispositivo con baterías;

Donde el soporte móvil superior (3) presenta:

- Una cámara (3.1) que permite la visualización y toma de datos de imágenes en remoto;
- Unos rieles (3.2) que facilitan el movimiento controlado del extrusor (4);

Donde el extrusor (4) presenta:

- Un soporte de movimiento eje X del extrusor (4.1) que provoca el movimiento del extrusor en el eje X;
- Un accionador de presión del extrusor (4.2) que permite aplicar una presión controlada a la jeringuilla introducida en el interior del depósito del extrusor (4.3);
- Un tapón del extrusor (4.4) que asegura la jeringuilla en el interior del depósito del extrusor (4.3);

Donde el soporte móvil inferior (5) presenta:

- Una apertura del soporte móvil inferior (5.1) que permite la introducción del portamuestras de colapso (6) y del portamuestras de imprimibilidad (7), o de cualquier otro portamuestras;
2. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 1 donde la estructura fija (1) está fabricada de un material rígido.
  3. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 2 donde la estructura fija (1) está fabricada de un material inoxidable.
  4. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 1 donde el soporte móvil superior (3), el soporte móvil inferior (5) y el extrusor (4) están fabricados de materiales rígidos.
  5. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 4 donde el soporte móvil superior (3), el soporte móvil inferior (5) y el extrusor (4) están fabricados de resina o termoplásticos.

6. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según las reivindicaciones 3 y 4 donde la estructura fija (1), el soporte móvil superior (3), el soporte móvil inferior (5) y el extrusor (4) están fabricados de un acero inoxidable.
7. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 1 donde la cámara (2) está fabricada de un material rígido.
8. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 1 donde la cámara (2) está fabricada de un material flexible.
9. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según las reivindicaciones 1 y 8 donde la cámara (2) está fabricada de vidrio.
10. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según las reivindicaciones 1 y 8 o 9 donde la cámara está fabricada de un material plástico.
11. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 10 donde la cámara está fabricada de un material plástico con filtro UVC.
12. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 1 donde el portamuestras de colapso (6) y el portamuestras de imprimibilidad (7) están fabricados de un material impermeable.
13. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 12 donde el portamuestras de colapso (6) y el portamuestras de imprimibilidad (7) están fabricados de un plástico o resina.
14. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 13 donde el portamuestras de colapso (6) y el portamuestras de imprimibilidad (7) son elementos bioinertes.
15. Dispositivo de ensayo para la optimización de la bioimpresión 3D según la reivindicación 1 donde el depósito del extrusor (7.1) y el tapón del extrusor (7.2) son elementos con rosca.

4.6.7 Figuras

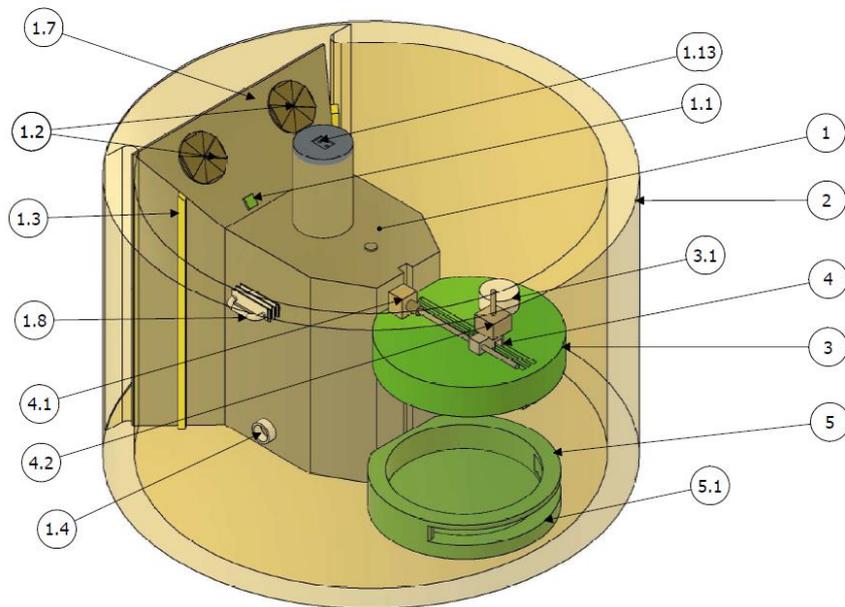


Figura 4-41: Vista 1 del dispositivo patentado titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D

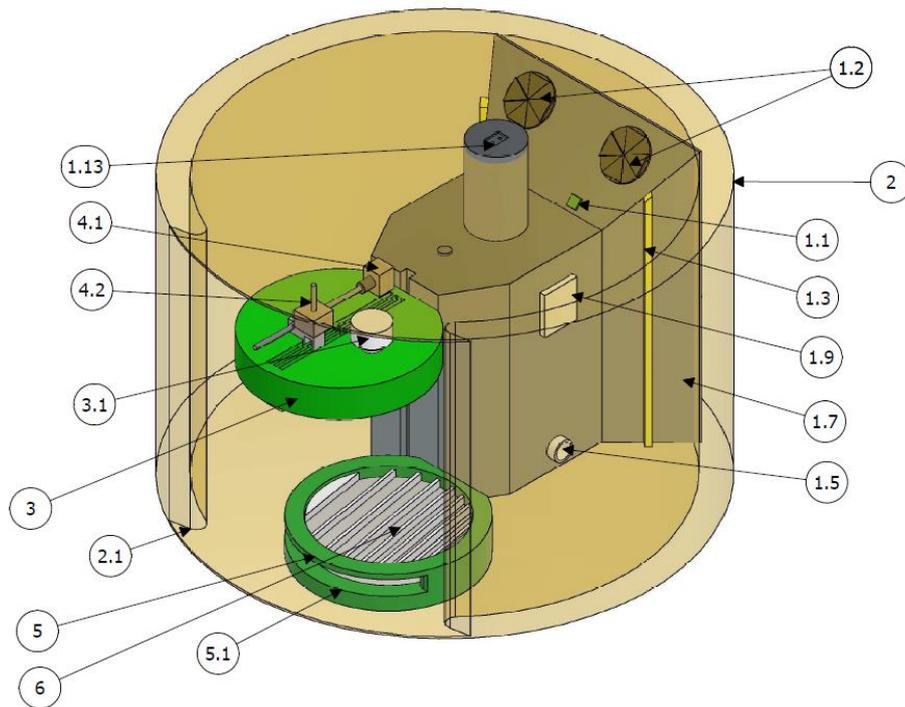


Figura 4-42: Vista 2 del dispositivo patentado titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D

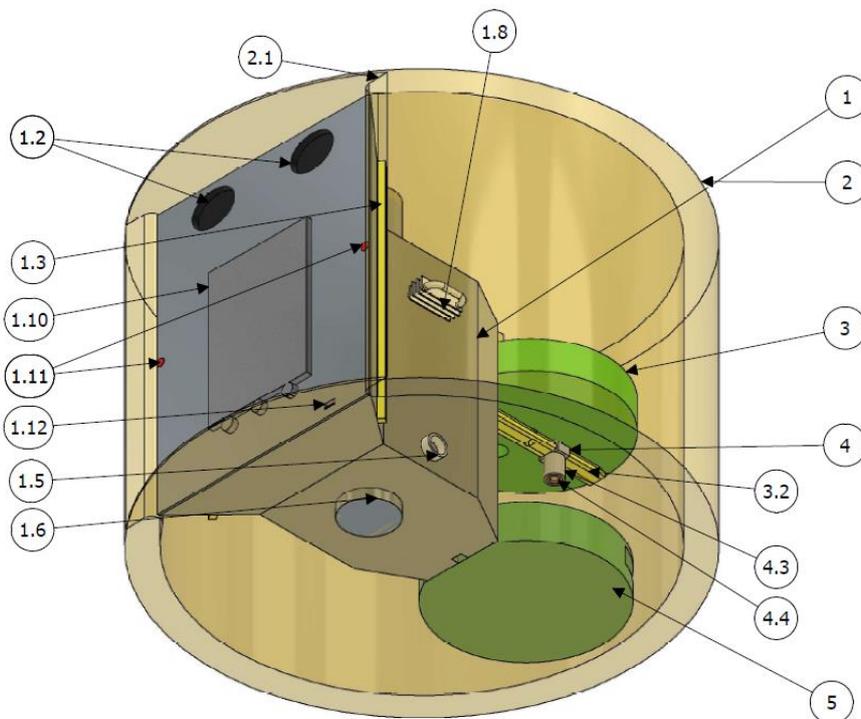
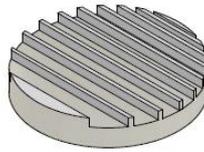


Figura 4-43: Vista 3 del dispositivo patentado titulado: DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D



**Figura 4-44: Útil especialmente diseñado para la realización de las pruebas de colapso por el dispositivo de la invención.**



**Figura 4-45: Útil especialmente diseñado para la realización de las pruebas por el dispositivo de la invención.**

## 4.7 Fabricación y caracterización de andamiajes rellenos de biovidrio e hidroxiapatita

### Fabrication and characterisation of bioglass and hydroxyapatite-filled scaffolds

Jesús M. Rodríguez-Rego<sup>\*a</sup>, Laura Mendoza-Cerezo<sup>a</sup>, Anabel Soriano-Carrera<sup>a</sup>, Alfonso C. Marcos-Romero<sup>a</sup>, Antonio Macías-García<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Graphic Expression. School of Industrial Engineering. University of Extremadura. Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz. Spain

<sup>b</sup>Department of Mechanical, Energy and Materials Engineering. School of Industrial Engineering. University of Extremadura. Avenida de Elvas, s/n. 06006-Badajoz. Spain

\*jesusrodriguezrego@unex.es

**Keywords:** *Biofabrication; Bioglass; PLA; Hydroxyapatite; Scaffold*

### 4.7.1 Resumen

La ingeniería de tejidos es un campo en continua evolución. En dicho campo se ha investigado mucho sobre la sustitución de defectos óseos mediante el uso de scaffold compuestos de distintos materiales. Entre ellos, los biovidrios se utilizan con frecuencia por su versatilidad y buenas propiedades. Este artículo trata sobre los resultados de la producción de una pasta inyectable de Bioglass® 45S5 e hidroxiapatita sobre una estructura porosa impresa en 3D mediante fabricación aditiva, utilizando un termoplástico (PLA). Los resultados fueron evaluados en una aplicación específica de la pasta, y por ello se estudiaron las propiedades mecánicas y bioactivas, para mostrar la posibilidad de utilizar esta combinación para su aplicación en la medicina regenerativa.

### 4.7.2 Introducción

La ingeniería de tejidos es una rama de la bioingeniería que ofrece soluciones muy interesantes para la obtención de tejidos y órganos en la medicina regenerativa, mediante la combinación de células, factores de crecimiento, biomateriales y la tecnología de impresión 3D para fabricar construcciones biológicas [1].

Cuando los tejidos se lesionan o enferman, en muchos casos la regeneración no es posible, y el uso de implantes permanentes es limitado. Esto ocasiona un problema grave, principalmente, por la necesidad de muchos pacientes de un trasplante de órganos [1] o por los elevados tiempos de espera de recuperación de algunos tejidos, como sucede con el tejido óseo.

Nuestro organismo dispone de dos mecanismos para curar las heridas [1]:

- Mediante reparación.
- Mediante regeneración.

El problema aparece cuando nuestro organismo, y más concretamente el hueso, no es capaz de regenerar la estructura dañada. Es en este punto donde la ingeniería tisular debe desarrollar métodos que superen la capacidad del organismo para regenerar espontáneamente los tejidos [1]–[4].

La ingeniería de tejidos se postula como una herramienta fundamental, con la capacidad de solventar, en un futuro, los problemas derivados de la regeneración de cualquier tipo de tejido junto con la impresión 3D, permitiendo que esos tejidos se adapten a la morfología necesaria [5]–[8].

En la actualidad, la mayoría de los implantes se fabrican con materiales mucho más resistentes que el hueso, como los metales. Estos implantes no pueden adaptarse a los cambios de las condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se necesitan sustitutos mejores como los biomateriales sintéticos [9]. Un biomaterial es un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar un tejido u órgano. Además, permiten ser impresos en 3D para ser utilizados como materiales estructurales de los scaffolds o andamios [10].

Un scaffold es un material diseñado para interactuar con las células de un organismo vivo, con el fin de proporcionar al cuerpo una estructura sobre la que el nuevo tejido pueda crecer fácilmente [11]. Los andamios, como parte indispensable de la ingeniería tisular, son versátiles en la promoción de interacciones célula-andamio, adhesión celular y secreción de matriz extracelular. También

permiten el transporte de nutrientes, desechos y señales reguladoras, para permitir la proliferación y diferenciación celular [12].

Para lograr esta característica se requiere una alta porosidad, con un tamaño suficientemente grande de los poros. Esto facilita la adhesión celular y la difusión en la estructura, útil también para el suministro de nutrientes. A veces también la biodegradabilidad es un factor importante, para permitir que el tejido natural recupere toda la estructura anterior. Los andamios se utilizan normalmente para reparar daños óseos, y son una alternativa válida a los injertos [13].

Los scaffolds de materiales bioinerte, biodegradables rellenos de biovidrio son una muy buena opción por tener propiedades mecánicas similares a las del hueso natural. Tienen una buena bioactividad, es decir, poseen una alta capacidad de interactuar químicamente con los tejidos. Además, el biovidrio forma un gel de sílice muy rápidamente en un entorno biológico, y sobre esa capa los fosfatos de calcio, la parte mineral del hueso, pueden adherirse fuertemente y crecer. Uno de los más utilizados, por su óptima bioactividad, es un vidrio bioactivo llamado *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5 [13], [14].

Por otra parte, los scaffolds rellenos de componentes inorgánicos naturales poseen funciones biológicas o fisiológicas circunstanciales. Un ejemplo de ello es la hidroxiapatita (HA), que es el principal componente de los huesos y los dientes [12].

Las biocerámicas como la hidroxiapatita están compuestas a base de fosfato de calcio, que tiene efectos positivos sobre la proliferación y adhesión de los osteoblastos, debido a su estructura química comparable a la del hueso humano [15].

Nuestro objetivo es el diseño de un cubo hueco biodegradable de Poliácido láctico PLA impreso en 3D y su posterior relleno por inyección de una pasta basada en biovidrio e hidroxiapatita con buenas propiedades mecánicas y una alta bioactividad [13], para poder plantear su uso en la ingeniería de tejidos en la realización de implantes óseos.

### 4.7.3 Materiales y métodos

#### 4.7.3.1 Materiales de partida

Para este trabajo se han utilizado los siguientes materiales de partida:

➤ **Vidrio bioactivo comercial *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5**

Los vidrios bioactivos comerciales son materiales cerámicos con una composición química que permite inducir y conducir la mineralización de los tejidos. Por ello presentan un gran interés debido a su excelente bioactividad y biocompatibilidad, además de disponer de diferentes familias con composiciones diferentes [16].

El vidrio bioactivo 45S5 fue desarrollado por Hench en 1971 al fundir una mezcla de óxidos en las siguientes proporciones: 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO y 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (porcentaje en peso) [17]. Su nombre es debido al contenido de SiO<sub>2</sub> (45% en peso) y a la relación molar Ca/P (5% en peso). Este material es el más usado en aplicaciones clínicas (odontología, regeneración ósea, prótesis de oído, etc.) [18], [19].

El vidrio bioactivo se puede obtener mediante el proceso sol-gel. Esta técnica permite controlar la composición y homogeneidad del vidrio, debido a la baja temperatura de trabajo que se precisa [14], [20], [21]

➤ **Alcohol Polivinílico (PVA)**

El alcohol de polivinilo (PVA), también llamado polietenol o poli (alcohol vinílico), es un polímero sintético soluble en agua, de fórmula química general (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O). Tiene excelentes propiedades para formar películas, como emulsionante y como adhesivo. También es resistente al aceite, grasas y disolventes. Es inodoro y no tóxico con altas propiedades de barrera para el oxígeno y los aromas. Sin embargo, estas propiedades dependen de la humedad, es decir, con mayor humedad más agua es absorbida. El agua, que actúa como un plastificante, a su vez reducirá su resistencia a la tracción, pero aumentan su elongación y resistencia al desgarro. El PVA es totalmente degradable y se disuelve rápidamente.

➤ **Hidroxiapatita (HA)**

La hidroxiapatita (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) es un compuesto de gran interés en el campo de la biomedicina, debido a que presenta características que hacen que sea apropiada para su uso en regeneración ósea. Dichas características son su bioactividad, biocompatibilidad excepcional, biodegradabilidad, osteoconductividad y ausencia de toxicidad, además de tratarse de un material inorgánico, no inflamatorio y no inmunogénico [22]. Además, en condiciones fisiológicas, la hidroxiapatita (HA) es la forma cristalina de fosfato cálcico más estable. Estas características se deben a su composición química, que imita los componentes inorgánicos de los dientes y el hueso humanos [23]. Esto hace que la HA presente una buena biocompatibilidad y pueda combinarse firmemente con el hueso natural [24].

➤ **Ácido poliláctico (PLA)**

El PLA es un biopolímero termoplástico, biodegradable y biocompatible, ampliamente utilizado en aplicaciones médicas. Este material presenta una alta tensión y una baja elongación, lo que le confiere un elevado módulo de Young. Todo esto le permite ser un material muy indicado para aplicaciones donde se deba soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas [25].

Las estructuras de alta resolución de PLA con fines médicos se pueden obtener mediante impresión 3D con un sistema basado en boquillas.

### 4.7.3.2 Métodos

➤ **Caracterización del biovidrio 45S5 comercial**

El biovidrio 45S5 fue caracterizado mediante de difracción de Rayos X y espectrofotometría FT-IR.

➤ **Difractograma de rayos X**

Las muestras se analizaron mediante cristalografía de rayos X, usando un difractómetro de rayos X de sobremesa "MiniFlex+", de la marca Rigaku y un sistema XPERT-PRO, en el cual los rayos X fueron formados por una ampolla de cobre sometida a un potencial de 45kV y una corriente de 40mA. El barrido (2θ) se realizó entre 20° y 60-90°, con pasos de 0,0334225°. De esta forma, la difracción de rayos X es una técnica útil para el análisis de la cristalinidad de muestras sólidas.

➤ **Espectrofotometría FT-IR**

Para el análisis de las muestras mediante espectroscopía infrarroja se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR. Para ello, se prepararon las pastillas añadiendo 1 mg de muestra a 200mg de KBr, y prensando los polvos con la ayuda de un molde SPECAC de 13 mm de diámetro.

➤ **Preparación de las muestras**

Se diseñó un modelo de cubo 3D hueco con PLA mediante impresión 3D para ser rellenado por inyección con una pasta.

La pasta de relleno se obtuvo mezclando un vidrio bioactivo (BGP) formada por vidrio bioactivo 45S5 con PVA 95% y H<sub>2</sub>O (20% PVA, 80% H<sub>2</sub>O) e hidroxiapatita (HA) en las siguientes proporciones:

- 25% BGP /75% HA (muestra 1)
- 50% BGP /50% HA (muestra 2)
- 75% BGP /25% HA (muestra 3)

➤ **Caracterización de las muestras (BGP+HA)**

Las muestras preparadas fueron caracterizadas determinando la viscosidad, el tiempo de fraguado y su bioactividad.

➤ **Viscosidad y tiempo de fraguado**

La viscosidad de un fluido es una medida de su resistencia a fluir. Describe la fricción interna de un fluido en movimiento. Los fluidos viscosos resisten el movimiento porque su composición molecular crea mucha fricción interna, mientras que los fluidos con baja viscosidad fluyen fácilmente porque su composición molecular crea poca fricción cuando están en movimiento.

Para determinar la viscosidad se ha utilizado un viscosímetro, y para el tiempo de fraguado se utilizó el método de trazado de líneas y rellenado de hueco con las pastas fabricadas.

La viscosidad se midió utilizando el viscosímetro HAAKE RV2 MK 500. Para ello la muestra se introduce en el viscosímetro y el sistema se somete a diferentes velocidades angulares. Los valores medidos se calcularon manualmente, y la curva de viscosidad se obtuvo en Excel.

La ecuación característica para los fluidos no newtonianos es la Ley de la potencia (ecuación 2.1):

$$\mu_{\text{eff}} = K \left[ \frac{\partial \mu}{\partial y} \right]^{(n-1)} \quad 1$$

Donde:

$\mu_{\text{eff}}$  es la viscosidad aparente o efectiva.

$\frac{\partial \mu}{\partial y}$  es la velocidad cortante.

n es el índice empírico de comportamiento de flujo.

K es el índice de consistencia.

A partir de la representación de la viscosidad aparente o efectiva en función de la velocidad de corte se pueden determinar los valores de K y n. El valor de K y n se puede obtener de la ecuación  $\log(\mu_{\text{eff}})$  y  $\log \partial \mu / \partial \dot{\gamma}$ . La línea de pendiente da el valor de n-1 a partir del cual se puede calcular n. La intersección en  $\log \partial \mu / \partial \dot{\gamma} = 0$  da el valor de K.

Los tiempos de cohesión y de fraguado de las muestras se determinaron mediante las siguientes pruebas:

- Tiempo de cohesión (TC): tiempo transcurrido desde que se deposita la muestra hasta que adquiere una consistencia tal que, sin haber endurecido completamente, pueda inyectarse. Para determinar el tiempo de cohesión se traza una línea sobre un papel con una jeringuilla llena de muestra y se mide el tiempo que transcurre hasta que la línea dibujada en el papel adquiere una consistencia determinada y deja de pegarse al guante al tocarla.
- Tiempo de fraguado (TF): tiempo transcurrido desde el inicio de la mezcla y carga en una jeringuilla, hasta que la masa ha adquirido la firmeza, la consistencia, la dureza y la resistencia que impide que la muestra fluya por ella. Para determinar el tiempo de fraguado se crean agujeros y con la jeringuilla cargada de muestra se van llenando hasta que la muestra deja de llenar los agujeros creados. Este tiempo nos indicará que la muestra no fluye más.

#### ➤ **Impresión 3D del scaffold de PLA**

Los polímeros son biomateriales ampliamente utilizados para la impresión 3D. Concretamente, los polímeros de PLA se usan principalmente en impresoras FDM, ya que el modelado por deposición fundida es un método económico para crear scaffold con una porosidad y arquitectura controladas. El diseño de los scaffold afecta de forma directa a las propiedades mecánicas, la respuesta celular, la permeabilidad y la difusión de nutrientes [26]. Para ello, se diseñó con Autodesk Fusion un scaffold en forma de cubo. El modelo se tradujo a g-code utilizando el software Cura. En base a lo anterior se fabricó mediante impresión 3D (impresora 3D estándar, Ender 3) un scaffold en forma de cubo (1 cm x 1 cm x 1cm) con un filamento PLA Smartfil, del fabricante Smart Materials 3D. Este filamento de PLA ofrece excelentes propiedades mecánicas y gran calidad en la impresión 3D. Cada cubo tiene seis capas, y cada capa está hecha con 6 líneas paralelas.

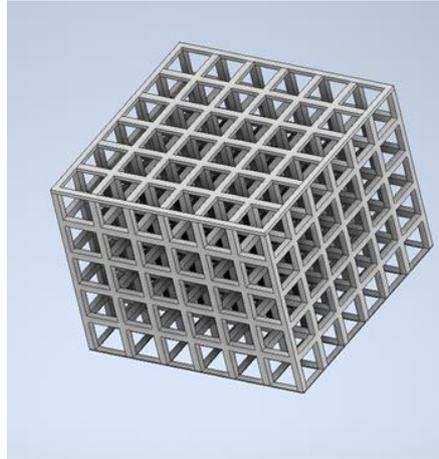


Figura 4-46: Diseño de cubo para impresión 3D donde se aprecian los espacios que se rellenarán con las pastas estudiadas en este trabajo.

➤ **Caracterización del scaffold**

• **Porosidad**

Para determinar la porosidad del scaffold en forma de cubo se calculó su densidad  $\rho_{\text{scaffold}}$  mediante la masa y el volumen de los cubos impresos en 3D. La porosidad  $p$  fue calculada con la fórmula:

$$p = 1 - \rho_{\text{scaffold}} / \rho_{\text{PLA}} \quad 2$$

donde  $\rho_{\text{PLA}} = 1,25 \text{ g/cm}^3$  es la densidad teórica del PLA.

• **Propiedades mecánicas del scaffold (Cubo de PLA hueco)**

El ensayo de resistencia a compresión consiste en aplicar una carga constante sobre una probeta a lo largo de su eje vertical, en el cual el puente de carga desciende a una velocidad constante, comprimiendo la pieza entre los platos de compresión.

Para la realización de los ensayos se dispone de la máquina universal de ensayos mecánicos Shimadzu Autograph con una capacidad máxima de carga de 50 kN, controlada por ordenador mediante la aplicación Trapezium de Shimadzu. Esta máquina permite realizar ensayos de tracción, flexión y compresión, utilizando los cabezales correspondientes para cada ensayo.

Antes de realizar los ensayos se configuran los parámetros del ensayo manualmente a través del ordenador que se encuentra conectado a la máquina. Se introducen valores como las dimensiones de las probetas, la velocidad de ensayo (en este caso 1 mm/min) y el desplazamiento máximo (en este caso 1 mm).

- **Relleno del scaffold en forma de cubo hueco y caracterización**

A partir de las pastas (BGP+HA) preparadas con diferentes proporciones de HA se rellenaron los cubos 3D de PLA, utilizando jeringuillas.



Figura 4-47: Pruebas para rellenar los cubos 3D con las distintas pastas.

- **Propiedades mecánicas del scaffold relleno**

Para realizar los ensayos de compresión con las pastas inyectadas en el scaffold de PLA se utilizó un equipo Shiadzu AG-IS y se determinaron las curvas de tensión frente a deformación.

- **Test de bioactividad de las muestras**

El concepto de bioactividad surge de la capacidad de algunos vidrios bioactivos para formar espontáneamente enlaces con el hueso. Uno de los métodos para evaluar la bioactividad de materiales consiste en sumergir el material en un medio líquido con características similares a la de fluidos fisiológicos. Kokubo [27] determinó que para crear un enlace directo entre el hueso y el material es necesaria la formación de una capa de apatita en el material una vez implantado en el cuerpo humano. Para poder reproducir esta formación en el ser humano se utilizó un Fluido Corporal Simulado (SBF). La bioactividad de un material puede predecirse por medio de la formación de apatita en superficie, de manera que la formación de apatita en estos materiales, al ser sumergidos en SBF, presentan una buena correlación con su comportamiento bioactivo en estudios realizados in vivo [28]. Para la prueba de bioactividad, se ha utilizado SBF con una concentración de iones aproximadamente igual a la del plasma sanguíneo humano [14], [20], [21].

La prueba de bioactividad se llevó a cabo poniendo en contacto las muestras preparadas con 20ml de SBF durante diferentes periodos de tiempo (1, 3, 5 y 7 días).

La evaluación de la bioactividad se realizó con microscopio electrónico de barrido (SEM) para obtener imágenes de la superficie.

- **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Mediante la obtención de imágenes de las muestras por microscopía electrónica de barrido es posible observar la evolución morfológica de la superficie, la macroporosidad y la microporosidad, así como la presencia de apatita. Para determinar la bioactividad de las muestras, se ha utilizado un equipo SEM modelo Quanta 3D FEG // FEI Company.

#### 4.7.4 Resultados y discusión

##### ➤ Caracterización del biovidrio 45S5 comercial

La bioactividad del 45S5 está basada en su bajo contenido en  $\text{SiO}_2$  y su alto contenido en  $\text{Na}_2\text{O}$  y  $\text{CaO}$ , así como la relación  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$  [29].

La difracción de rayos X se aplicó a las partículas del biovidrio 45S5 para obtener un análisis estructural de estas. La espectroscopía FT-IR nos permite comprender la estructura de los polvos de biovidrio 45S5 mediante la determinación de las vibraciones de los diferentes grupos en la superficie de la muestra.

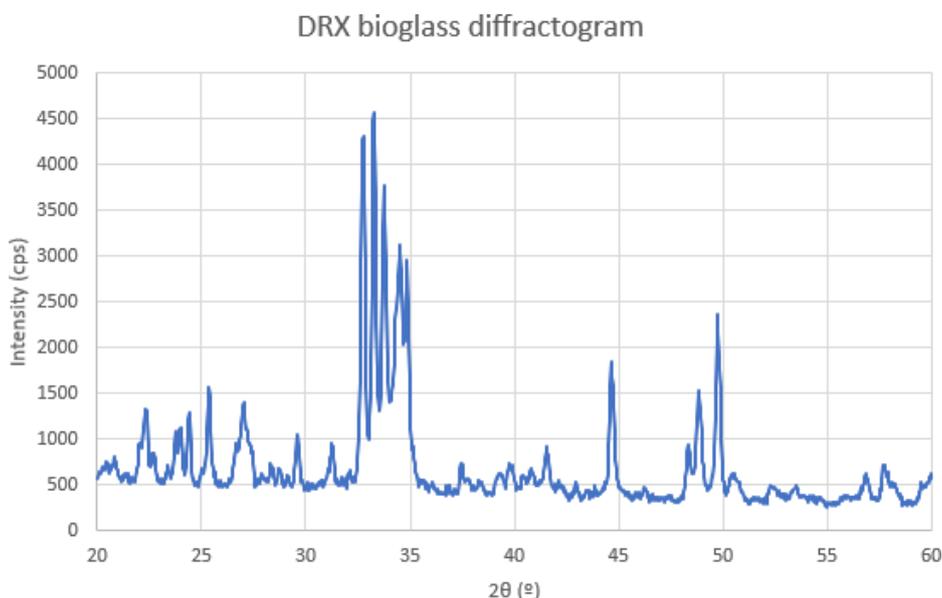


Figura 4-48: Resultados de la difracción de rayos X (DRX) de los polvos de biovidrio

A la vista del difractograma de rayos X (DRX) de los polvos de biovidrio 45S5 se observa en la figura 48 que el material presenta una estructura cristalina por la cantidad de picos correspondiente a la formación de cristales

Los picos correspondientes a  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$  están relacionados con el tratamiento del material de sinterización y comienzan a formarse en torno a los 6000C [30]. Dichos picos característicos se localizan en  $2\theta$  de  $22.4^\circ$ ,  $23.4^\circ$ ,  $24.8^\circ$ ,  $32.6^\circ$ ,  $33.1^\circ$ ,  $33.8^\circ$ ,  $34.4^\circ$  y  $42.3^\circ$ .

Así mismo, se observan otros picos correspondientes a la fase cristalina combeíta (mineral de fórmula  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ ), probablemente relacionado con las altas temperaturas de sinterización del biovidrio [31], [32], y como consecuencia de la desvitrificación parcial que se produce en el último paso de la síntesis. Estos picos se localizan en  $2\theta$  de  $24.9^\circ$ ,  $44.6^\circ$ ,  $48.9^\circ$  y  $49.7^\circ$ .

Por otra parte, se ha observado por algunos autores la formación de un nuevo pico pequeño en  $2\theta$  de  $31.7^\circ$  correspondiente a altas temperaturas de sinterización que sugiere la formación de una nueva fase cristalina secundaria la cual fue identificada como silicorerhenanite  $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$  [33]. En el biovidrio 45S5 el fósforo tiende a despolimerizar la red de silicio y entrar como un catión cuádruple en la red [34].

La figura 49 recoge los espectros FT-IR de los polvos de biovidrio 45S5 donde se observan dos fases cristalinas, una de silicato de sodio calcio y una fase secundaria de fosfato [35].

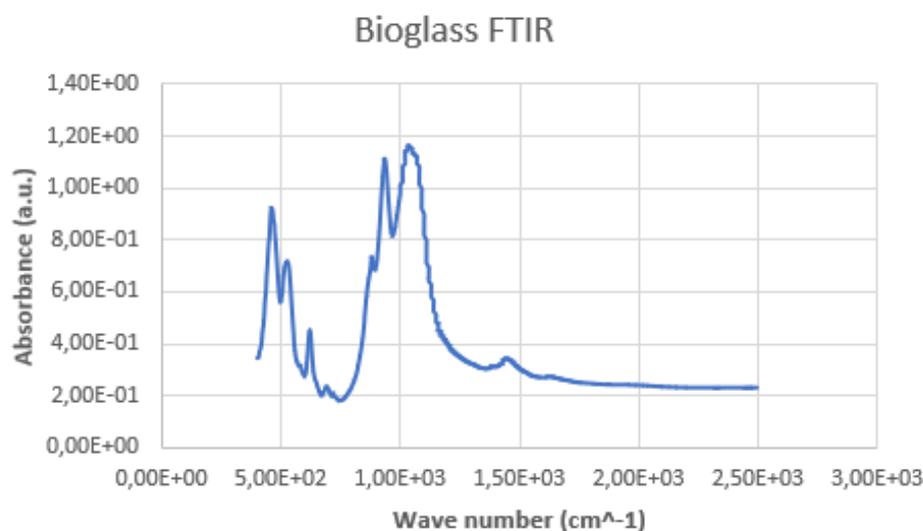


Figura 4-49: Difractograma FTIR de los polvos de biovidrio

Los resultados FT-IR del biovidrio 45S5 tras el proceso de sinterización se muestran a continuación:

Entre 400 y 600 cm<sup>-1</sup> podemos observar las bandas de vibración de flexión de los enlaces Si-O-Si.

La señal de modo flexión de la banda P-O se observa a 635 cm<sup>-1</sup> [36], [37].

Las bandas que se localizan aproximadamente alrededor 900 y 1100 cm<sup>-1</sup> se pueden atribuir a las vibraciones de estiramiento de Si-O y Si-O-Si respectivamente [36], [38].

Resumiendo, los niveles de silicio presentes en la muestra son óptimos, como se desprende de los ensayos de DRX y FT-IR, favoreciendo la unión y formación del nuevo hueso, ya que la rapidez del proceso puede variar en función del porcentaje del elemento (siendo más lenta cuanto mayor es el porcentaje de silicio en el vidrio, pudiendo llegar incluso a no presentar unión directa entre el material y el hueso) [39].

Por otro lado, se ha observado que la alta proporción CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> estimula la reactividad de la superficie del biovidrio dentro de un ambiente fisiológico.

#### ➤ Caracterización de las muestras

##### • Viscosidad y tiempo de fraguado

Uno de los parámetros fundamentales a analizar en la formulación de este tipo de pasta para rellenar scaffold por inyección es la viscosidad. La viscosidad es un parámetro físico de los fluidos que cuantifica su resistencia al movimiento. A nivel molecular, la viscosidad es una medida de la fricción existente entre las partículas que componen el fluido, dado que cuanto mayor sea esta, más energía será necesario invertir para imprimir una cierta velocidad al flujo.

Así, al realizar los ensayos reológicos se descartó la muestra 1 (25%BGP/75% HA) por presentar un estado sólido compacto sin capacidad para poder fluir.

Mediante mediciones reológicas, se determinó la variación de la viscosidad con respecto a la velocidad de corte, de las dos muestras restantes, como se muestra en la figura 50. La viscosidad disminuyó al aumentar velocidad de corte, indicando un perfil típicamente pseudoplástico, lo que coincide con lo descrito en la bibliografía [40], [41]. El aumento de la velocidad de corte produce un daño irreversible en la estructura [42], [43].

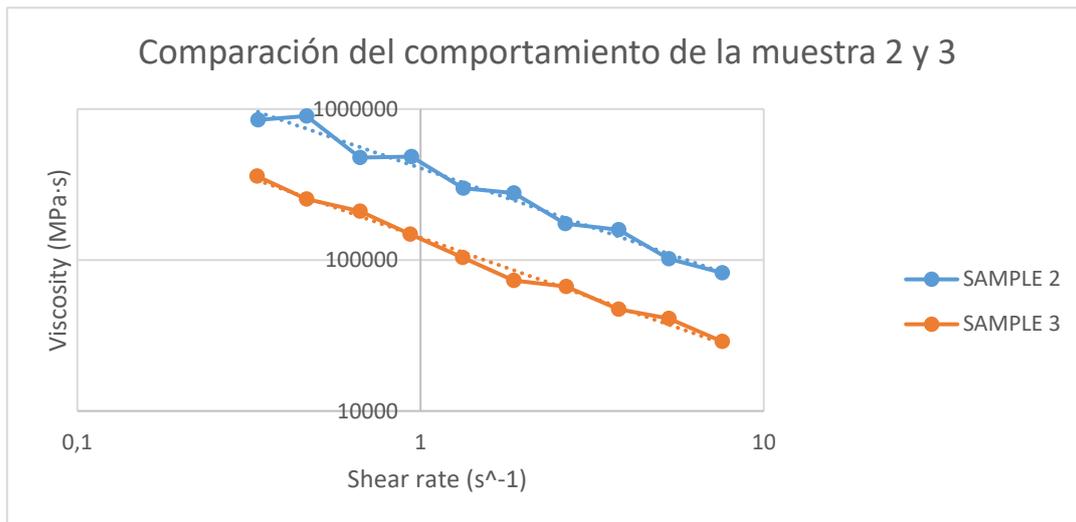


Figura 4-50: Viscosidad de dos composiciones diferentes estudiadas.

El coeficiente de consistencia  $K$  y el índice de comportamiento de flujo  $n$  de las muestras se indican en la Tabla 3-15.

Tabla 4-15: Parámetros de dos composiciones diferentes estudiadas.

Setting time test for different samples		
	Sample 2	Sample3
<b>k</b>	5.61	5.15
<b>n</b>	0.22	0.20
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9372	0,9934

El parámetro  $n$  nos indica el grado de desviación con relación al comportamiento newtoniano que presentan los fluidos, cuando es menor que la unidad, 1, el fluido es no newtoniano, y cuando este valor es menor que 0,7 es pseudoplástico, por tanto, las muestras 2 y 3 cumplen ambos requisitos.

El factor de consistencia del flujo  $K$ , podemos describirlo de forma idéntica al concepto de viscosidad plástica dado que un aumento de  $K$  indica un aumento en la concentración de sólidos. Indica la consistencia del fluido; es decir, si el valor de  $K$  es alto, el fluido es más "viscoso" y viceversa. A la vista de los resultados de la Tabla anterior, la muestra 3 es la que presenta menor viscosidad y podría ser óptima para llenar el scaffold

Resumiendo, las propiedades de flujo se ven afectadas significativamente por el porcentaje de HA, que produce disminución del coeficiente de consistencia  $K$  y del índice de comportamiento de flujo  $n$  conforme disminuye la proporción de HA [44].

El estudio de los tiempos de cohesión (TC) y fraguado (TF) de las muestras preparadas (Tabla 3-16) es de gran importancia para determinar el tiempo de manipulación de las muestras y su capacidad de fluir con una consistencia determinada por un inyector.

**Tabla 4-16: Tiempos de fraguado de dos composiciones diferentes estudiadas.**

<b>Setting time test for different samples</b>		
	<b>Sample2</b>	<b>Sample3</b>
<b>TC (min)</b>	29	42
<b>TF (min)</b>	36	50

A la vista de los resultados se observa que el TC es menor que el TF, lo cual permite la manipulación de la muestra hasta el momento de la impresión 3D [7]. Estudios previos realizados por M. D. Vlad en 2012 [45], establecieron que la relación Ca/P ejercía una influencia significativa en los tiempos de fraguado TF así cuanto menor es proporción de HA se observó una cohesión homogénea y un fraguado uniforme.

De estos resultados se desprende que la muestra 3 tiene mejores propiedades de partida y fue la seleccionada para realizarle el resto de prueba planteadas.

➤ **Caracterización del scaffold (Cubo de PLA hueco)**

• **Porosidad**

La existencia de poros en el scaffold es necesaria para permitir la migración y la proliferación de osteoblastos y células mesenquimales, y para promover la vascularización [46], [47].

De forma general, se considera que los requerimientos mínimos para que se produzca el crecimiento de tejido y la funcionalidad de los scaffold son poros con un diámetro medio de 100  $\mu\text{m}$  y una porosidad <50% [48], [49].

La fabricación de scaffold porosos como medio de soporte para el crecimiento de tejidos es clave para facilitar la difusión de nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de residuos metabólicos [50]. El control del tamaño de poro es uno de los parámetros que más afectan a las propiedades mecánicas de la estructura, así como a su afinidad celular. De esta forma, además del tamaño de poro es interesante determinar los valores de porosidad global que posee la estructura. Para ello, se ha utilizado un método basado en la determinación de la densidad aparente de piezas impresas y su comparativa con la densidad del material macizo. Este procedimiento se utiliza extensamente en el estudio de la porosidad de piezas obtenidas mediante fabricación aditiva [51], [52].

Teniendo en cuenta que la densidad del PLA es de  $1.25 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , y la densidad del scaffold poroso es de  $0.25 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , esto dio lugar a una porosidad del 80%, valor considerado óptimo para este tipo de procesos.

• **Propiedades mecánicas del scaffold**

La biocompatibilidad del PLA ha sido probada desde los años 70 y su uso se encuentra ampliamente recogido en la bibliografía [3], [17], [18], [23]. De acuerdo con su biocompatibilidad y uso, se fabricó el scaffold de PLA como se describió anteriormente, y se procedió a valorar sus propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas que poseen los scaffold de PLA deciden su aplicación. En nuestro trabajo se pretende que las propiedades mecánicas del scaffold de PLA se aproximen lo máximo posible a las propiedades del hueso huésped para una transferencia de carga adecuada a los tejidos adyacentes [53], [54].

Teniendo en cuenta las propiedades mecánicas observadas en la figura 3-51 y en la Tabla 3-17 del scaffold en forma de cubo fabricado de PLA con un relleno del 20%, muestran un módulo de elasticidad de 433,60 MPa y una resistencia a compresión de  $R_c=11,44$  MPa, por lo que podemos afirmar que el scaffold de PLA tiene una desventaja cuando se usan en ingeniería de tejidos debido a una resistencia mecánica inferior a la de los huesos normales [55], [56].

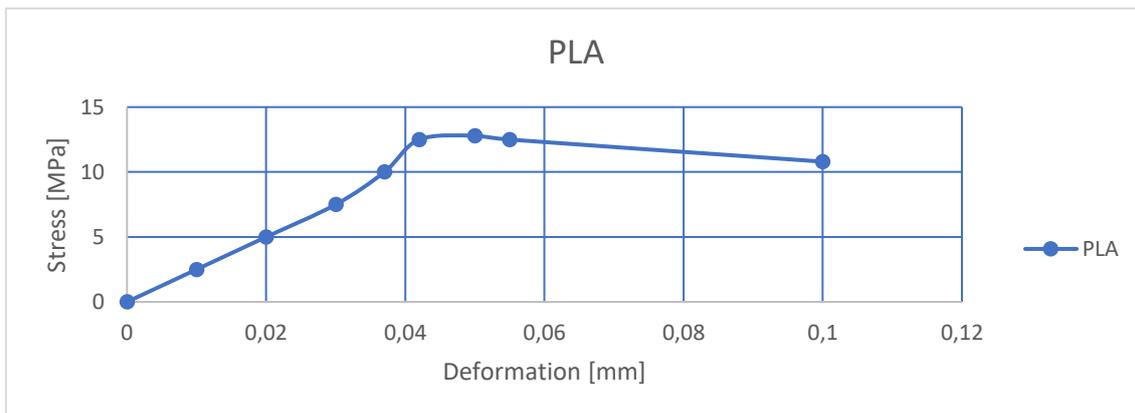


Figura 4-51: Stress-strain of PLA hueco.

Tabla 4-17: Valores medios de las propiedades mecánicas estudiadas en los compuestos de PLA impresos en 3D rellenos de pasta inyectable.

MECHANICAL TESTS		
	Young Modulus [MPa]	Compressive strength [MPa]
PLA FILLING	20000	510
PLA 80% HUECO	433,6	11,44

Por tanto, el scaffold tiene pobres propiedades mecánicas y es necesaria su combinación con otro polímero natural o sintético, u otro tipo de material, para proporcionar unas mejores propiedades mecánicas [57].

- **Caracterización del scaffold relleno**

De acuerdo con el apartado anterior, y con objeto de mejorar los resultados recogidos, se procedió a rellenar el Scaffold de PLA con una pasta compuesta por HA y BG 45S5.

La HA ha sido ampliamente estudiada por su biocompatibilidad y potencial osteogénico, lo que la ha llevado a ser utilizada como un material para injertos en defectos óseos. El BG 45S5 ha sido el vidrio más ampliamente investigado en aplicaciones biomédicas. El BG también posee la gran propiedad de unirse químicamente al tejido óseo. Su unión al hueso se atribuye a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA), biológicamente activa, sobre la superficie del BG al encontrarse en contacto con el fluido corporal, la cual genera la unión entre el tejido vivo y el biomaterial. Al combinar estos tres materiales en forma de un scaffold relleno se mezclan las propiedades de los materiales potenciando su posible uso en la ingeniería de tejidos [58], [59], [60].

- **Propiedades mecánicas del scaffold relleno**

Para mejorar las características mecánicas del scaffold, se rellenó con una mezcla de biovidrio e hidroxiapatita, y se evaluaron sus las propiedades mecánicas.

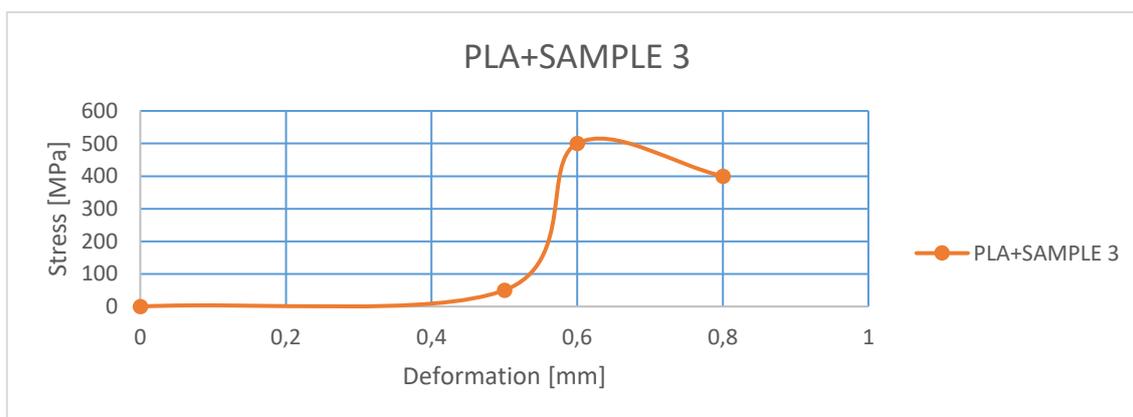


Figura 4-52: Tensión-deformación de PLA hueco + muestra 3.

El módulo de Young, también conocido como el módulo de elasticidad longitudinal, es una constante que poseen los materiales que refleja el grado de elasticidad que posee un determinado material. Los materiales con mayor módulo de Young son menos elásticos, es decir, más rígidos, y los materiales con menor módulo de Young poseen mayor elasticidad. Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos para el scaffold de PLA y PLA relleno se desprende que este último es más elástico que el scaffold de PLA.

El andamio debe proporcionar a las células una estructura tridimensional y un soporte mecánico apropiado para su adhesión y proliferación, permitiendo el crecimiento en una estructura funcional biomimética adecuada [61]. En particular, los biomateriales aplicados a la reparación del tejido óseo deben tener propiedades mecánicas similares a este tipo de tejido. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la muestra 3 exhibió un módulo elástico que es apropiado para ser utilizado en esta área. Teniendo en cuenta que el tejido óseo se organiza en hueso esponjoso (alrededor del 20% del

esqueleto total) y hueso cortical o compacto (alrededor del 80% del esqueleto total), las proporciones de estas dos formas arquitectónicas difieren en varias ubicaciones en el esqueleto. El hueso cortical es casi sólido, con un 10% de porosidad, mientras que el hueso trabecular presenta una porosidad de entre el 50 y el 90%, lo que hace que su módulo y su máxima resistencia a la compresión sean aproximadamente 20 veces inferiores a la del hueso cortical [62]. In vitro, los andamios deben tener suficiente resistencia mecánica para soportar las presiones hidrostáticas y para mantener los espacios necesarios para el crecimiento celular y la producción de matriz [63].

Además, la velocidad de degradación de los andamios debe ajustarse de manera adecuada a la tasa de crecimiento del tejido nuevo, de manera que cuando el sitio de la lesión esté totalmente regenerado, el andamio se haya degradado totalmente [62].

Como se puede observar en la Tabla 3-17, al comparar el módulo Young del hueso cortical (15GPa) [64] con el de las muestras analizadas, se puede observar que el valor que ofrecen la muestra 3 (20GPa) es superior, lo que significa que el andamio tiene tanta resistencia mecánica como el hueso. Por lo tanto, estos andamios pueden utilizarse en huesos expuestos a tensión.

#### ➤ Evaluación de la bioactividad del scaffold relleno

Se evaluó la bioactividad de los scaffold rellenos mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF) y posterior análisis mediante SEM. Para ello, se prepararon cinco ensayos con la muestra 3 y se introdujeron en los scaffold de PLA. La primera muestra no se sumergió en SBF, y fue utilizada como muestra de referencia. El resto de las muestras estuvieron sumergidas en SBF durante 1, 3, 5 y 7 días respectivamente (Figuras 53 a 57).

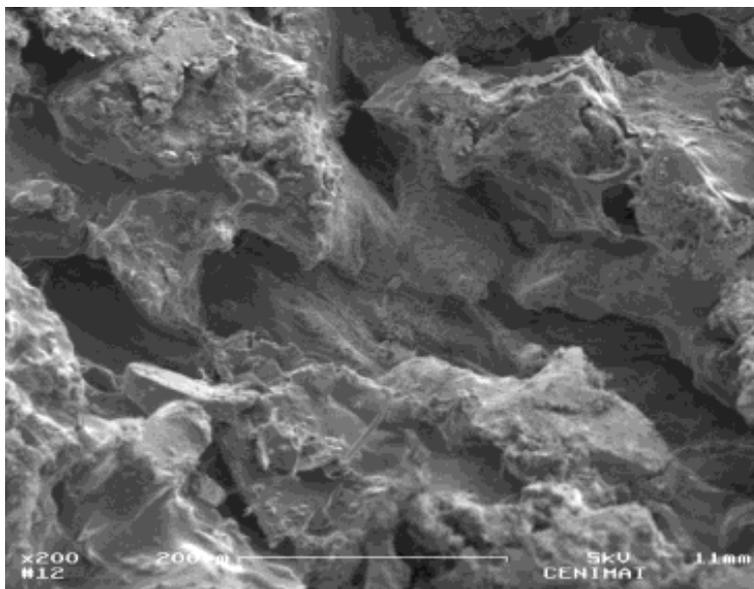


Figura 4-53: Imagen SEM del andamio de referencia con ampliación 200x.

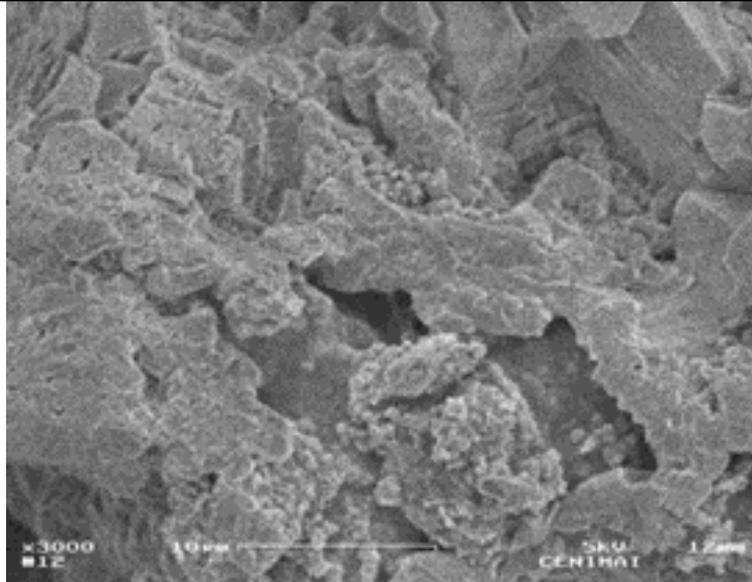


Figura 4-54: Imagen SEM del andamio SBF de 1 día con ampliación de 3000x.

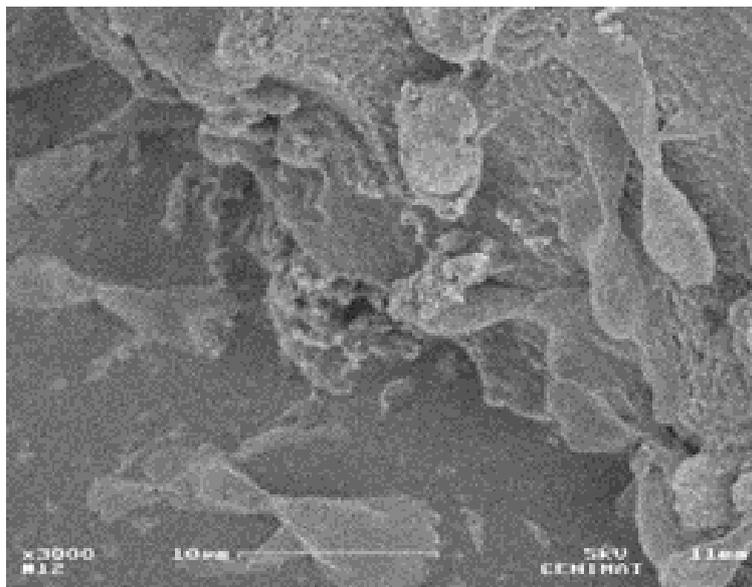


Figura 4-55: Imagen SEM del andamio SBF de 3 días con ampliación de 3000x.

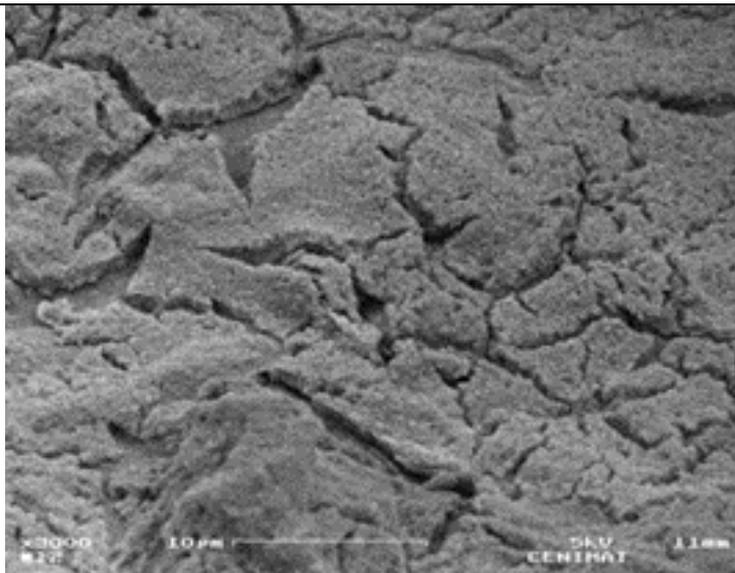


Figura 4-56: Imagen SEM del andamio SBF de 5 días con ampliación de 3000x.

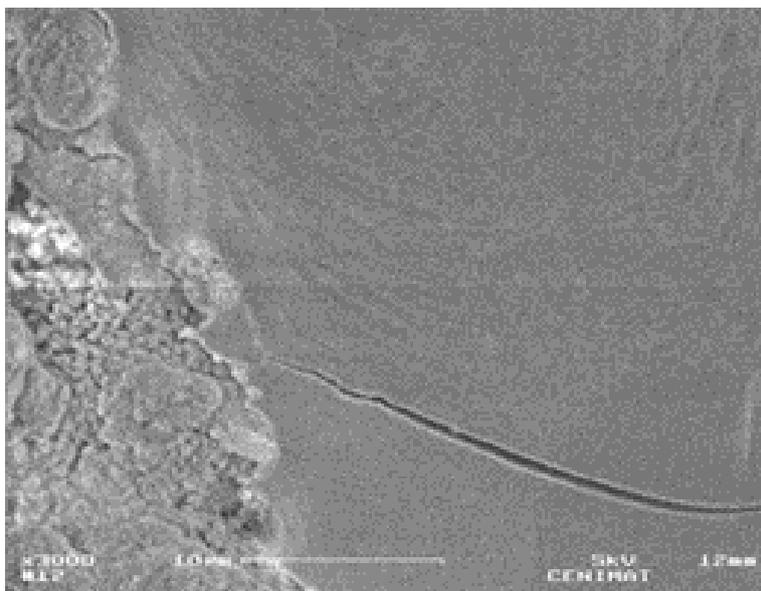


Figura 4-57: Imagen SEM del andamio SBF de 7 días con ampliación de 3000x.

Las imágenes SEM correspondientes a la figura 3-53 (muestra de referencia sin contacto con SBF) presentan una superficie irregular con la presencia de poros de diferentes tamaños. Así mismo, se observa la presencia de hidroxapatita probablemente sobre el biovidrio. En las siguientes imágenes ya podemos ver el crecimiento de la hidroxapatita en la superficie, proceso que va sucediendo con el transcurso de los días de contacto del SBF con las muestras, hasta la formación de la gruesa capa de fosfato de calcio que se aprecia en la Figura 3-57. Además, se observa un crecimiento por nucleación conforme aumenta el tiempo de contacto con SBF. Esto muestra el comportamiento óptimo del sustrato en condiciones biológicas.

---

#### 4.7.5 Conclusiones

Tras realizar la caracterización de las dos muestras se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Las muestras 2 y 3 presentaron una disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de corte, siendo este un comportamiento típico de un material no-Newtoniano, pero la muestra 3 presentó una mayor linealidad y una menor dispersión de los datos proporcionados. Además, esta muestra tiene un tiempo de fraguado mayor en comparación con la muestra 2. A la vista de estos resultados, la muestra 3 es más adecuada para los requerimientos de este trabajo por tener de partida una inyección más fácil, por lo que es la utilizada en el resto del trabajo.

La porosidad del 80% obtenida como resultado de rellenar el cubo de PLA con la pasta BGP+HA resultó apropiada para llevar a cabo el experimento, ya que ese valor se considera óptimo para este tipo de procesos.

La muestra 3 presenta un módulo de Young de 20GPa (Tabla 3-17), más alto que el que presenta el hueso cortical, por lo que los scaffold generados con esta pasta, de origen, tienen una resistencia mecánica suficiente para ser utilizados en posibles implantes óseos

Los resultados de bioactividad fueron realmente prometedores, ya que las muestras sumergidas en SBF durante 1, 5 y 7 días respectivamente mostraron crecimiento celular en la superficie, e incluso en la muestra sumergida durante 7 días se observó un crecimiento celular apilado. Este suceso demuestra el comportamiento óptimo del sustrato en condiciones biológicas. Tras los resultados expuestos se puede concluir que este trabajo muestra que, aunque ya se habían realizado algunos estudios con pastas similares, nunca se habían llevado a cabo con esta aplicación y en combinación con estructuras de PLA. Esta mezcla particular de materiales puede desarrollarse para andamios de alta precisión.

#### 4.7.6 Referencias

- [1] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993, doi: 10.1126/SCIENCE.8493529.
- [2] "Objetivos conceptuales y metodológicos de la investigación histológica." [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1575-18132004000200007](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1575-18132004000200007) (accessed Apr. 03, 2021).
- [3] C. K. Schneider et al., "Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 195–201, 2010. doi: 10.1038/nrd3052.
- [4] N. Cuende, "Andalusian Initiative for Advanced Therapies: Fostering Synergies," *Stem Cells Transl Med*, vol. 2, no. 4, pp. 243–245, Apr. 2013, doi: 10.5966/sctm.2013-0051.
- [5] M. E. Mavili, H. I. Canter, B. Saglam-Aydinatay, S. Kamaci, and I. Kocadereli, "Use of three-dimensional medical modeling methods for precise planning of orthognathic surgery," *Journal of Craniofacial Surgery*, vol. 18, no. 4, pp. 740–747, Jul. 2007, doi: 10.1097/scs.0b013e318069014f.
- [6] J. Faber, P. M. Berto, and M. Quaresma, "Rapid prototyping as a tool for diagnosis and treatment planning for maxillary canine impaction," *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, vol. 129, no. 4, pp. 583–589, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.ajodo.2005.12.015.
- [7] P. S. D'urso et al., "Custom cranioplasty using stereolithography and acrylic," *Br J Plast Surg*, vol. 53, no. 3, pp. 200–204, 2000, doi: 10.1054/bjps.1999.3268.
- [8] L. Shor et al., "Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering," *Biofabrication*, vol. 1, no. 1, 2009, doi: 10.1088/1758-5082/1/1/015003.
- [9] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, and A. P. Tomsia, "Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 31, no. 7, p. 1245, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.MSEC.2011.04.022.
- [10] "The Williams Dictionary of Biomaterials - D. F. Williams - Google Libros." [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Hv45B7P5N3gC&oi=fnd&pg=PR5&ots=hPoU\\_jo3Xn&sig=f6ahRdDh0louKDaLbCXo4mwlZak&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Hv45B7P5N3gC&oi=fnd&pg=PR5&ots=hPoU_jo3Xn&sig=f6ahRdDh0louKDaLbCXo4mwlZak&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (accessed Apr. 03, 2021).
- [11] E. Fávaro-Pípi et al., "Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats," *Photomed Laser Surg*, vol. 29, no. 5, pp. 311–317, May 2011, doi: 10.1089/pho.2010.2841.
- [12] F. Wang, X. Cai, Y. Shen, and L. Meng, "Cell–scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction," *Bioact Mater*, vol. 23, pp. 16–44, May 2023, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2022.10.029.

- [13] F. Baino and C. Vitale-Brovarone, "Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future," *J Biomed Mater Res A*, vol. 97 A, no. 4, pp. 514–535, Jun. 2011, doi: 10.1002/JBM.A.33072.
- [14] R. Li, A. E. Clark, and L. L. Hench, "An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing," *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 2, no. 4, pp. 231–239, Dec. 1991, doi: 10.1002/JAB.770020403.
- [15] E. Filová et al., "Support for the initial attachment, growth and differentiation of MG-63 cells: a comparison between nano-size hydroxyapatite and micro-size hydroxyapatite in composites," *Int J Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 3687–3706, Aug. 2014, doi: 10.2147/IJN.S56661.
- [16] E. A. Aguilar-Reyes, C. A. León-Patiño, B. Jacinto-Diaz, and L. P. Lefebvre, "Structural Characterization and Mechanical Evaluation of Bioactive Glass 45S5 Foams Obtained by a Powder Technology Approach," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 95, no. 12, pp. 3776–3780, Dec. 2012, doi: 10.1111/J.1551-2916.2012.05465.X.
- [17] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials," *J Biomed Mater Res*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, Nov. 1971, doi: 10.1002/JBM.820050611.
- [18] P. S. P. Poh, D. W. Hutmacher, M. M. Stevens, and M. A. Woodruff, "Fabrication and in vitro characterization of bioactive glass composite scaffolds for bone regeneration," *Biofabrication*, vol. 5, no. 4, p. 045005, Nov. 2013, doi: 10.1088/1758-5082/5/4/045005.
- [19] I. Farooq, Z. Imran, U. Farooq, A. Leghari, and H. Ali, "Bioactive Glass: A Material for the Future," *World Journal of Dentistry*, vol. 3, no. 2, pp. 199–201, doi: 10.5005/jp-journals-10015-1156.
- [20] L. L. Hench, "Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications," *New Journal of Glass and Ceramics*, vol. 03, no. 02, pp. 67–73, 2013, doi: 10.4236/NJGC.2013.32011.
- [21] L. Jonasova, A. Helebrant, and S. Ludvik, "The influence of simulated body fluid composition on carbonated hydroxyapatite formation," *Ceramics Silikaty*, 2002, Accessed: Nov. 22, 2022. [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/282061103\\_The\\_influence\\_of\\_simulated\\_body\\_fluid\\_composition\\_on\\_carbonated\\_hydroxyapatite\\_formation](https://www.researchgate.net/publication/282061103_The_influence_of_simulated_body_fluid_composition_on_carbonated_hydroxyapatite_formation)
- [22] N. Salahuddin, E. M. Ibrahim, and M. El-Kemary, "Different Methods for Preparation of Hydroxyapatite Nanostructures," *Biointerface Res Appl Chem*, vol. 13, no. 3, p. 236, Jun. 2022, doi: 10.33263/BRIAC133.236.
- [23] C. Qi, Y. J. Zhu, G. J. Ding, J. Wu, and F. Chen, "Solvothermal synthesis of hydroxyapatite nanostructures with various morphologies using adenosine 5'-monophosphate sodium salt as an organic phosphorus source," *RSC Adv*, vol. 5, no. 5, pp. 3792–3798, Dec. 2014, doi: 10.1039/C4RA13151G.
- [24] X. Bai, M. Gao, S. Syed, J. Zhuang, X. Xu, and X. Q. Zhang, "Bioactive hydrogels for bone regeneration," *Bioact Mater*, vol. 3, no. 4, pp. 401–417, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2018.05.006.

- [25] “Injertos sustitutos no óseos: Aportaciones del ácido poliláctico y poliglicólico.” [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1699-65852009000100006](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852009000100006) (accessed Dec. 08, 2022).
- [26] T. Serra, M. A. Mateos-Timoneda, J. A. Planell, and M. Navarro, “3D printed PLA-based scaffolds: A versatile tool in regenerative medicine • 3D printed PLA-based scaffolds • A versatile tool in regenerative medicine,” *Organogenesis*, vol. 9, no. 4, p. 239, Oct. 2013, doi: 10.4161/ORG.26048.
- [27] T. Kokubo, “Bioactive glass ceramics: properties and applications,” *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155–163, Mar. 1991, doi: 10.1016/0142-9612(91)90194-F.
- [28] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.017.
- [29] J. R. Jones, “Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids,” *Acta Biomater*, vol. 23 Suppl, no. S, pp. S53–S82, Sep. 2015, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2015.07.019.
- [30] A. Rámila and M. Vallet-Regí, “Static and dynamic in vitro study of a sol-gel glass bioactivity,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 16, pp. 2301–2306, Aug. 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00419-1.
- [31] D. M. Sanders, W. B. Person, and L. L. Hench, “Quantitative Analysis of Glass Structure with the Use of Infrared Reflection Spectra,” <http://dx.doi.org/10.1366/000370274774332623>, vol. 21, no. 3, pp. 247–255, Aug. 2016, doi: 10.1366/000370274774332623.
- [32] J. Serra et al., “FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses,” *JNCS*, vol. 332, no. 1, pp. 20–27, Dec. 2003, doi: 10.1016/J.JNONCRY SOL.2003.09.013.
- [33] V. I. Macías Andrés, “Estudio de bioactividad in vitro de espumas de biovidrio 45S5 producidas por tecnología de polvos para aplicaciones en regeneración ósea,” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, 2016. Accessed: Feb. 04, 2023. [Online]. Available: [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB\\_UMICH/1309/IIMM-D-2016-1330.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/1309/IIMM-D-2016-1330.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [34] L. Lefebvre et al., “Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments,” *Acta Mater*, vol. 55, no. 10, pp. 3305–3313, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.ACTAMAT.2007.01.029.
- [35] O. Bretcanu, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos, R. Conradt, I. Thompson, and A. R. Boccaccini, “Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder,” *J Eur Ceram Soc*, vol. 29, no. 16, pp. 3299–3306, Dec. 2009, doi: 10.1016/J.JEURCERAMSOC.2009.06.035.
- [36] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, and L. L. Hench, “Highly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics,” *J Non Cryst Solids*, vol. 292, no. 1–3, pp. 115–126, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0022-3093(01)00822-5.
- [37] M. Vallet-Regí, A. M. Romero, C. Ragel, and R. Legeros, “XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses,” *J Biomed Mater Res*, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19990315)44:4.

- [38] M. R. T. Filgueiras, G. la Torre, and L. L. Hench, "Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions," *J Biomed Mater Res*, vol. 27, no. 12, pp. 1485–1493, 1993, doi: 10.1002/JBM.820271204.
- [39] Q. Chen, J. Roether, and A. Boccaccini, "Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials," *Materials Science*, 2008.
- [40] J. F. Steffe, "Rheological Methods in Food Process Engineering," in *Agricultural Engineering*, vol. 23, no. 2, 1996, pp. 1–412. Accessed: Feb. 05, 2023. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0260877494900906>
- [41] M. Elleuch, S. Besbes, O. Roiseux, C. Blecker, and H. Attia, "Quality characteristics of sesame seeds and by-products," *Food Chem*, vol. 103, no. 2, pp. 641–650, 2007, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2006.09.008.
- [42] H. Kiani, S. M. A. Mousavi, and Z. Emam-Djomeh, "Rheological properties of Iranian yoghurt drink, Doogh," *International Journal of Dairy Science*, vol. 3, no. 2, pp. 71–78, 2008, doi: 10.3923/IJDS.2008.71.78.
- [43] B. W. Towler, A. Cunningham, P. Stoodley, and L. McKittrick, "A model of fluid–biofilm interaction using a Burger material law," *Biotechnol Bioeng*, vol. 96, no. 2, pp. 259–271, Feb. 2007, doi: 10.1002/BIT.21098.
- [44] E. Eseller-Bayat, S. Gokyer, M. K. Yegian, R. O. Deniz, and A. Alshawabkeh, "Bender elements and bending disks for measurement of shear and compression wave velocities in large fully and partially saturated sand specimens," *Geotechnical Testing Journal*, vol. 36, no. 2, Mar. 2013, doi: 10.1520/GTJ20120024.
- [45] M. D. Vlad, S. Gómez, M. Barracó, J. López, and E. Fernández, "Effect of the calcium to phosphorus ratio on the setting properties of calcium phosphate bone cements," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 23, no. 9, pp. 2081–2090, Sep. 2012, doi: 10.1007/S10856-012-4686-3/METRICS.
- [46] E. Zeimaran, S. Pourshahrestani, I. Djordjevic, B. Pingguan-Murphy, N. A. Kadri, and M. R. Towler, "Bioactive glass reinforced elastomer composites for skeletal regeneration: A review," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 53, pp. 175–188, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.MSEC.2015.04.035.
- [47] L. C. Gerhardt and A. R. Boccaccini, "Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Materials*, vol. 3, no. 7, p. 3867, 2010, doi: 10.3390/MA3073867.
- [48] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, and A. P. Tomsia, "Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 31, no. 7, pp. 1245–1256, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.MSEC.2011.04.022.
- [49] M. N. Rahaman et al., "Bioactive glass in tissue engineering," *Acta Biomater*, vol. 7, no. 6, pp. 2355–2373, 2011, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2011.03.016.
- [50] Q. L. Loh and C. Choong, "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size," *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, Dec. 2013, doi: 10.1089/TEN.TEB.2012.0437.

- [51] M. Domingos et al., "Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds," *Acta Biomater*, vol. 9, no. 4, pp. 5997–6005, 2013, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.12.031.
- [52] M. Domingos, F. Chiellini, A. Gloria, L. Ambrosio, P. Bartolo, and E. Chiellini, "Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly(1-caprolactone) scaffolds," *Rapid Prototyp J*, vol. 18, no. 1, pp. 56–67, 2012, doi: 10.1108/13552541211193502/FULL/XML.
- [53] A. R. Costa-Pinto, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan," *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 17, no. 5, pp. 331–347, Oct. 2011, doi: 10.1089/TEN.TEB.2010.0704.
- [54] S. Saravanan, R. S. Leena, and N. Selvamurugan, "Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering," *Int J Biol Macromol*, vol. 93, no. Pt B, pp. 1354–1365, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2016.01.112.
- [55] J. S. Lee et al., "In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration," *Int J Biol Macromol*, vol. 67, pp. 360–366, 2014, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2014.03.053.
- [56] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, "Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine," *Biomed Res Int*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/821279.
- [57] F. Beladi, S. Saber-Samandari, and S. Saber-Samandari, "Cellular compatibility of nanocomposite scaffolds based on hydroxyapatite entrapped in cellulose network for bone repair," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 75, pp. 385–392, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.MSEC.2017.02.040.
- [58] A. A. Altamirano et al., "Biocompatibility of Nanofibrous Scaffolds with Different Concentrations of PLA/Hydroxyapatite," *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, vol. 18, no. 3, pp. 39–50, Oct. 2016, doi: 10.15517/IJDS.V010.25987.
- [59] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-generation biomedical materials," *Science*, vol. 295, no. 5557, Feb. 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1067404.
- [60] L. L. Hench, "Bioceramics," in *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 81, no. 7, John Wiley & Sons, Ltd, 1998, pp. 1705–1728. doi: 10.1111/J.1151-2916.1998.TB02540.X.
- [61] C. J. Little, N. K. Bawolin, and X. Chen, "Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs," *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 17, no. 4, pp. 213–227, Aug. 2011, doi: 10.1089/TEN.TEB.2010.0572.
- [62] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: state of the art and future trends," *Macromol Biosci*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, Aug. 2004, doi: 10.1002/MABI.200400026.
- [63] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2363–2378, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00030-9.

---

[64] M. O. Al-Barqawi, B. Church, M. Thevamaran, D. J. Thoma, and A. Rahman, "Design and Validation of Additively Manufactured Metallic Cellular Scaffold Structures for Bone Tissue Engineering," *Materials* 2022, Vol. 15, Page 3310, vol. 15, no. 9, p. 3310, May 2022, doi: 10.3390/MA15093310.



## ❖ **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**



## 5 CONCLUSIONS

This thesis has led to the following conclusions:

- Bioprinting is a tool with an exponential development, in which new and important discoveries are being made every day. This technology, in a matter of a few years, has undergone an enormous evolution that will continue to grow due to its great possibilities in the field of medical regeneration. Bioprinting therefore represents a revolution in modern medicine due to current and future developments, taking into account the applications that are yet to be discovered.
- The use of materials such as bioglasses and hydroxyapatite can be very interesting in combination with hydrogels, due to their mechanical properties and bioactivity.
- With the methodology developed for the characterisation of hydrogels, which includes techniques such as the sessile drop method, the filament collapse test, the quantitative evaluation of the gelation state and the printing grid test, it is possible to optimise the amount of material used and predict, to a large extent, the behaviour of hydrogels after the bioprinting process, being able to discard those formulations that do not behave well before carrying out the cell inclusion process.
- PCL, due to its high printability, its high strength, its ability to produce bridges without collapsing and its biocompatibility, is the most interesting of all the materials studied.
- From the study of the hydrogels used in this work, it has been found that, although the hydrogels studied are better than thermoplastics in terms of cell viability, they have low mechanical properties to generate biomimetic structures, either because of poor gelation leading to low printability, or because they are unable to generate bridges without collapsing.
- It has been shown that there is a clear linear relationship between the pressure to be applied to the biomaterial at the inlet of the system and the rheological parameter flow consistency index ( $k$ ). There is also a linear relationship between the extrusion time, which in turn is related to the displacement speed of the dispensing head, and the rheological parameter flow behaviour index ( $n$ ).
- Alginate-based hydrogels formulated with crosslinking agent, consisting of 3.5%, 4.0% and 5.0% (w/v) alginate and 3.5% (w/v)  $\text{CaCl}_2$ , show a typical behaviour of a non-Newtonian pseudoplastic fluid. In addition, viscosity and density increase with increasing alginate content. Also, hydrogels with lower alginate content show a higher sensitivity to the pressure applied at the inlet, so that, by increasing the pressure in smaller ranges, they show a higher variation in the extrusion flow, as opposed to what happens with samples with higher alginate content.
- 5% GelMA allowed the realisation of complex structures as it has a high capacity to reproduce structures without causing problems during printing.

- The use of hydrogels provides good cell viability properties by better mimicking the extracellular matrix of the different tissues of the organism, so their improvement and development should be a priority in the study of bioprinting.
- From the above conclusions we can deduce the need to advance in the improvement of hydrogels, in order to match the mechanical properties, and therefore printability, of biocompatible thermoplastics. If this could be achieved, bioprinting could become a reality for today's medicine. This is why the invention resulting from this work achieves:
- An optimisation of the use of resources, a relevant factor for any current economy due to the fact that this technology would be more accessible and studied.
- A standardised process for analysing the biomaterials used in bioprinting, with the aim of obtaining printability and structural capacity values, ensuring sterility conditions for cell viability tests and safeguarding the optimum boundary conditions for the bioprinting process, in order to be able to analyse their potential for use in the bioprinting of biomimetic tissues. In this way, the results of the characterisation process are reproducible and standardisable, ensuring that the same results can be reproduced for the same material regardless of where the test is performed.

## 5.1 Conclusiones

Mediante la realización de esta tesis se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

- La bioimpresión es una herramienta con un desarrollo exponencial, en la que cada día que pasa se realizan nuevos e importantes descubrimientos. Esta tecnología, en cuestión de pocos años, ha sufrido una enorme evolución que se mantendrá al alza debido grandes posibilidades en el campo de la regeneración médica. Por ello, la bioimpresión supone una revolución en la medicina moderna gracias a los avances actuales y futuros, teniendo en cuenta las aplicaciones que aún quedan por descubrir.
- El uso de materiales como los biovidrios y la hidroxiapatita puede ser muy interesante en su combinación con hidrogeles, debido a sus propiedades mecánicas y de bioactividad
- Con la metodología desarrollada para la caracterización de hidrogeles, que incluyen técnicas como el método de gota sésil, el ensayo de colapso de filamentos, la evaluación cuantitativa del estado de gelificación y el ensayo de rejilla de impresión, se consigue optimizar la cantidad de material utilizado y predecir, en gran medida, el comportamiento de los hidrogeles tras el proceso de bioimpresión, pudiendo descartar aquellas formulaciones que no se comportan bien antes de realizar el proceso de inclusión celular.
- El PCL, debido a su alta imprimibilidad, su alta resistencia, su capacidad de producir puentes sin colapsar y su biocompatibilidad, es el más interesante de todos los materiales estudiados.
- A partir del estudio de los hidrogeles utilizados en este trabajo se ha comprobado que, aunque los hidrogeles estudiados son mejores que los termoplásticos en términos de viabilidad celular, tienen propiedades mecánicas bajas para generar estructuras biomiméticas, ya sea por una gelificación deficiente que conduce a una baja imprimibilidad, o porque son incapaces de generar puentes sin colapsarse.
- Se ha comprobado que existe una clara relación lineal entre la presión que debe aplicarse al biomaterial a la entrada del sistema y el parámetro reológico índice de consistencia de flujo ( $k$ ). Asimismo, también existe una relación lineal entre el tiempo de extrusión, relacionado a su vez con la velocidad de desplazamiento del cabezal dispensador, y el parámetro reológico índice de comportamiento de flujo ( $n$ ).
- Los hidrogeles formulados a base de alginato con agente reticulante, compuestos por 3,5%, 4,0% y 5,0% (p/v) de alginato y 3,5% (p/v) de  $\text{CaCl}_2$ , muestran un comportamiento típico de un fluido pseudoplástico no newtoniano. Además, la viscosidad y la densidad aumentan con el incremento de la proporción de alginato. Asimismo, los hidrogeles con menor proporción de alginato presentan una mayor sensibilidad a la presión aplicada en la entrada, por lo que, al aumentar la presión en rangos menores, presentan una mayor variación en el flujo de extrusión, a diferencia de lo que ocurre con las muestras de mayor porcentaje de alginato.
- El GelMA al 5% permitió la realización de estructuras complejas al tener gran capacidad para reproducir estructuras sin causar problemas durante la impresión.

- 
- El uso de hidrogeles proporciona buenas propiedades de viabilidad celular al imitar mejor la matriz extracelular de los diferentes tejidos del organismo, por lo que su mejora y desarrollo debe ser una prioridad en el estudio de la bioimpresión.
  - De las anteriores conclusiones se deduce la necesidad de avanzar en la mejora de los hidrogeles, para igualar las propiedades mecánicas y, por tanto, de imprimibilidad, de los termoplásticos biocompatibles. Si esto se consiguiera, la bioimpresión podría llegar a ser una realidad para la medicina actual. Es por ello que la invención fruto de este trabajo consigue:
    - Una optimización del uso de recursos, factor relevante para cualquier economía actual debido a que esta tecnología sería más accesible y estudiada.
    - Un proceso normalizado para analizar los biomateriales usados en bioimpresión, con el objetivo de obtener valores de imprimibilidad y capacidad estructural, asegurando las condiciones de esterilidad para las pruebas de viabilidad celular y salvaguardando las condiciones de contorno óptimas para el proceso de bioimpresión, para poder analizar su potencial de uso en la bioimpresión de tejidos biomiméticos. De esta forma, los resultados del proceso de caracterización son reproducibles y normalizables, asegurando que esos mismos resultados puedan ser reproducidos para el mismo material con independencia del lugar de realización del ensayo.

## ❖ **CAPÍTULO 6: FINANCIACIÓN OBTENIDA Y LÍNEAS FUTURAS**



## 6 FINANCIACIÓN OBTENIDA Y LÍNEAS FUTURAS

### 6.1 Coste de la investigación

La investigación ha sido financiada por:

- Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER en el marco del programa Interreg VA España - Portugal (POCTEP) 2014-2020, proyecto número 0633\_BIOIMPACTE\_4\_A con una cuantía económica por parte de la Universidad de Extremadura de 632.122,26€.
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) en el marco del proyecto (BIOSIMPRO) con el código 2021/00110/001. Con una cuantía económica de 149.912,40€

## 6.2 Líneas futuras de investigación

Uno de los grandes retos de la bioimpresión es convertirse en una herramienta rutinaria en el campo de la medicina. Para ello necesita en primer lugar un desarrollo de la tecnología para asegurar y normalizar los resultados obtenidos, y en un segundo lugar conseguir una reducción de los costes.

Es por ello que las principales líneas de investigación deben ser:

- Estudio de la tecnología de bioimpresión para conseguir estructuras biomiméticas funcionales para su trasplante en pacientes reales.
- Optimizar el proceso de bioimpresión para mejorar los tiempos de procesamiento y asegurar unas condiciones de viabilidad celular.
- Normalizar el proceso de caracterización y bioimpresión de estructuras biomiméticas, para conseguir que la bioimpresión 3D sea una tecnología aplicable a la medicina actual.
- Estudio de nuevas formulaciones de hidrogeles que aumenten sus propiedades mecánicas y mejoren la supervivencia y posterior diferenciación celular.
- Estudio de la bioimpresión 4D. La cual consiste en la creación de estructuras tridimensionales que son capaces de responder a un estímulo cambiando de forma, color o función, entre otros cambios. Esto es de especial interés en la medicina debido a que estas estructuras podrían formar parte de implantes ortopédicos inteligentes, de métodos que administren fármacos de forma dirigida o de scaffolds inteligentes en ingeniería de tejidos. Esta es la nueva línea de investigación de la bioimpresión, que supondrá grandes avances en la ingeniería biomédica y aportará resultados para problemas actuales sin solución.

A pesar de los grandes avances realizados, los problemas a los que se enfrenta la bioimpresión son el elevado tiempo de procesamiento de las estructuras generadas, las cuales tardan en imprimirse y posteriormente deben mantenerse en unas condiciones muy específicas para tratar de lograr supervivencia celular e integridad estructural, y la incapacidad de crear directamente estructuras dinámicas que se parezcan más a los tejidos vivos del cuerpo, los cuales presentan grandes complejidades.

Es por ello que, además, se prevé la investigación continuada de los diferentes hidrogeles disponibles, de nuevas formulaciones y de las condiciones en las cuales se debe utilizar cada uno, para asegurar las condiciones que mejor aúnen buenas propiedades mecánicas con alta viabilidad celular. En un futuro estos descubrimientos permitirán disminuir el tiempo de impresión al mismo tiempo que se aumenta la viabilidad celular, además de lograr la similitud de los tejidos bioimpresos con los tejidos reales del organismo.