

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**CARACTERIZACIÓN MULTIDIMENSIONAL DE TINTAS DE
BIOMATERIAL PARA MANUFACTURA ADITIVA POR
EXTRUSIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE
INTERÉS BIOMÉDICO**

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Biomédico

AUTOR:

José Luis Martín Cáceres Albán

ASESOR:

Fanny Lys Casado Peña

Lima, Octubre, 2023

Informe de Similitud

Yo, Fanny Lys Casado Peña, profesora principal de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesora de la tesis titulada “Caracterización Multidimensional de Tintas de Biomaterial para Manufactura Aditiva por Extrusión de Estructuras Tridimensionales de Interés Biomédico”,

del autor José Luis Martín Cáceres Albán,

dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 1%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 01/08/2023.
- Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: Lima, 01 de agosto del 2023

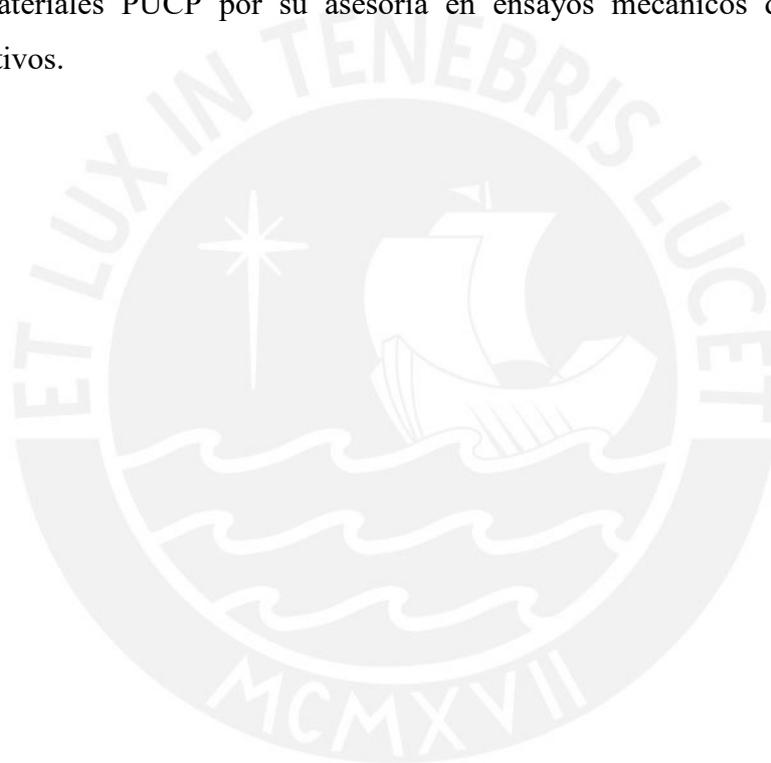
Apellidos y nombres de la asesora: <u>Casado Peña, Fanny Lys</u>	
DNI: 40444557	Firma
ORCID: 0000-0002-8791-626X	

RESUMEN

El presente trabajo muestra la caracterización de tintas de biomaterial empleadas en un sistema de impresión 3D por extrusión y la determinación de su viabilidad de uso para la manufactura de estructuras tridimensionales de interés biomédico. El documento aborda la necesidad de contar con metodologías para analizar de manera objetiva la fidelidad de impresión en sistemas basados en extrusión debido a que existen definiciones no consensuadas en la comunidad científica y estándares no publicados en un campo de estudio en constante evolución. Se sigue una metodología propia para el desarrollo de constructos fabricados bajo el marco de tecnologías de bioimpresión, con énfasis en el preprocesamiento y procesamiento de tres tipos de constructos: vascular, orgánico y para ensayos in vitro. Se sintetizaron ocho tintas de biomaterial a partir de reactivos disponibles en un contexto académico, tales como: la sal sódica de carboximetilcelulosa, el alginato y el cloruro de calcio. Se realizaron ensayos de caracterización para evaluar propiedades de la materia prima como hinchamiento y viscosidad, así como propiedades directamente involucradas al proceso de impresión 3D como formación y homogeneidad de filamento, precisión de impresión e integridad de forma. Los resultados indican que la formulación compuesta por sal sódica de carboximetilcelulosa (20%), alginato (10%) y cloruro de calcio (2%) demuestra el mejor desempeño general en los ensayos de caracterización multidimensional, siendo viable para la impresión por extrusión de las estructuras de interés biomédico propuestas en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero extender un profundo agradecimiento a mi asesora Fanny Casado, quien con sus conocimientos y apoyo me guió a través de cada una de las etapas de este trabajo para alcanzar los resultados que buscaba. A Ana Gonzalez de la Sección Bioingeniería y del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada de la PUCP por su apoyo en la etapa experimental de formulación, a Naomi Guevara del programa de Ingeniería Biomédica PUCP-UPCH por su contribución con la implementación de los ensayos de colapso, a Karen N. Gonzales del Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la PUCP por su apoyo con la caracterización reológica, y a Carlos J. Romero del CITEMateriales PUCP por su asesoría en ensayos mecánicos destructivos y no destructivos.





A mis padres por el apoyo, sacrificio,
consejos y ayuda incondicional
durante el transcurso de estos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ESTADO DE LA TECNOLOGÍA	2
1.1 Técnicas de bioimpresión	2
1.2 Biotintas y tintas de biomaterial	7
1.3 Marco normativo y antecedentes	8
PREPROCESAMIENTO DE CONSTRUCTOS FABRICADOS CON INGENIERÍA DE TEJIDOS	10
2.1 Metodología General	10
2.2 Preprocesamiento	10
2.2.1 Diseño Integral	13
2.2.2 Desarrollo	20
MANUFACTURA EMPLEANDO TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS	30
3.1 Procesamiento	30
3.1.1 Diseño Integral	30
3.1.2 Desarrollo	39
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	66
BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Resumen comparativo de siete tipos de técnicas de bioimpresión.
- Tabla 2. Propiedades mecánicas de la vena safena, arteria radial, arteria mamaria interna y la arteria coronaria.
- Tabla 3. Propiedades mecánicas de cartílago auricular humano
- Tabla 4. Formulaciones de tinta de biomaterial propuestas.
- Tabla 5. Comportamiento reológico según el factor de pérdida
- Tabla 6. Resumen de ensayos de caracterización reológica
- Tabla 7. Propiedades viscoelásticas del hidrogel de carboximetilcelulosa al 15%
- Tabla 8. Características reológicas principales de un hidrogel evaluadas en la formulación de sal sódica de carboximetilcelulosa (15%)
- Tabla 9. Análisis cualitativo del efecto de la presión sobre el grosor del filamento
- Tabla 10. Valores de presión seleccionados para cada formulación
- Tabla 11. Análisis cualitativo del efecto de la velocidad sobre el grosor del filamento
- Tabla 12. Valores de velocidad seleccionados para cada formulación
- Tabla 13. Análisis cualitativo del efecto de la distancia a la plataforma de impresión sobre el grosor del filamento.
- Tabla 14. Ensayo de fusión de filamento
- Tabla 15. Ensayo de colapso de filamento

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de documentos académicos publicados sobre bioimpresión entre los años 1998 y 2020

Figura 2. Técnicas de bioimpresión y sus principios de funcionamiento

Figura 3. Metodología de elaboración de un constructo bajo el marco de tecnologías de bioimpresión 3D compuesta por la fase de diseño integral (consideraciones y selección) y de desarrollo (ejecución)

Figura 4. Síntesis de sal sódica de carboximetilcelulosa (NaCMC), adaptado de (Zennifer, 2021).

Figura 5. Diseños 3D renderizados de los constructos en proyección ortogonal

Figura 6. Disolución de colágeno: solución de ácido acético y colágeno en polvo sobre un agitador magnético

Figura 7. Formulación de hidrogel de carboximetilcelulosa. Se muestra la cantidad empleada pesada en la balanza analítica

Figura 8. Reómetro (Discovery-HR1) TA Instruments del Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales

Figura 9. Muestra de hidrogel de carboximetilcelulosa al 15% w/v empleada en el estudio reológico y desarrollo del ensayo.

Figura 10. Curva de viscosidad vs velocidad de corte en ensayos de reología del hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v

Figura 11. Evolución de G' y G'' en función al barrido de deformación aplicado al hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v

Figura 12. Evolución de G' y G'' en función de la frecuencia angular del hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v

Figura 13. Tasa de hinchamiento de las formulaciones propuestas bajo agua destilada a temperatura ambiente (25 C°) respecto al tiempo transcurrido (15 y 30 min).

Figura 14. Esquema del flujo de evaluación de la fidelidad de impresión de biotintas o tintas de biomaterial para bioimpresión basada en extrusión

Figura 15. Geometría utilizada para el ensayo de variación de velocidad y variación de presión (medidas en mm)

Figura 16. Geometría utilizada para el ensayo de variación de distancia entre el cabezal y la plataforma (medidas en mm)

Figura 17. Geometrías utilizadas para el ensayo de fusión de filamento (medidas en mm). Vista superior de: (a) primera y tercera capa, (b) segunda y cuarta capa, (c) geometría final.

Figura 18. Ejemplos de posibles resultados del ensayo de fusión de filamento según la geometría del macroporo: redonda ($A_p < 1$), cuadrada ($A_p = 1$) o irregular ($A_p > 1$).

Figura 19. Ejemplos del ensayo de colapso con: (a) filamento ideal y (b) filamento parcialmente colapsado; (c) áreas analizadas para hallar el factor de colapso basadas en los ejemplos (medidas en mm)

Figura 20. Diseño CAD del constructo vascular para el ensayo de integridad de forma (medidas en mm)

Figura 21. Diseño del constructo orgánico para el ensayo de integridad de forma (medidas en mm)

Figura 22. Diseño CAD del constructo para ensayos in vitro para el ensayo de integridad de forma (medidas en mm)

Figura 23. Análisis cuantitativo del efecto de la presión sobre el ancho del filamento

Figura 24. Análisis cuantitativo del efecto de la velocidad sobre el ancho del filamento

Figura 25. Análisis cuantitativo del efecto de la distancia a la cama de impresión sobre el ancho del filamento

Figura 26. Análisis cuantitativo del ensayo de fusión de filamento: Tasa de difusión (%)

Figura 27. Análisis cuantitativo del ensayo de fusión de filamento: Arquitectura de poro

Figura 28. Análisis cuantitativo del ensayo de integridad de forma: colapso de filamento

Figura 29. Impresión con C20A0C2 del constructo vascular planteado.

Figura 30. Impresión con C20A0C2 del constructo orgánico planteado

Figura 31. Impresión con C20A0C2 del constructo para ensayos in vitro planteado

INTRODUCCIÓN

La bioimpresión 3D es una tecnología cuya adopción en el campo de ingeniería de tejidos se ha atribuido a su alto potencial para la manufactura de estructuras biológicas complejas. A diferencia de la impresión 3D convencional, en la bioimpresión se emplean comúnmente hidrogeles como materia prima, estos se caracterizan por su alto contenido de agua, variable densidad de entrecruzamiento y viscoelasticidad. El alcance de las estructuras bioimpresas involucra aplicaciones clínicas y de laboratorio, como el reemplazo o la reparación de regiones anatómicas dañadas o ausentes, el desarrollo de fármacos, tratamientos farmacológicos personalizados, entre otras. En ese sentido, ante la amplia gama de hidrogeles formulados con distintos tipos de biomateriales en una variedad de concentraciones, es importante establecer una metodología de caracterización que permita mitigar la inherente complejidad de definir parámetros de impresión a través de ensayos iterativos, subjetivos y cualitativos de tal manera que se maximice la reproducibilidad y la fidelidad geométrica entre el constructo y su diseño asociado.

El presente trabajo tiene como finalidad caracterizar tintas de biomaterial empleadas en un sistema de impresión 3D por extrusión y determinar su viabilidad de uso para la manufactura de estructuras tridimensionales relevantes para aplicaciones biomédicas. Se analizan las propiedades físicas, reológicas y la fidelidad de impresión de una serie de formulaciones de tintas de biomaterial. En base a ello, se plantean condiciones de impresión para maximizar la fidelidad geométrica de las estructuras impresas y se compara el rendimiento de las formulaciones para determinar cuál es la más adecuada para imprimir estructuras frecuentemente usadas en el tratamiento de patologías vasculares, malformaciones auriculares, y en el estudio in vitro de procesos fisiológicos.

La madurez tecnológica alcanzada es de nivel 3 de complejidad, involucrando investigación básica, especificaciones de los componentes críticos, el desarrollo de los ensayos de caracterización asociados y pruebas de concepto preliminares en un entorno controlado¹.

¹ Departamento de Defensa. Technology Readiness Assessment (TRA) Deskbook
<https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/ADA418881.pdf>

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ESTADO DE LA TECNOLOGÍA

En el presente capítulo se expone inicialmente una breve introducción conceptual, la cual es necesaria para el entendimiento teórico e interpretación de la problemática y del problema a abordar enunciados posteriormente. Se describe la evolución académica del campo de bioimpresión, las principales técnicas, biotintas y tintas de biomaterial con sus agentes entrecruzantes. Se analiza desde un enfoque general la problemática complementada con el marco normativo actual para definir el problema específico referente al análisis y caracterización subjetivos para la determinación de parámetros de impresión de materiales biológicos abordado en este documento de tesis.

1.1 Técnicas de bioimpresión

Durante las últimas dos décadas y media, se ha venido realizando investigación sustancial referente al campo de bioimpresión 3D incluyendo más de sesenta y cinco mil documentos publicados entre artículos, revisiones, capítulos de libro y artículos de conferencias que en conjunto describen un crecimiento exponencial (Figura 1).

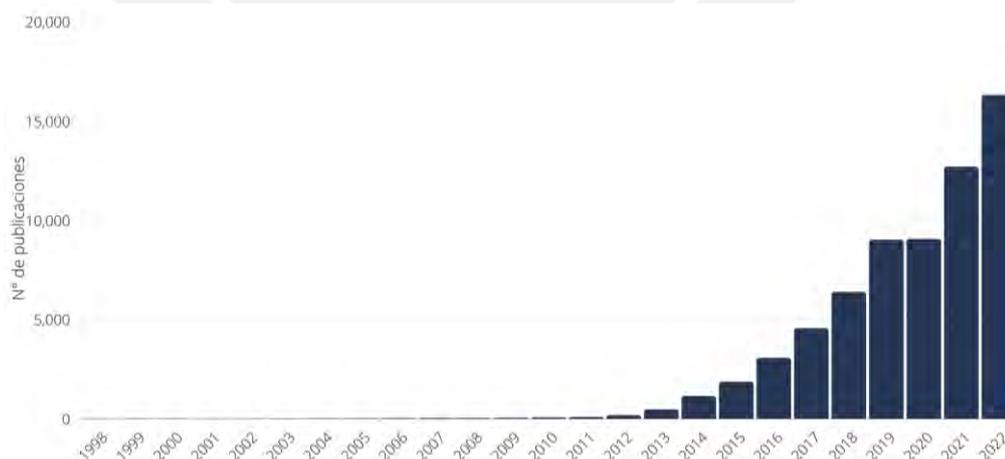


Figura 1. Evolución de documentos académicos publicados sobre bioimpresión entre los años 1998 y 2020, utilizando el comando de búsqueda: (“3D BIOPRINTING” OR (“3D PRINTING” AND CELLS)), según métrica de Scopus.

Esto va de la mano con la evolución de la industria especializada en el campo, que ha emergido con el desarrollo de equipos avanzados como bioimpresoras de alta precisión, de capacidad multimaterial o de alta velocidad (Ozolat, 2017). En ese sentido, existen diversas técnicas de bioimpresión con distintos niveles de complejidad que permiten producir estructuras según el uso previsto, ya sea de tamaño clínicamente relevante o a escala micrométrica. Se tienen técnicas convencionales que han sido adoptadas ampliamente en el sector comercial y en la comunidad científica debido al respaldo de investigaciones reportadas y la constante mejora de las tecnologías que dirigen sus mecanismos de funcionamiento, estas son las basadas en extrusión, goteo (o inkjet), transferencia inducida por láser y estereolitografía. Además, el constante crecimiento del campo ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas que complementan a las técnicas tradicionales y extienden el espectro de áreas de aplicación como la sonolitografía, la volumétrica y la asistida por aspiración. En general, cada técnica involucra diversos enfoques respecto a sus principios de impresión, los cuales están ligados a ciertas ventajas y limitaciones. La Tabla 1 detalla las características principales de siete técnicas de bioimpresión desarrolladas a la fecha y la Figura 2 ejemplifica los principios de funcionamiento de las mismas.

Tabla 1. Resumen comparativo de siete tipos de técnicas de bioimpresión.

Técnica	Principio de impresión	Contacto directo con materia prima	Ventajas	Limitaciones	Referencias
Extrusión	<ul style="list-style-type: none"> Mecánico o neumático Material se deposita en forma cilíndrica capa por capa 	Si	<ul style="list-style-type: none"> Compatible con hidrogeles de alta viscosidad ($6 \times 10^7 \text{ mPa} \cdot \text{s}$) Versátil, distintas modalidades: FRESH, coaxial, triaxial Fabricable, costo bajo-moderado 	<ul style="list-style-type: none"> Viabilidad celular baja-moderada ($\approx 40-80\%$) Baja velocidad de impresión Resolución moderada (100 μm - milímetros) 	Jiang et al., 2019; Murphy & Atala, 2014; Stuart Kyle et al., 2017
Por goteo	<ul style="list-style-type: none"> Térmico o piezoeléctrico Material se deposita en forma de gotas capa por capa 	No	<ul style="list-style-type: none"> Alta velocidad de impresión (1 a 10000 gotas por segundo) Alta resolución ($\approx 20-100 \mu\text{m}$) Alta-moderada viabilidad celular ($>80\%$) Fabricable, costo moderado 	<ul style="list-style-type: none"> Compatibilidad limitada a hidrogeles de baja viscosidad (3.5-12 $\text{mPa} \cdot \text{s}$) Volúmenes de impresión a escala milimétrica 	Kačarević et al., 2018; Knowlton et al., 2015; Mandrycky et al., 2016; Murphy & Atala, 2014
Transferencia directa inducida por láser	<ul style="list-style-type: none"> Térmico (generada por pulsos láser) Material se deposita en forma de gotas capa por capa 	No (sin boquilla)	<ul style="list-style-type: none"> Libre de problemas de bloqueo Alta resolución (pico a micro escala) Alta viabilidad celular ($>95\%$) 	<ul style="list-style-type: none"> Dificultad de operabilidad del sistema Volúmenes de impresión a escala milimétrica Alto costo, oferta reducida 	Keriquel et al., 2017
Estereolitografía	<ul style="list-style-type: none"> Láser Fotopolimerización iterativa de las capas superficiales de un tanque lleno 	Si (sin boquilla)	<ul style="list-style-type: none"> Libre de problemas de bloqueo Alta velocidad ($< 40\,000 \text{ mm/s}$) 	<ul style="list-style-type: none"> Posible daño del material celular por radiación UV Compatibilidad limitada a 	Kumar & Kim, 2020; W. Li et al.,

	de material líquido		<ul style="list-style-type: none"> ● Alta resolución ($\approx 1.2-200 \mu\text{m}$) ● Independiente de la viscosidad del hidrogel 	<ul style="list-style-type: none"> ● hidrogeles fotosensibles ● No permite usar múltiples hidrogeles a la vez ● Alto costo 	2023
Asistida por aspiración	<ul style="list-style-type: none"> ● Neumático ● Traslado y posicionamiento de esferoides 	Si	<ul style="list-style-type: none"> ● Costo efectiva ● Uso simple ● Alta precisión ($\approx 11\%$ con respecto al tamaño del esferoide) ● Alta-moderada viabilidad celular ($>80\%$) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Baja efectividad de tiempo de impresión de volúmenes clínicamente relevantes ● No compatible con hidrogeles 	Ayan et al., 2020; Daly et al., 2021
Volumétrica	<ul style="list-style-type: none"> ● Proyección de patrones 2D (calculados por transformada de Radon) ● Fotopolimerización sincrónica de un volumen selectivo dentro de un tanque de material líquido 	No (sin boquilla)	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta viabilidad celular ($>85\%$) ● Creación de estructuras complejas ● Muy alta velocidad de impresión (decenas de segundos) de constructos a escala centimétrica ● Alta resolución ($\approx 33 \mu\text{m}$) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Compatibilidad limitada a hidrogeles fotosensibles ● No permite usar múltiples hidrogeles a la vez ● Oferta comercial reducida 	Bernal et al., 2019; Kelly et al., 2019
Sonolitografía	<ul style="list-style-type: none"> ● Fuerzas de radiación acústica ● Redirige la acumulación de partículas en regiones espaciales definidas 	No (sin boquilla)	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta velocidad de creación de patrones (decenas de segundos) ● Amplia variedad geométrica de patrones con el mismo sistema ● Fabricable, bajo costo 	<ul style="list-style-type: none"> ● Limitada a patrones bidimensionales ● Oferta comercial reducida ● No compatible con hidrogeles ni esferoides ● Dependiente de una superficie con capacidad de adherencia celular 	Shapiro et al., 2021

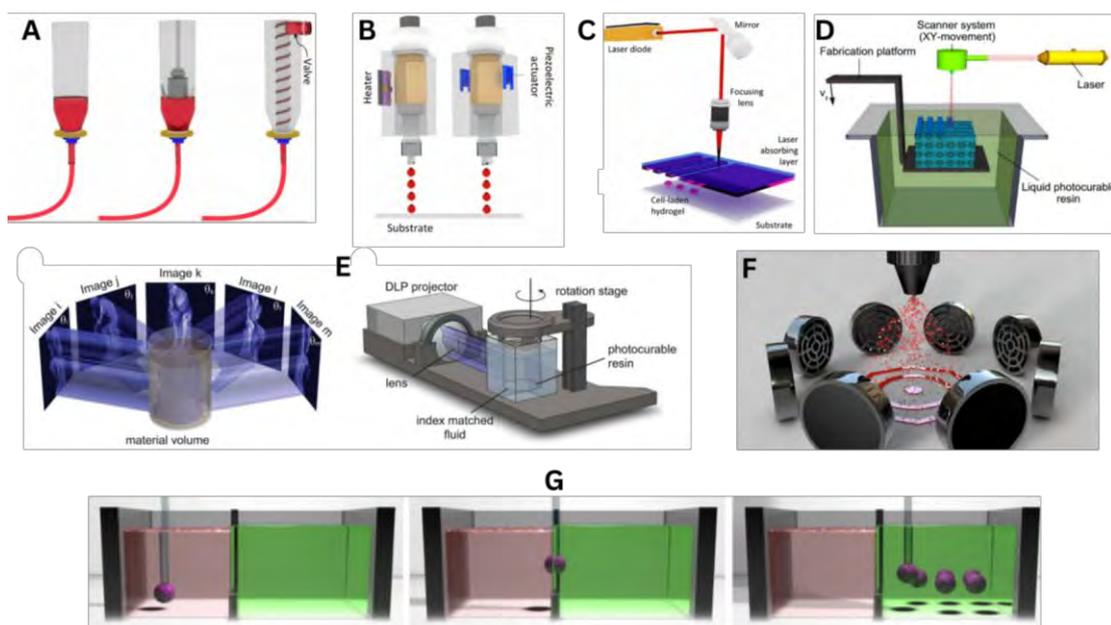


Figura 2. Técnicas de bioimpresión y sus principios de funcionamiento: (A) Extrusión, (B) Por goteo, (C) Transferencia directa inducida por láser (Knowlton et al., 2015), (D) Estereolitografía (Billiet et al., 2012), (E) Volumétrica (Kelly et al., 2019), (F) Sonolitografía (Shapiro et al., 2021), y (G) Asistida por aspiración (Daly et al., 2021).

1.2 Biotintas y tintas de biomaterial

El material adecuado para la bioimpresión, conocido como biotinta, está definido como una formulación de células apta para ser procesada por una tecnología de biofabricación automatizada que además puede contener componentes biológicamente activos y biomateriales (Groll et al., 2018). El componente indispensable en una biotinta es el material celular (por ejemplo, células individuales o agregados celulares), el cual puede estar embebido en un elemento de mezcla opcional (por ejemplo, matriz descelularizada o hidrogeles). Por otro lado, la tinta de biomaterial está definida como un material que también puede procesarse mediante las técnicas mencionadas, sin embargo, esta no contiene células mientras es impresa. Dichas tintas de biomateriales pueden ser empleadas de manera independiente, como para la fabricación de bioreactores o andamios para siembra celular, o en conjunto a las biotintas durante el mismo proceso de impresión como estructuras de sacrificio, donde actúan como soportes mecánicos que evitan el colapso del constructo que ante un estímulo térmico posterior, se disuelven.

Dentro de los materiales más usados destacan polímeros naturales y sintéticos como: alginato, metacrilato de gelatina, gelatina, colágeno, ácido hialurónico, polietilenglicol diacrilado, fibroína de seda, agarosa, metacrilato de ácido hialurónico y fibrina, según lo reportado por un análisis cuantitativo de las últimas dos décadas en el campo (Pedroza-González et al., 2021). Estos materiales, generalmente en forma de hidrogel, suelen pasar por un proceso de entrecruzamiento cuya naturaleza varía dependiendo de la estructura química de cada material pudiendo ser físico, iónico, por radiación no ionizante o enzimático. La reacción de entrecruzamiento modifica directamente las propiedades mecanobiológicas de los polímeros pudiendo reforzar su estabilidad estructural para obtener mejores resultados de impresión, sin embargo, una alta concentración de agente entrecruzante o tiempos de reacción no optimizados, afectan negativamente a la migración, proliferación y viabilidad celular (Malda et al., 2013).

1.3 Marco normativo y antecedentes

La manufactura de estructuras biológicas para aplicaciones biomédicas involucra desafíos según la complejidad de las formas que las caracterizan dado al alto contenido de agua que generalmente compone la materia prima y a las deformaciones a la que esta es sometida durante y después del proceso de bioimpresión. Diversos autores buscan reportar el desempeño exitoso de sus formulaciones de biotintas o tintas de biomaterial a través de evaluaciones cualitativas y subjetivas sin llegar a un consenso sobre la definición del término ‘imprimible’ o ‘fidelidad de impresión’ que utilizan en sus estudios, siendo la más común la inclusión de fotografías macroscópicas de las estructuras impresas.

En ese sentido, la organización SCB¹ cuenta con un proyecto en desarrollo sobre las *Especificaciones para biotintas y bioimpresoras* en colaboración con entidades como ASTM², ASME³, IEEE⁴ y ARMI⁵ donde se detallarán normas asociadas al software, hardware y las biotintas. La aprobación y publicación de dicha normativa pretende estandarizar aspectos que les permitan a los usuarios reproducir los resultados de las pruebas y controlar la calidad de los productos.

Específicamente, la organización de estándares internacionales ASTM¹ a través de su Comité F04 sobre Materiales y Dispositivos Médicos y Quirúrgicos, es la encargada de la norma centrada en un *Nuevo método de ensayo para la imprimibilidad de*

¹Standards Coordinating Body for Gene, Cell, and Regenerative Medicines and Cell-Based Drug Discovery, ²American Society for Testing and Materials, ³American Society of Mechanical Engineers, ⁴Institute of Electrical and Electronics Engineers, ⁵Advanced Regenerative Manufacturing Institute

biotintas y bioimpresión basada en extrusión (ASTM WK72274). Sin embargo, a la fecha, no se han publicado avances de acuerdo a la hoja de ruta trazada¹ dando lugar a un vacío de información que genera ambigüedad en la comunidad científica sobre los métodos adecuados para evaluar la fidelidad de impresión de biotintas.

Ante ello, se han reportado escasas definiciones de ‘imprimibilidad’ o ‘fidelidad de impresión’ (Mandrycky et al., 2016; S. Kyle et al., 2018; Naghieh & Chen, 2021; Murphy & Atala, 2014). El presente trabajo de tesis considera una definición amplia y genérica, propuesta por Gillispie et al. (Gillispie et al., 2020):

‘La capacidad de un material, cuando se somete a un determinado conjunto de condiciones de impresión, para imprimirse de una manera que produzca resultados de impresión deseables para una aplicación dada.’

Esta definición enfatiza la importancia de seguir métodos objetivos para la evaluación de aspectos para determinar la ‘imprimibilidad’ de una biotinta o tinta de biomaterial así como la influencia de los parámetros de impresión y de sus propiedades inherentes durante el proceso, independientemente la técnica que se utilice. De esta manera, se busca formar una base transversal consensuada que mejore el proceso de desarrollo de nuevas biotintas o tintas de biomaterial y que consecuentemente aporte a alcanzar los objetivos de largo plazo del campo de la bioimpresión 3D: la manufactura de tejidos y órganos funcionales para satisfacer la demanda global de trasplantes, y la creación de plataformas in vitro avanzadas para tratamientos de medicina personalizada o para reducir la experimentación con animales utilizados durante el desarrollo de fármacos.

¹Standards Coordinating Body for Gene, Cell, and Regenerative Medicines and Cell-Based Drug Discovery, <https://www.standardscoordinatingbody.org/project-specification-printability-bioink>

CAPÍTULO 2

PREPROCESAMIENTO DE CONSTRUCTOS FABRICADOS CON INGENIERÍA DE TEJIDOS

En el presente capítulo se plantea una metodología para el desarrollo de constructos de interés biomédico fabricados bajo el marco de tecnologías de bioimpresión. Luego, se aborda la etapa de preprocesamiento en donde proponen tres diseños integrales detallando consideraciones y componentes críticos y se desarrolla la síntesis de las formulaciones de tintas de biomaterial candidatas así como los ensayos de caracterización de reología y de hinchamiento asociados.

2.1 Metodología General

Una vez analizados el estado de la tecnología y la normativa asociada a los procesos y biomateriales empleados para bioimpresión 3D, es necesario plantear un diseño integral de lo que se desea manufacturar. Para ello, se propone una metodología de desarrollo de constructos bajo el marco de tecnologías de bioimpresión 3D (Figura 3). Es importante mencionar que la impresión 3D es considerado un método de fabricación en el contexto de la ingeniería de tejidos y no como un método de prototipado rápido que es predominante en otras aplicaciones.

Esta metodología considera distintos enfoques planteados en la literatura (Agarwal et al., 2020; Datta et al., 2018; Varkey et al., 2019) que incluyen a las cuatro etapas conocidas del proceso de bioimpresión conocidas como:

- Preprocesamiento
- Procesamiento
- Posprocesamiento
- Evaluación

Independientemente del tipo de tejido que se desee fabricar y de su aplicación (*in vitro* o *in vivo*), se plantean fases que abordan transversalmente las cuatro etapas:

¹Standards Coordinating Body for Gene, Cell, and Regenerative Medicines and Cell-Based Drug Discovery, <https://www.standardscoordinatingbody.org/project-specification-printability-bioink>

- Fase de Diseño Integral
- Fase de Desarrollo

En la Fase de Diseño Integral se realiza la definición de las consideraciones o requerimientos necesarios de cada etapa y, en base a ellos, se realiza la selección de componentes, técnica(s), condiciones y/o ensayos que cumplan con los mismos para que finalmente estos sean efectuados experimentalmente en la Fase de Desarrollo dando lugar a los productos finales de cada etapa.

El alcance de la presente tesis abordará las etapas de preprocesamiento y procesamiento bajo el enfoque de desarrollo de constructos frecuentemente encontrados en aplicaciones biomédicas, tales como:

- 1. Constructo vascular:** representa injertos vasculares para reemplazar o reparar vasos sanguíneos, forma genérica de estructura tubular
- 2. Constructo orgánico:** representa injertos diversos para procedimientos reconstructivos cuya forma genérica varía según la afección (oreja, nariz)
- 3. Constructo para ensayos in vitro:** representa un ejemplo de plataforma para realizar ensayos in vitro, estas describen canales o compartimentos donde generalmente interaccionan fluidos líquidos y/o gaseosos con material celular, forma genérica de paralelepípedo.



Figura 3. Metodología de elaboración de un constructo bajo el marco de tecnologías de bioimpresión 3D compuesta por la fase de diseño integral (consideraciones y selección) y de desarrollo (ejecución)

¹Standards Coordinating Body for Gene, Cell, and Regenerative Medicines and Cell-Based Drug Discovery, <https://www.standardscoordinatingbody.org/project-specification-printability-bioink>

2.2 Preprocesamiento

La etapa de preprocesamiento tiene como productos finales la generación del modelo 3D del constructo y la formulación o síntesis de una o varias biotintas o tintas de biomaterial de ser necesario.

2.2.1 Diseño Integral

La fase de diseño integral permite identificar los requerimientos mecánicos, biológicos y estructurales de lo que se desea bioimprimir y luego, seleccionar los componentes constituyentes de la materia prima tales como células y polímeros; así como determinar las características geométricas que tendrá el constructo que incluyan su dimensionalidad y morfología, que se espera que todas en conjunto cumplan con los requerimientos identificados.

Con la finalidad de proponer un diseño conceptual, se consideran ciertos requerimientos y características que describen los elementos críticos principales y secundarios de los constructos. A continuación se presenta de manera detallada los requerimientos a tomar en cuenta para el presente diseño:

- **Integridad** **estructural**

La integridad estructural de los constructos propuestos, asociada a sus propiedades mecánicas, debe permitir que estos sean manipulados durante aplicaciones in vivo (procedimientos quirúrgicos) como in vitro (laboratorio) manteniendo su tamaño y forma:

Se considera que los injertos vasculares deben contar con capacidad de suturabilidad con vasos sanguíneos adyacentes, en la Tabla 2 se describen las propiedades de los vasos nativos que comúnmente se utilizan como injertos según la patología existente: vena safena, arteria radial, arteria mamaria interna o arteria coronaria.

Tabla 2. Propiedades mecánicas de la vena safena, arteria radial, arteria mamaria interna y la arteria coronaria (Bouchet, 2019; Laurent, 1994; Montini-Ballarín, 2016; Stekelenburg, 2009)

Tipo de vaso sanguíneo	Módulo de Young (MPa)	Retención de sutura (gramo-fuerza)
Vena safena	4.2 (circ)	196±2
	23.7 (long)	
Arteria radial	2.68 (NA)	144±56
Arteria mamaria interna	8.0 (circ)	138±50
	16.8 (long)	
Arteria coronaria	NA	200±119

En relación al constructo orgánico planteado, en su mayoría describen regiones anatómicas expuestas a la superficie compuestas principalmente por cartílago, como la oreja. Dicha estructura suele comprometerse por enfermedades congénitas como la microtia o amputaciones parciales debido a tumores faciales. La Tabla 3 describe las propiedades mecánicas del colágeno tipo II, componente principal del cartílago elástico, el cual se caracteriza por proveer estabilidad y alta capacidad de flexibilidad.

Tabla 3. Propiedades mecánicas de cartílago auricular humano

Tipo de cartílago	Tensión de rotura (MPa)	Alargamiento a la rotura (%)	Módulo de Young (MPa)
Auricular Humano	2.02	40.62	5.02

Por otro lado, se tiene en cuenta que las plataformas para ensayos in vitro se someten a ciclos iterativos de ensayos y manipulación recurrente. Dichas plataformas cuentan con uno o varios canales que pueden estar interconectados entre sí para configurar el transporte y el control de los fluidos según su

aplicación

prevista.

- **Biocompatibilidad**

En lo que respecta a aplicaciones *in vivo*, la materia prima con la que se elaboran los constructos debe minimizar los riesgos de toxicidad e inflamación para que pueda integrarse en el cuerpo. En caso de contener material celular, este debe ser idealmente de origen humano y autólogo para evitar la inmunogenicidad. Por otro lado, si bien los constructos para ensayos *in vitro* están previstos para aplicaciones con condiciones más controladas, no se descarta el uso de células primarias para reproducir un microambiente más fidedigno al entorno *in vivo*, manteniendo una resistencia a la degradación y corrosión.

- **Biodegradabilidad**

Esta propiedad se enfatiza más en los constructos con aplicaciones *in vivo*. En ellas, el huésped debe poder celularizar y remodelar el microambiente donde sea implantado el constructo para producir una MEC nativa mientras este se degrada gradualmente. La regeneración tisular debe permitir que el constructo crezca y se adapte a la anatomía prevista.

Además de las consideraciones antes mencionadas, existen parámetros importantes que influyen directa o indirectamente en el desempeño del constructo tanto en entornos *in vivo* como *in vitro*, como la permeabilidad, la porosidad (tamaño y conectividad interna), compliancia, presión de rotura, bioactividad y esterilidad; sin embargo, el alcance de la presente tesis no posibilita que sean abordarlos debido a los ensayos para caracterizarlos implican una alta curva de aprendizaje y requieren de parque de equipamiento especializado como microscopio de fluorescencia, microscopio electrónico de barrido, máquina de ensayos biaxiales, etc.

La presente sección busca seleccionar los candidatos más adecuados, en términos de células y/o hidrogeles, para formular biotinta(s) o biotinta(s) de material, así como describir un diseño 3D, que en conjunto satisfagan los requerimientos de los constructos definidos previamente.

a) Células

Los tipos seleccionados representan la mayor población celular en cada una de las regiones anatómicas a donde pertenecen los constructos. Se busca que las poblaciones celulares estén suspendidas en hidrogeles que, además de emular las propiedades de la MEC, las protejan de los esfuerzos cortantes asociados al proceso de bioimpresión que pueden causar la ruptura de sus membranas, impactando en la viabilidad celular del constructo (Hull, 2022).

i) Constructo

vascular

Específicamente se ha identificado a las células endoteliales de arteria umbilical humana (HUAECs, por sus siglas en inglés) como candidatas ideales para conformar el endotelio del constructo. Al igual que las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs, por sus siglas en inglés) que han sido ampliamente empleadas en la bioimpresión de conductos vasculares (Gao, 2018; Hong, 2019; Kim, 2019; Schöneberg, 2018; Yi, 2019), las HUAECs son células representativas de los vasos sanguíneos humanos, sin embargo, se ha reportado que las HUAECs exhiben una mayor expresión de genes arteriales, de marcadores de fenotipo arterial y de factores de crecimiento (Casanello, 2014; Ergonova, 2012; Li, 2020; Régent, 2016; Seo, 2016) lo que las hace determinantes para este tipo de aplicación. Del mismo modo, se ha identificado a las células de músculo liso de arteria umbilical humana (HUASMCs, por sus siglas en inglés) como candidatas ideales para conformar la túnica media del constructo. Las células vasculares de músculo liso son células con alto grado de especialización cuya expresión proteica y su fenotipo varía según el vaso en el que se encuentren. Se ha demostrado que las HUASMCs expresan mayor cantidad de α actina de músculo liso que las células vasculares derivadas de la aorta y de la arteria pulmonar, sugiriendo un fenotipo más contráctil (Régent, 2016), el cual favorece al constructo desarrollado. Tanto las HUAECs como las HUASMCs son aisladas del cordón umbilical, el cual es comúnmente descartado después del parto, por lo que representa una fuente de origen apropiada y sostenible para esta propuesta (de Llano, 2017; Gaggi 2019).

ii) Constructo orgánico

Los condrocitos son el tipo de célula en la formación y mantenimiento de los tejidos cartilagosos. Los condrocitos auriculares (AuCs) están directamente relacionados con el tejido auricular que conforma la estructura externa de la oreja y representan la fuente celular más empleada para la regeneración de cartílago (Y. Li et al., 2019; Xu et al., 2020). Se ha respaldado el uso de este tipo de células especializadas, solas y en conjunto con células madre, en estrategias basadas en ingeniería de tejidos para la producción cartílago auricular humano robusto dentro de constructos tridimensionales (Bernstein et al., 2018; Hou et al., 2021).

iii) Constructo para ensayos in vitro

Si bien los constructos para ensayos in vitro están previstos para aplicaciones in vitro, no se descarta el uso de células primarias para maximizar el realismo de su comportamiento. El tipo de célula dependerá del proceso fisiológico que se desea representar en la plataforma. La tecnología permite distribuir las células en diferentes configuraciones según la cantidad de compartimientos y canales que contenga la plataforma (Caceres-Alban et al., 2023).

b) Biomateriales

En la literatura, se han encontrado biomateriales naturales derivados de proteínas, polisacáridos, y MEC descelularizada como materia prima para el desarrollo de constructos vasculares, orgánicos y para ensayos in vitro (Tomasina et al., 2019), (Fisch et al., 2021). Sin embargo, debido a la naturaleza y función fisiológica de cada tipo de constructo, es relevante proponer distintos tipos para cada caso:

i) Constructo vascular:

El lumen vascular será obtenido empleando un material de sacrificio en forma de hidrogel. El poloxámero Pluronic F127 es un candidato ideal usado ampliamente en el campo para la fabricación de estructuras tubulares por su capacidad de disolverse al aplicar bajas temperaturas ($\sim 4^\circ\text{C}$) (Suntornnond, 2017).

La matriz extracelular de tejido vascular descelularizado representa un candidato adecuado para emplear en forma de hidrogel, ya que simula el microambiente nativo vascular con alto contenido de fibras de colágeno de las capas túnica media y túnica adventicia (Eble & Niland, 2009).

ii) Constructo orgánico

El colágeno tipo 2 es un candidato adecuado para emplear en forma de hidrogel, ya que simula el microambiente nativo alto contenido de fibras de colágeno (Eble & Niland, 2009). Sin embargo, se encontraron limitantes para su uso en la etapa experimental de formulación del hidrogel, las cuales serán detalladas en el presente capítulo.

iii) Constructo para ensayos in vitro

El polidimetilsiloxano (PDMS) es un candidato adecuado debido a que posee propiedades como no toxicidad, buena elasticidad, transparencia óptica, biocompatibilidad, viscoelasticidad y estabilidad térmica y química (Teixeira et al., 2021).

Si bien lo anteriormente expuesto corresponde al diseño de constructos ideales en términos de células y biomateriales, el alcance de la presente tesis se concentrará en la caracterización de los elementos físico-químicos que los componen. Se espera que de acuerdo a los resultados de la evaluación de estos aspectos en este trabajo, futuras investigaciones analizarán los componentes biológicos conformados por las células y biomateriales en forma de gel propuestos. En ese sentido, en términos prácticos y por motivos de disponibilidad de recursos, se emplea una tinta de biomaterial representativa para realizar el análisis de caracterización multidimensional: sal sódica de carboximetilcelulosa.

La celulosa es una macromolécula lineal insoluble al agua que está formada por unidades de anhidroglucosa (AGU, por sus siglas en inglés) unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos. Las modificaciones químicas de los grupos hidroxilo de las AGU permiten que este polisacárido adopte propiedades de solubilidad al agua y procesabilidad (Ergun, 2016), razón por la cual su aplicación se extiende a campos

como la ingeniería de tejidos (Mallakpour, 2021; Zennifer, 2021). La carboximetilcelulosa (CMC) fue el primer éter derivado de la celulosa, es sintetizada por medio de la reacción Williamson-ether (Figura 4), usando materia prima asequible, razón por la cual su producción es asequible en escalas industriales, no limitándose solamente a laboratorios. Se utiliza comúnmente en su presentación de sal sódica (NaCMC). Este polielectrolito aniónico ha sido aprobado por la FDA para su uso como componente activo (o no activo) en aplicaciones farmacéuticas, estomatológicas y de ingeniería de tejidos debido a sus propiedades como biocompatibilidad; bajo costo; hidrofiliicidad; bioactividad; estabilidad en un amplio rango de pH (3-10); biodegradabilidad; promover la adhesión, migración y diferenciación celular; y la adsorción de proteínas en su superficie (Priya, 2021; Turkey, 2021). Por las razones antes expuestas, se considera a la NaCMC en forma de hidrogel un candidato adecuado para la realización de los ensayos de caracterización para cada uno de los constructos.

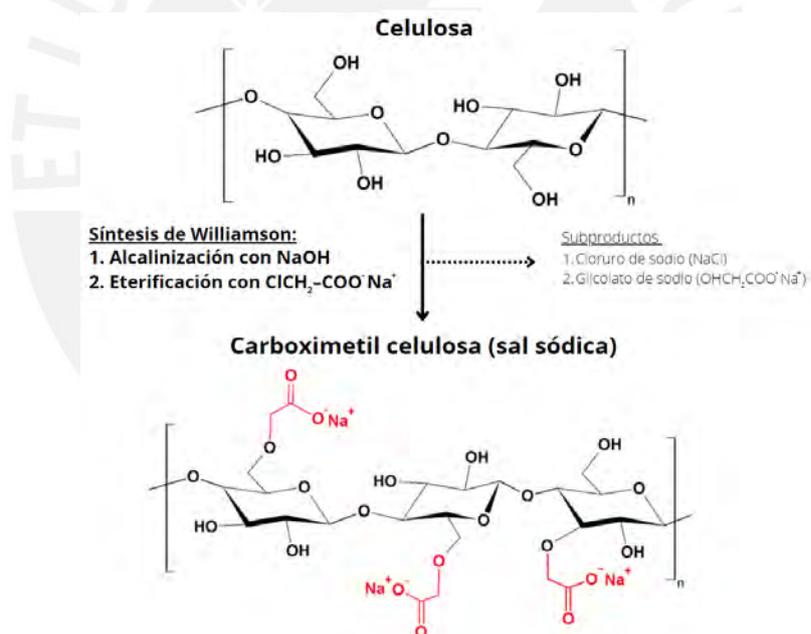


Figura 4. Síntesis de sal sódica de carboximetilcelulosa (NaCMC), adaptado de (Zennifer, 2021).

c) Geometrías

Se emplea el software CAD/CAM/CAE Autodesk® Fusion 360™ para el diseño de los constructos a imprimir.

- i) **Constructo vascular:**
 Forma tubular, recta y uniforme, con un diámetro interno de 6 mm, una longitud de 10 cm y un grosor de pared de 3 mm (Figura 5, izquierda).
- ii) **Constructo para ensayos in vitro:**
 Forma de paralelepípedo de $50 \times 10 \times 3.5 \text{ mm}^3$ con estructura interna hueca de $35 \times 3 \times 3.5 \text{ mm}^3$ con 11 líneas divisorias espaciadas por compartimentos de 2 mm (Figura 5, derecha).

El diseño del constructo orgánico a imprimir se obtuvo de un repositorio en línea¹ donde se comparten de forma gratuita diseños 3D de estructuras anatómicas, protocolos de bioimpresión y otros recursos.

- iii) **Constructo orgánico:**
 Forma de pabellón auricular adulto. a escala 1:2 (Figura 5, central), de dimensiones $30 \times 20 \times 10 \text{ mm}^3$

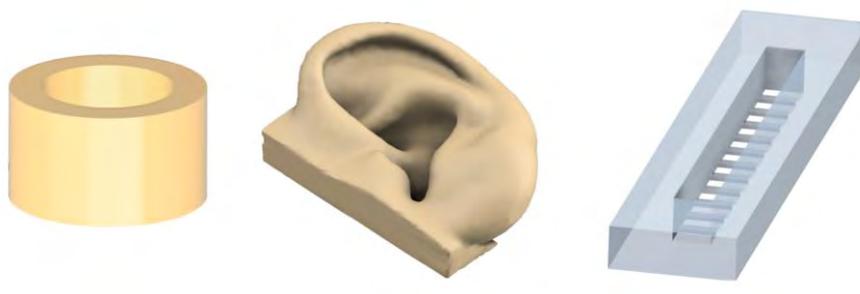


Figura 5. Diseños 3D renderizados de los constructos en proyección ortogonal: vascular (izquierda), orgánico (central) y para ensayos in vitro(derecha)

2.2.2 Desarrollo

La Fase de Desarrollo se enfoca en la síntesis y caracterización de la tinta de biomaterial seleccionada previamente, así como en la exportación del diseño CAD en un formato compatible con la bioimpresora a utilizar.

a) Formulación de las tintas de biomaterial

Se siguió una metodología para la síntesis del hidrogel colágeno encontrada en la literatura (Kwak, 2015) empleando polvo de colágeno tipo 1 de tendón de Aquiles

¹ Bioverse - <https://bioverse.co/>

bovino (C9879, Sigma-Aldrich), esta consistía en la disolución del colágeno en polvo (0.01 %w/v, 0.1 %w/v y 1% w/v) en ácido acético (0.2 M) (Figuras 6a y 6b). Sin embargo, se identificaron limitaciones que no permitieron la formulación exitosa del hidrogel, como por ejemplo: a) el ácido acético que se había estado utilizando estaba en mal estado, b) la marca del colágeno utilizada es una de las más difíciles de disolver, c) la desnaturalización del colágeno al ser sometido a altas temperaturas (mayor a 90°C), y d) hidratación del colágeno y formación de grumos por el largo tiempo (aproximadamente de 180 min) requerido para su disolución (Figuras 6c-e). Por las razones expuestas, se decidió descartar esta alternativa de hidrogel.



Figura 6. Disolución de colágeno: solución de ácido acético y colágeno en polvo sobre un agitador magnético con a) 25 °C y 220 revoluciones por minuto, b) 92 °C y 100 revoluciones por minuto; c-e) colágeno no disuelto después de 4 horas de agitación

A diferencia del colágeno, la formulación del hidrogel a base de NaCMC y del hidrogel a base de alginato fue exitosa. Se empleó NaCMC en forma de polvo con 0.7 grupos carboximetilo por unidad de anhidroglucosa (grado de sustitución o DS) y de peso molecular (Mw) ~90 000 g/mol (419273, Sigma-Aldrich, Inc.). Asimismo, se empleó alginato en forma de polvo derivado de algas marinas, con 1.56 de proporción de ácido

manurónico a ácido gúlico (M/G) y de Mw 120 000-190 000 g/mol (180947, Sigma-Aldrich, Inc.).

Siguiendo la Ec. 2, se prepararon diversas concentraciones de cada tipo de hidrogel utilizando una balanza analítica para la precisión en el pesado y agua destilada como solvente (Figura 7). Se alcanzó un estado homogéneo al mezclar durante 15 minutos de manera manual, se prescindió de un agitador magnético ya que la viscosidad de algunas formulaciones impedía que la pastilla rote.

$$\text{Concentración \% (w/v)} = \frac{\text{masa del soluto (g)}}{\text{volumen de solución (mL)}} \times 100 \quad (2)$$

La presencia de impurezas y burbujas de aire en el hidrogel afecta la fidelidad de impresión (Roehm, 2017). Por ello, el proceso de síntesis antes detallado se realizó en una cabina de bioseguridad (Labculture Esco Clase II, Tipo A2 BSC; Esco Micro Pte Ltd, Singapur), y además, se acopló el matraz que contenía el hidrogel formulado a una manguera conectada a una bomba de vacío que fue accionada para eliminación de burbujas.



Figura 7. Formulación de hidrogel de carboximetilcelulosa. Se muestra la cantidad empleada pesada en la balanza analítica

A partir de estos hidrogeles se plantearon diversas formulaciones de tintas de biomaterial (Tabla 4) sobre las cuales se desarrollarían los ensayos de caracterización reológica y de hinchamiento, así como los ensayos de fidelidad de impresión en el Capítulo 4. Además, se consideró adicionar CaCl_2 para que el ion divalente Ca^{2+} actuara como agente de entrecruzamiento en las cadenas poliméricas. Se le asignó un

color en particular a cada formulación empleando colorantes de grado alimentario para facilitar la visibilidad en los experimentos

Tabla 4. Formulaciones de tinta de biomaterial propuestas.

% (w/v) NaCMC, (C)	% (w/v) Alginato, (A)	% (w/v) CaCl ₂ , (Ca)	Formulación	Color
20	0	0	C ₂₀ A ₀ Ca ₀	Amarillo
		2	C ₂₀ A ₀ Ca ₂	Azul
0	20	0	C ₀ A ₂₀ Ca ₀	Rojo
		2	C ₀ A ₂₀ Ca ₂	Turquesa
20	10	0	C ₂₀ A ₁₀ Ca ₀	Morado
		2	C ₂₀ A ₁₀ Ca ₂	Plata
10	10	0	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₀	Rosa
		2	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₂	Dorado

b) Caracterización reológica

Determinar un perfil reológico del material es importante antes de iniciar con los ensayos de bioimpresión. La viscosidad del material será directamente proporcional a la presión aplicada para su deposición en la plataforma de impresión, lo cual impacta en la viabilidad celular. Sabiendo que para la mayoría de técnicas de bioimpresión el material está sujeto a esfuerzos cortantes antes de ser depositado sobre la plataforma, el comportamiento reológico que se espera encontrar es el que describe una curva no newtoniana ‘shear-thinning’. En este comportamiento, la viscosidad del fluido disminuye con el aumento de la velocidad de corte. Las propiedades reológicas se relacionan con las cadenas poliméricas tridimensionales constituyentes del hidrogel de NaCMC, su estructura molecular, su peso molecular y el grado de sustitución.

Además, el análisis reológico permite identificar su módulo elástico o de almacenamiento (G') y su módulo viscoso o de pérdida (G''). Estos módulos representan físicamente el comportamiento del hidrogel; por un lado, G' representa la energía almacenada temporalmente durante el ensayo que estará disponible después que la carga aplicada sea removida, compensando la deformación inducida; por otro lado, G'' representa la energía perdida del sistema de manera irreversible, ya sea por su uso en los cambios en la estructura interna o siendo disipada en forma de calor. La relación entre estos módulos se define como el factor de pérdida (δ), valor que indica la fracción de energía perdida a partir de la deformación aplicada y determina si el componente elástico o viscoso predomina. El rango de valores oscila en $0 \leq \delta \leq 90^\circ$, dando lugar a los siguientes casos:

Tabla 5. Comportamiento reológico según el factor de pérdida

δ	Comportamiento
≈ 0	Elástico
0-90	Viscoelástico
$\approx 90^\circ$	Viscoso

En la literatura se suele expresar δ en función de su tangente (tangente de pérdida), como la razón entre ambos módulos (Ec. 3):

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (3)$$

Se llevaron a cabo tres ensayos de caracterización reológica que brindan información sobre las variables de interés del hidrogel para su uso previsto como tinta de biomaterial: curva velocidad de corte vs viscosidad, módulo G' y G'' , ver Tabla 6. Se utilizó el reómetro Discovery-HR1 (TA Instruments) del Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) (Figura 8).

Tabla 6. Resumen de ensayos de caracterización reológica

Ensayo reológico	Variables de proceso	Resultado registrado
Barrido de velocidad de corte	Shear rate (s^{-1}): 1-500	Curva de viscosidad vs velocidad de corte, comportamiento 'shear-thinning'
Barrido de deformaciones	Oscillation strain (%): 1-100	Rango de viscoelasticidad lineal (LVR)
Barrido de frecuencia angular	Angular frequency (rad/s): 0.1-100	Módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G''), tangente de pérdida ($\tan\delta$)



Figura 8. Reómetro (Discovery-HR1) TA Instruments del Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales

Se reportan los resultados preliminares de un hidrogel (tinta de biomaterial) de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v, donde se analizaron muestras de 25 mm de diámetro y aproximadamente 3-3.5 mm de espesor (Figura 9), las dimensiones de cada muestra fueron verificadas para minimizar las variaciones.



Figura 9. Muestra de hidrogel de carboximetilcelulosa al 15% w/v empleada en el estudio reológico y desarrollo del ensayo.

La Figura 10 denota un comportamiento donde se evidencia la caída pronunciada de su viscosidad para velocidades de corte mayores a 5 s^{-1} , seguida de una tendencia casi constante de este valor a partir de velocidades de corte mayores a 40 s^{-1} .

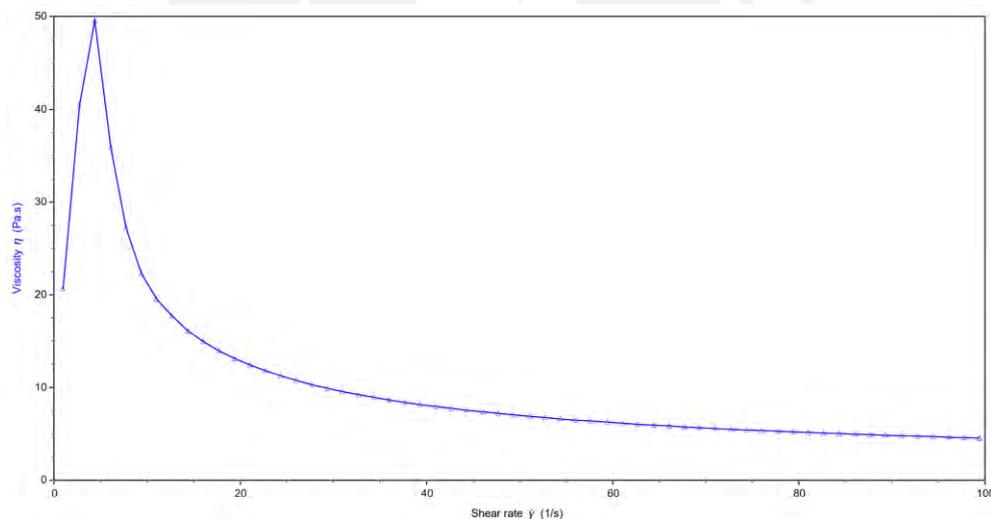


Figura 10. Curva de viscosidad vs velocidad de corte en ensayos de reología del hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v

Por otro lado, se sometió el hidrogel a un barrido de deformación para encontrar su rango de viscoelasticidad lineal (LVR, por sus siglas en inglés) y su valor de deformación crítica (γ_c) para usar luego estos datos en el ensayo oscilatorio de frecuencia. El LVR se determina identificando visualmente el punto del módulo elástico previo a su caída en función a la deformación de cizalla aplicada, mientras que el γ_c se considera como el punto de intersección entre ambos módulos representando

la transición de un comportamiento sólido a líquido (Shih, 1999). En la Figura 11, se puede observar que el módulo G' presenta valores mayores al módulo G'' en todo el rango de deformaciones aplicado, ambos describiendo comportamientos casi constantes. En ese sentido, se considera que todo el conjunto de valores de deformación aplicado pertenece al LVR del material, sin encontrar un γ_c definido.

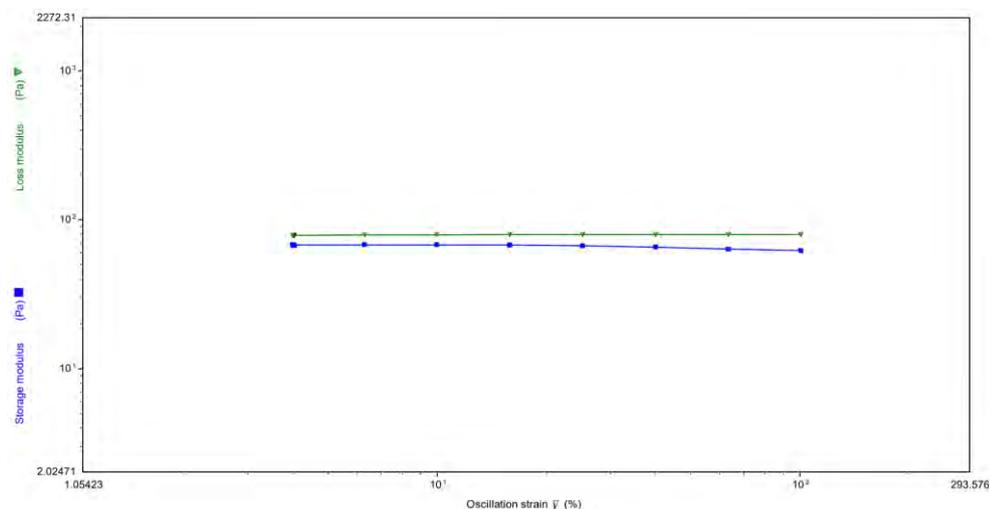


Figura 11. Evolución de G' y G'' en función al barrido de deformación aplicado al hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v

El ensayo de barrido de frecuencia angular se realizó a 25 °C con un valor fijo de deformación al 10% y se encontró que los módulos G' y G'' eran dependientes de las frecuencias aplicadas. Asimismo, se observa que a frecuencias bajas el sistema se comporta predominantemente como un material elástico ($G' > G''$), sin embargo, conforme se aumenta la frecuencia, el hidrogel adopta un comportamiento viscoso predominante ($G'' > G'$) (Figura 12). Se registraron los módulos G' y G'' característicos del hidrogel tomando la mayor frecuencia angular del barrido (62 rad/s) (Tabla 7)

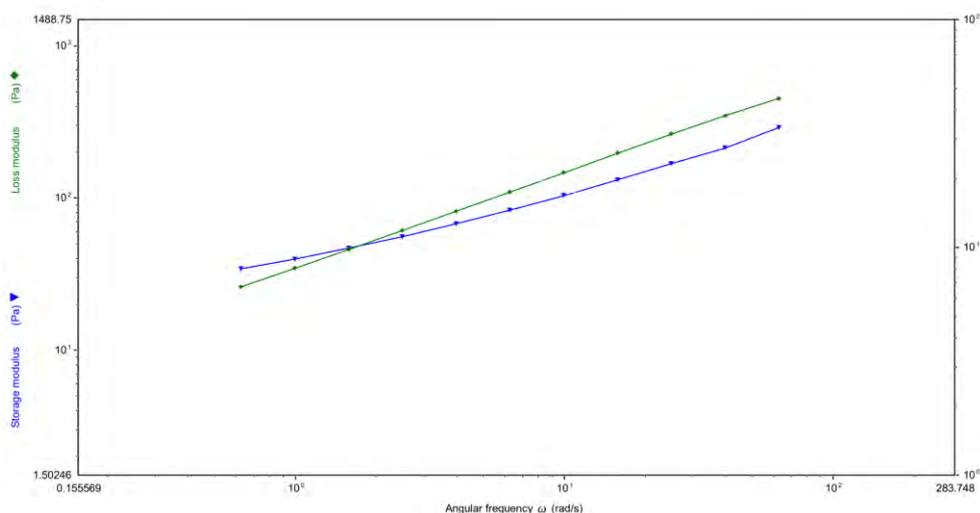


Figura 12. Evolución de G' y G'' en función de la frecuencia angular del hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15% w/v

Tabla 7. Propiedades viscoelásticas del hidrogel de carboximetilcelulosa al 15%

Propiedad	CMC 15%
G' (Pa)	290
G'' (Pa)	451
$\tan(\delta)$	1.56

Al analizar los resultados reológicos, se sustenta que el hidrogel de carboximetilcelulosa al 15%, cumple con dos de tres características deseables en un hidrogel para ser depositado mediante una técnica de extrusión:

Tabla 8. Evaluación de cumplimiento de características reológicas deseables para deposición por extrusión del hidrogel de sal sódica de carboximetilcelulosa (15%).

Hidrogel NaCMC 15%	
Característica	Resultado
La viscosidad aparente disminuye a medida que aumenta la velocidad de corte	Cumple
El módulo G' presenta un valor finito a frecuencias bajas.	Cumple
El factor de pérdida presenta un valor menor a 1	No cumple

Se considera que las formulaciones de tintas de biomaterial propuestas (Tabla 4) pueden incrementar el módulo elástico G' en relación al módulo viscoso G'' y con ello, reducir el factor de pérdida a un valor menor a 1 para satisfacer la característica reológica deseable restante del hidrogel formulado, demostrando su potencialidad para ser imprimible. Esto porque a diferencia de la CMC al 15%, se contemplan diferentes concentraciones, la adición de un agente entrecruzante o la combinación con otro polímero.

c) Caracterización de hinchamiento:

La tasa de hinchamiento se define como el aumento porcentual del peso del hidrogel debido a la absorción de agua. En este ensayo se evaluaron una a una todas las formulaciones propuestas de tintas de biomaterial (Tabla 4) mediante gravimetría. Antes de sumergirlas en medio líquido, se registró el peso de la muestra de hidrogel seco (W_s) a caracterizar utilizando una balanza analítica. Se colocó la muestra en un vaso de precipitado con 40 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se retiró para registrar su peso ($W_{h@15}$) y volverla a sumergir por 15 minutos adicionales y pesarla nuevamente ($W_{h@30}$). Usando la Ec 4., se determina el % de la tasa de hinchamiento de cada hidrogel

$$\text{Tasa de hinchamiento (\%)} = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100 \quad (4)$$

Los resultados en la Figura 13 muestran un incremento de la tasa de hinchamiento de todas las formulaciones en la primera medición gravimétrica, con valores desde 2% ($C_{20}A_0Ca_0$) hasta 31% ($C_{20}A_{10}Ca_2$). Al analizar la segunda medición, se revela que solo para la formulación de $C_{10}A_{10}Ca_2$ el comportamiento continuó con una tendencia incremental, aumentando de 7% a 15%; el resto de los casos describió tasas de hinchamiento que se mantuvieron en valores cercanos al anterior ($C_0A_{20}Ca_2$ y $C_{20}A_{10}Ca_0$) mientras que otros disminuyeron moderadamente ($C_{20}A_{10}Ca_2$ y $C_0A_{20}Ca_0$) e incluso se evidenciaron disminuciones que exhiben pérdidas de masa considerables resultando en pesos menores a los registrados al inicio del ensayo ($C_{20}A_0Ca_0$, $C_{20}A_0Ca_2$ y $C_{10}A_{10}Ca_0$).

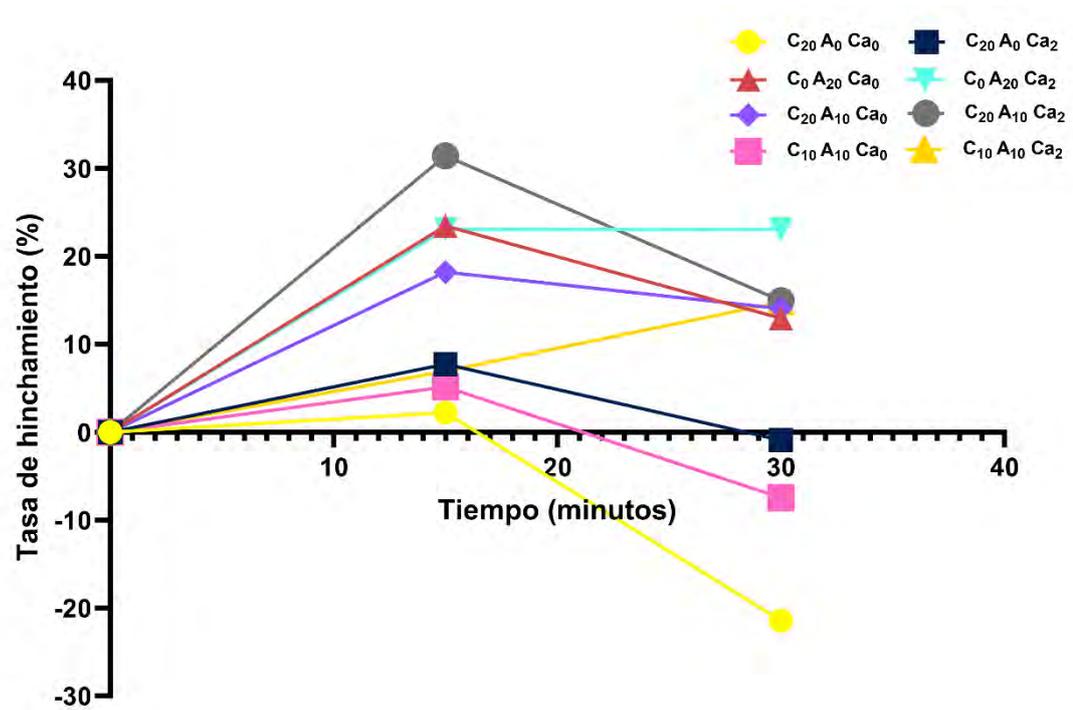


Figura 13. Tasa de hinchamiento de las formulaciones propuestas bajo agua destilada a temperatura ambiente (25 C°) respecto al tiempo transcurrido (15 y 30 min).

CAPÍTULO 3

MANUFACTURA EMPLEANDO TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS

El presente capítulo se centra en la determinación del tipo de técnica de bioimpresión a emplear según las consideraciones definidas en base al enfoque de constructos de tipo vascular, orgánico y para ensayos in vitro. Además, se proponen y desarrollan ensayos de fidelidad de impresión, los cuales son necesarios para evaluar a las formulaciones planteadas y su viabilidad para ser utilizadas en la manufactura de los constructos finales.

3.1 Procesamiento

El procesamiento tiene como productos finales el desarrollo de ensayos de fidelidad de impresión, la determinación de un perfil de parámetros óptimo de bioimpresión según la biotinta(s) o tinta(s) de biomaterial a utilizar y su configuración en el hardware, y finalmente la bioimpresión del constructo final.

3.1.1 Diseño Integral

Actualmente, existen técnicas de bioimpresión tradicionales (Li et al., 2016) y emergentes (Ayan et al., 2020; Bernal et al., 2019; Shapiro et al., 2021) cada una con distintas ventajas y desventajas, por ello, es importante definir previamente los requerimientos de procesamiento para seleccionar la técnica apropiada así como sus parámetros de operación.

Con la finalidad de proponer un proceso de manufactura adecuado para producir los tres tipos de constructos, se consideran ciertos requerimientos y características. A continuación se presenta de manera detallada los requerimientos a tomar en cuenta para seleccionar la técnica adecuada:

- **Habilidad para utilizar dos o más materiales:**

La capacidad multimaterial del método de fabricación permitirá construir la estructura principal de los constructos y las estructuras de soporte necesarias para evitar su colapso.

- **Libertad de generar geometrías complejas**

Las geometrías pueden llegar a alcanzar un nivel de complejidad alto que deben poder ser reproducidas con la técnica adecuada. En el caso del constructo vascular, puede incluir bifurcaciones o formas cónicas (diámetros distal y proximal distintos) mientras que el constructo orgánico incluirá inherentemente patrones curvos anatómicos y zonas voladizas. Por otro lado, el constructo para ensayos in vitro puede contener canales huecos o compartimentos que están embebidos o interconectados.

- **Alta resolución**

Las paredes de las principales arteriales humanas, así como los compartimentos o canales para plataformas in vitro, están en el orden de milímetros, por ello, la resolución milimétrica es importante para posicionar de manera precisa la tinta de biomaterial según la microarquitectura de los diseños preconfigurados.

La presente sección busca seleccionar la técnica de bioimpresión más adecuada para manufacturar cada uno de los constructos propuestos y que satisfaga los requerimientos definidos previamente. A partir de ella, se definen los ensayos de fidelidad de impresión que servirán para encontrar la formulación de tinta de biomaterial óptima y su perfil de parámetros adecuado que se usará para manufacturar los constructos finales.

a) Técnica de bioimpresión:

Se han analizado distintos enfoques para la manufactura de estructuras tubulares, orgánicas y rectangulares empleando modalidades de bioimpresión (Holland, 2018). Entre ellos, se encuentra la modalidad de incrustación reversible de forma libre de hidrogeles en suspensión (FRESH), la cual permite extruir hidrogeles de baja viscosidad en una interfaz hidrogel-hidrogel para formar geometrías complejas permitiendo a su vez alcanzar tamaños clínicamente relevantes; la modalidad Kenzan, la cual se caracteriza por trabajar con esferoides celulares, colocándolos sobre una configuración organizada de microagujas (Kenzan) con diámetro específico y distancias de separación pre-establecidas; la técnica de deposición sobre varilla

rotatoria, en donde se utiliza un elemento en constante rotación que proporciona soporte temporal a la biotinta depositada en sus paredes para formar una estructura 3D cuando es retirado; la modalidad coaxial o triaxial, en donde dos o tres boquillas concéntricas extruyen material simultáneamente siendo el material interno de sacrificio, de manera que al ser removido quede una estructura hueca; y finalmente la modalidad convencional de deposición directa, la cual implica la adición secuencial capa a capa en una interfaz hidrogel-aire. Todas las modalidades antes mencionadas, a excepción de la Kenzan, trabajan bajo el principio de extrusión de material.

La extrusión es la técnica mayor utilizada en el campo de la bioimpresión. A diferencia de otras técnicas de bioimpresión consolidadas como inkjet o asistida por láser, puede utilizar más de un material, generar estructuras complejas y de tamaños clínicamente relevantes, tiene menor costo, permite depositar materiales viscosos y su curva de aprendizaje es menor. Aunque tenga una resolución menor que las otras técnicas (Li, 2021), para este tipo de constructos no representa una limitante, pues la escala micrométrica solo cobra mayor importancia para estructuras que requieren un alto nivel de detalle, como los capilares sanguíneos, los canales microfluídicos de bajo calibre, etc. Por ello, se propone emplear la técnica de extrusión para bioimprimir los constructos, en particular bajo la modalidad convencional de deposición directa.

b) Ensayos de fidelidad de impresión:

Se presenta un enfoque de ensayos cualitativos y cuantitativos que evalúan de manera integral diferentes aspectos de la fidelidad de impresión sobre las cuales las formulaciones propuestas (Tabla 4) fueron sometidas. Entre los aspectos destacan la formación y homogeneidad de filamento, la precisión de impresión y la integridad de forma, siguiendo una escala unidimensional, bidimensional y tridimensional, respectivamente (Figura 14).

Se tomaron imágenes de las estructuras impresas en cada ensayo utilizando una cámara de 25 Mpx inmediatamente después de la impresión para evitar capturar su colapso no deseado. Su posterior análisis de mediciones se realizó con el software ImageJ® (versión 1.53k, National Institutes of Health, Bethesda, MD), a menos que se indique lo contrario.

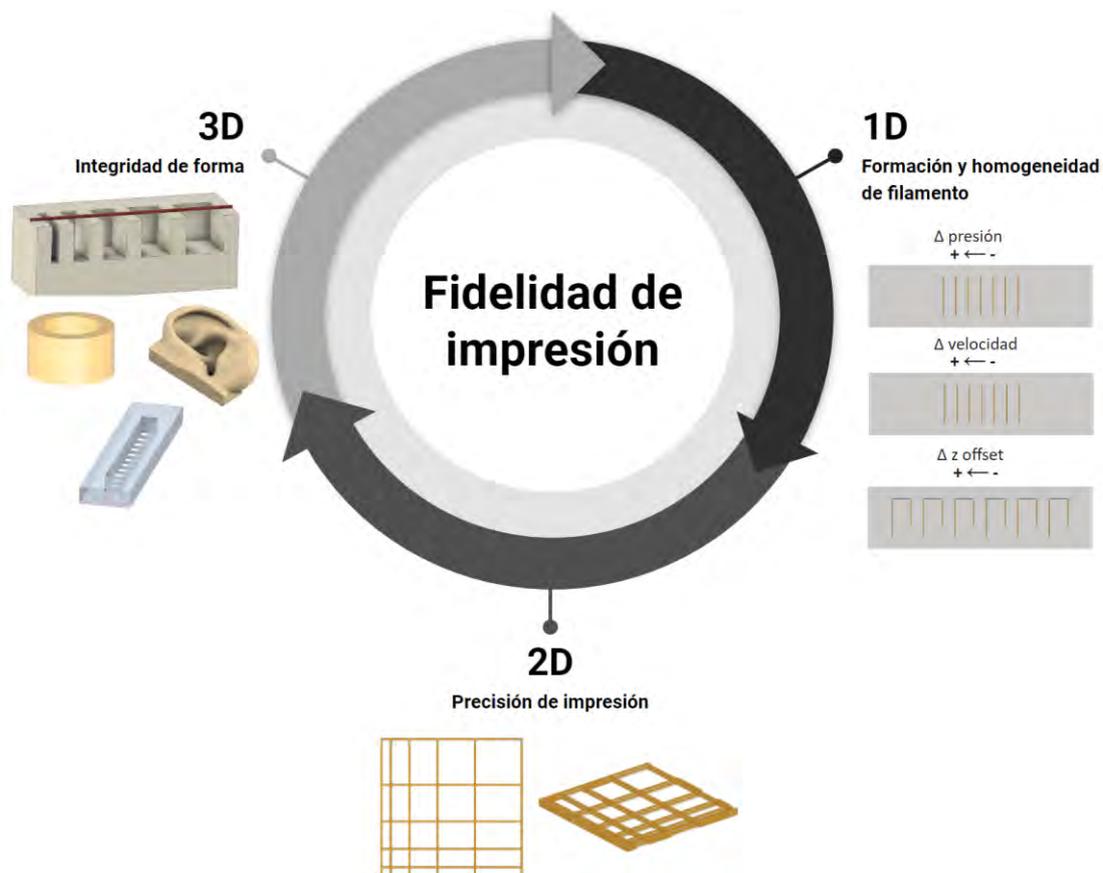


Figura 14. Esquema del flujo de evaluación de la fidelidad de impresión de biotintas o tintas de biomaterial para bioimpresión basada en extrusión

i) **Formación y homogeneidad de filamento: Efecto de la velocidad, presión y distancia en Z sobre el filamento**

El primer paso para estudiar el comportamiento de los materiales al ser impresos es analizar el efecto de parámetros como la presión, la velocidad y la distancia a la plataforma (distancia en z o *z offset*) sobre estos y además encontrar el conjunto de valores que producen los mejores resultados para ser empleados en los siguientes ensayos.

El presente ensayo se subdivide en tres pruebas, donde en cada una se evalúa el efecto de solo un parámetro (presión, velocidad o distancia en Z) mientras se mantienen fijos los otros dos. Se consideraron variables independientes transversales a las tres pruebas: la temperatura del extrusor y de la plataforma (25 °C), el calibre de la boquilla de impresión (0.41 mm) y la altura de capa (0.2 mm).

Se diseñaron modelos unidimensionales para ser impresos: 1) línea recta para los ensayos de velocidad y presiones (Figura 15), y 2) letra J invertida con ángulos rectos para el ensayo de distancia en Z (Figura 16). Las características geométricas evaluadas cualitativamente o cuantitativamente incluyen la uniformidad y el grosor, respectivamente.

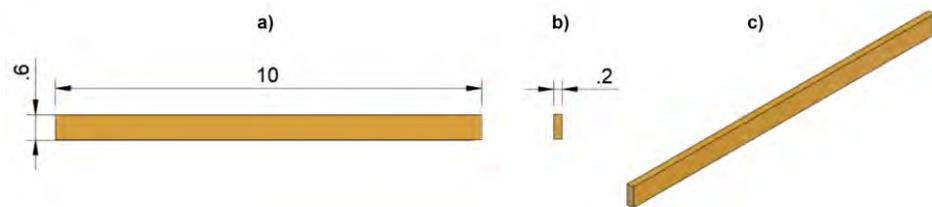


Figura 15. Geometría utilizada para el ensayo de variación de velocidad y variación de presión (medidas en mm), (a) vista lateral, (b) frontal y (c) ortogonal.

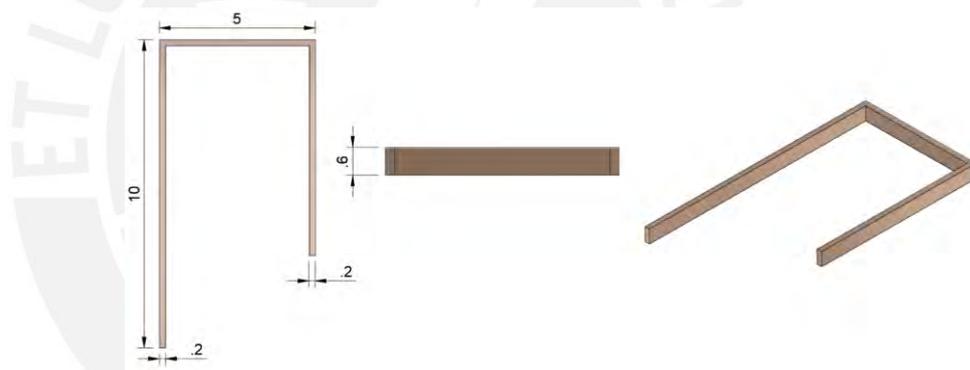


Figura 16. Geometría utilizada para el ensayo de variación de distancia entre el cabezal y la plataforma (medidas en mm), (a) vista superior, (b) frontal y (c) ortogonal.

El grosor describe el tamaño real de los filamentos, y su similitud con el modelo diseñado, para su evaluación se tomaron los diámetros en cinco puntos distintos mediante el análisis in silico de cada imagen y se registraron las medidas promedio y la desviación estándar.

La uniformidad describe la consistencia del material a lo largo del trayecto y en las regiones con esquinas, se busca sean idealmente ángulos rectos. Esta característica fue evaluada por inspección visual y clasificada en las siguientes categorías: homogénea/heterogénea, y escasa/normal/semi excesiva/excesiva.

ii) Precisión de impresión: Fusión de filamento

La precisión de impresión es un aspecto determinante para generar constructos con las dimensiones deseadas, para ello es importante estudiar la estabilización del material después de ser dispensado, particularmente cuando entra en contacto con filamentos adyacentes. Existen ensayos basados en analizar estructuras macroporosas planas que permiten evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la precisión de impresión. Se llevó a cabo el ensayo de fusión de filamento que consistió en imprimir dos capas consecutivas de un patrón en el que la distancia entre filamento y filamento variaba de 1 a 5 mm con incrementos de 1 mm (Figuras 17a y b). La orientación del patrón variaba entre 0° y 90° en cada capa para dar lugar a los macroporos a ser analizados con dimensiones teóricas de 5×5 , 4×4 , 3×3 , 2×2 y 1×1 mm² (Figura 17c).

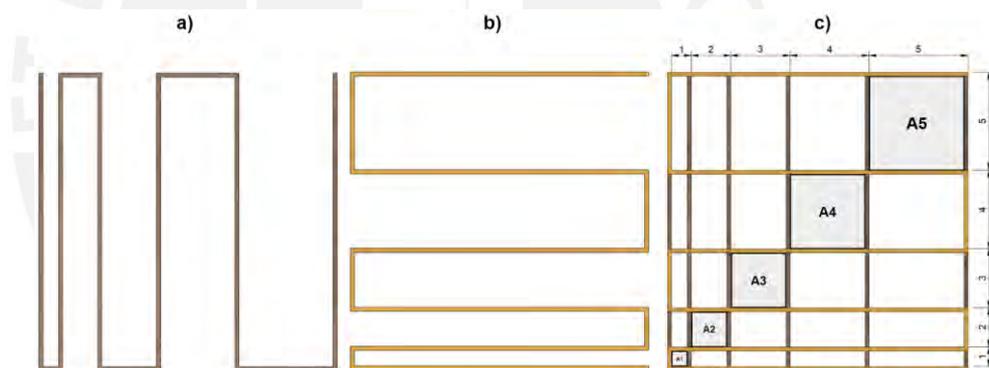


Figura 17. Geometrías utilizadas para el ensayo de fusión de filamento (medidas en mm).
Vista superior de: (a) primera y tercera capa, (b) segunda y cuarta capa, (c) geometría final.

Dichos macroporos permiten analizar el índice arquitectura de poro (A_p), sabiendo que la circularidad (C) de un área cerrada está definida por la Ec. 5:

$$C = \frac{4\pi \cdot A}{P^2} \quad (5)$$

donde, P es el perímetro, A el área, y que para una forma cuadrada, la circularidad (C) es igual a $\pi/4$. A partir de ello, se ha definido A_p en la Ec. 6, tomando como referencia la circularidad de un cuadrado:

$$A_p = \frac{\pi}{4} \cdot \frac{1}{C} = \frac{P^2}{16 \cdot A} \quad (6)$$

Una alta precisión de impresión daría como resultado un índice $A_p = 1$ (geometría de poro cuadrada), mientras que $A_p < 1$ y $A_p > 1$ corresponden a una geometría de forma más redonda o irregular (Figura 18). De esta manera, la medición de la circularidad de los poros tomando como referencia un cuadrado ideal proporciona una estimación de la precisión de impresión en el plano x-y.

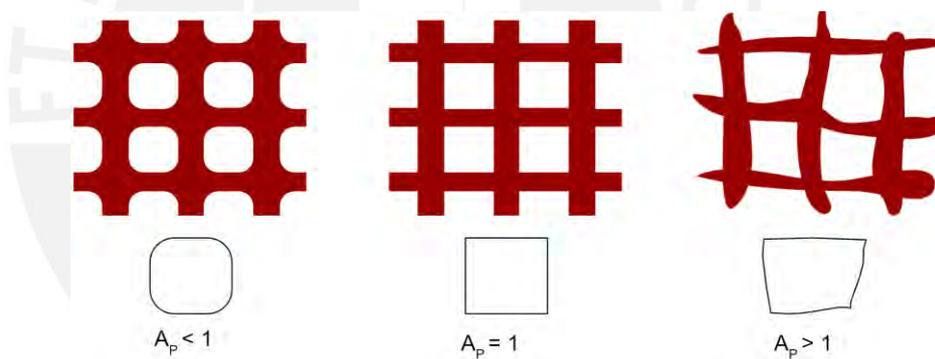


Figura 18. Ejemplos de posibles resultados del ensayo de fusión de filamento según la geometría del macroporo: redonda ($A_p < 1$), cuadrada ($A_p = 1$) o irregular ($A_p > 1$).

La tasa de difusión de filamento (Df_r) es una propiedad que se puede obtener del mismo ensayo y complementa a A_p . Es útil porque los filamentos perpendiculares superpuestos suelen fusionarse y, dependiendo de sus características reológicas y de su tensión superficial, pueden dar lugar a intersecciones curvadas que potencialmente logren cerrar el macroporo.

$$Df_r = \frac{A_t - A_a}{A_t} \times 100\% \quad (7)$$

donde A_t y A_a representan a las áreas teóricas y experimentales de los macroporos, respectivamente. El Df_r de un macroporo ideal, sin ningún filamento esparcido, es 0 (es decir, $A_t = A_a$).

Las formulaciones se imprimieron con las variables optimizadas de presión, velocidad y distancia a la plataforma según los resultados de los ensayos previos.

iii) **Integridad de forma: Colapso de filamento**

La identificación del factor de colapso indica la capacidad del filamento de mantener su forma contrarrestando la gravedad. Esta propiedad puede ser analizada cuantitativamente mediante el ensayo de colapso de filamento, el cual consiste en imprimir un patrón lineal de filamento sobre una estructura conformada por pilares separados y calcular el área debajo del mismo. Se diseñó una estructura usando el software CAD/CAM/CAE Autodesk® Fusion 360™ con pilares de 2 mm de grosor y 5 mm de alto distanciados por 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mm y se imprimió en 3D con una impresora Polyjet (Objet350 Connex3, Stratasys Ltd., USA) utilizando resina fotocurable (Vero™, Stratasys Ltd., USA).

El factor de área de colapso (F_c) denota el porcentaje de área experimental en relación al área teórica. Se determinó usando la Ec 4:

$$F_c = \frac{A_t^c - A_a^c}{A_t^c} \times 100\% \quad (4)$$

donde A_a^c es el área actual obtenida experimentalmente y A_t^c es el área teórica, ambas están delimitadas a los lados y en la base por las paredes de la estructura diferenciándose en que el lado superior de A_t^c es una línea recta horizontal imaginaria mientras que el de A_a^c es el filamento que se deposita entre los pilares.

Se ejemplifican los casos de comportamiento de un filamento real y de un filamento parcialmente colapsado en las Figuras 19a y b, respectivamente.

Las áreas asociadas a las separaciones A5 de ambos casos se comparan con el A_1^c en la Figura 19c.

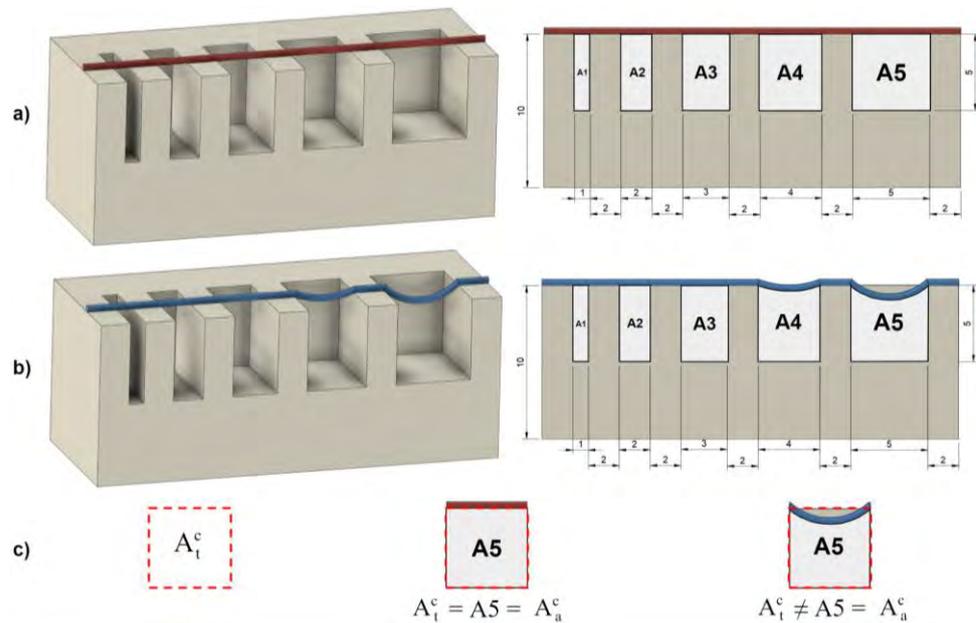


Figura 19. Ejemplos del ensayo de colapso con: (a) filamento ideal y (b) filamento parcialmente colapsado; (c) áreas analizadas para hallar el factor de colapso basadas en los ejemplos (medidas en mm)

En el caso de que los filamentos depositados no alcancen a ser continuos entre dos pilares consecutivos, se considera A_a^c como 0 mientras que el factor del área de colapso se determina como 100 %.

Las formulaciones se imprimieron con las variables optimizadas de presión, velocidad y distancia a la plataforma según los resultados de los ensayos previos.

iv) Integridad de forma: Impresión de estructuras tridimensionales de interés biomédico

Una vez realizadas las pruebas de caracterización antes mencionadas, la formulación que exhibió mejor fidelidad de impresión es seleccionada para fabricar constructos acelulares tridimensionales. Los modelos a imprimir se detallan con medidas en las Figuras 20-22 según los diseños propuestos previamente.

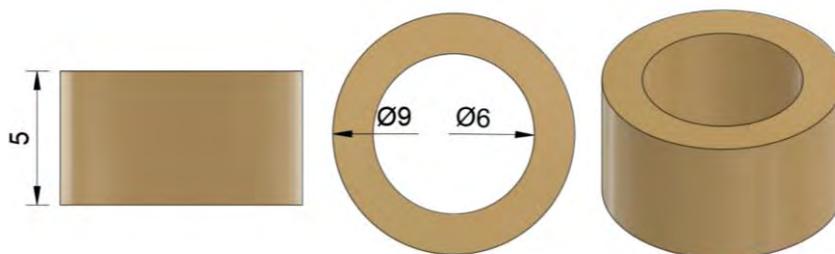


Figura 20. Diseño CAD del constructo vascular para el ensayo de integridad de forma (medidas en mm)

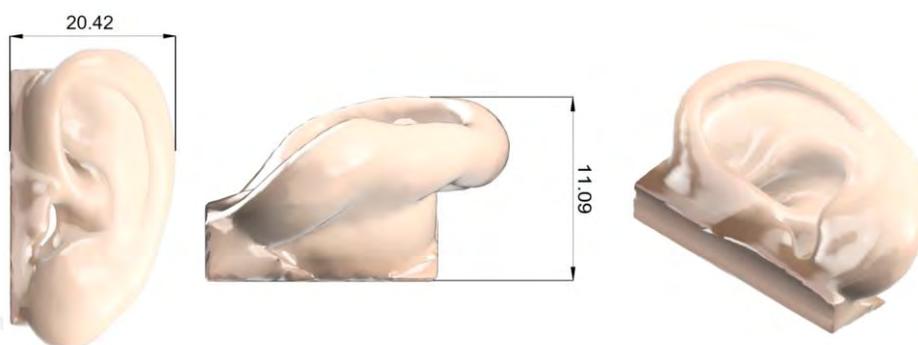


Figura 21. Diseño del constructo orgánico para el ensayo de integridad de forma (medidas en mm)

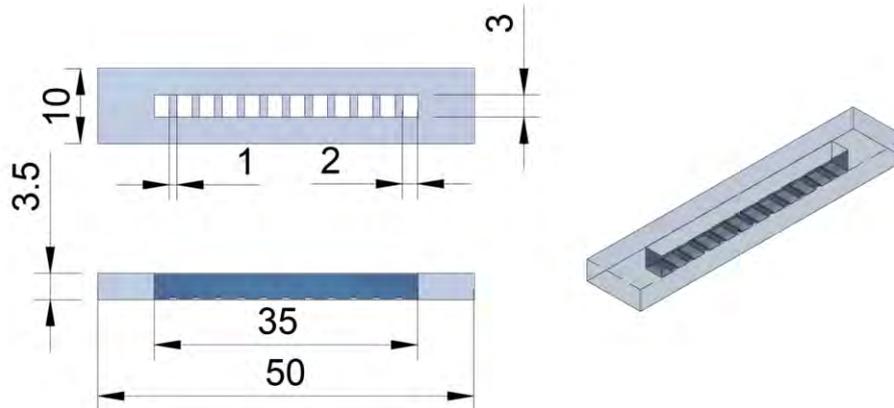


Figura 22. Diseño CAD del constructo para ensayos in vitro para el ensayo de integridad de forma (medidas en mm)

3.1.2 Desarrollo

Se utilizó la bioimpresora Allevi 3 del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA) de la PUCP para materializar el constructo. Esta bioimpresora tiene tres extrusores con control de temperatura regulable (4-160 °C) los cuales que permiten la bioimpresión de una amplia gama de biotintas y tintas de biomaterial, están integrados con LEDs de luz azul (405 nm) y UV (365 nm) en caso se requiera de dicho

mecanismo de entrecruzamiento. Su principio de extrusión es neumático y su rango de funcionamiento es de 1-120 psi.

a) Formación y homogeneidad de filamento: Efecto de la velocidad, presión y distancia en Z sobre el grosor del filamento

Los resultados reportados en la Tabla 9 y la Figura 23, denotan que la presión neumática influye de manera directamente proporcional en el grosor de los filamentos, independientemente de las concentraciones de los hidrogeles constituyentes o de la adición de CaCl_2 como agente de entrecruzamiento. Cualitativamente, se puede identificar que dos de las tres formulaciones que incluyen alginato y CaCl_2 producen filamentos heterogéneos (o no uniformes) en todo el rango de presiones aplicadas, mientras que la homogeneidad predomina en las cinco restantes. Asimismo, la mayoría de casos describen deposiciones excesivas y semi excesivas, siendo solo las formulaciones con presencia de NaCMC y alginato sin adición de CaCl_2 las que alcanzaron deposiciones normales a menores presiones, teniendo en cuenta que el grosor ideal es de 0.2 mm. Se evidencia también que con las presiones mínimas aplicadas a cada formulación, no se alcanza una deposición identificable, a excepción de la formulación $\text{Ca}_{10}\text{A}_{10}\text{Ca}_0$, las cuales fueron excluidas del análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo reafirma la relación directamente proporcional mencionada previamente. Las mediciones promedio del grosor superaron hasta en 1020% (2.049 ± 0.0298 mm) al grosor ideal en el caso más crítico ($\text{C}_{10}\text{A}_{10}\text{Ca}_0$) mientras que el filamento más cercano ($\text{C}_0\text{A}_{20}\text{Ca}_2$) lo superó en 250% (0.499 ± 0.1296 mm). Además, se identifica una relación entre la clasificación cualitativa homogéneo/heterogéneo y la desviación estándar, donde a mínimas desviaciones el filamento describe un aspecto homogéneo y viceversa como en los casos de las formulaciones predominantemente homogéneas: $\text{C}_{20}\text{A}_{10}\text{Ca}_0$ y $\text{C}_{20}\text{A}_0\text{Ca}_2$, y de las predominantemente heterogéneas: $\text{C}_0\text{A}_{20}\text{Ca}_2$ y $\text{C}_{10}\text{A}_{10}\text{Ca}_2$, en todo el rango de presiones. En base a los resultados, se seleccionaron los valores de presión óptimos para continuar con la prueba de velocidad variable (Tabla 10).

En la Tabla 11 y la Figura 24 se reportan los resultados del efecto de la velocidad sobre el grosor del filamento, a partir de los cuales se evidencia una relación inversamente proporcional para todas las formulaciones. Similarmente al efecto de la presión, se

identifica una deposición heterogénea en formulaciones con presencia de alginato y CaCl_2 , sin embargo, no se encontró una predominancia de homogeneidad en el resto de las formulaciones a diferencia de la prueba antes descrita. La selección de presiones óptimas permitió disminuir los casos de deposiciones excesivas en un 70%, siendo la formulación $\text{C}_{20}\text{A}_0\text{Ca}_0$ la que tuvo mayor cantidad de estos (4). Asimismo, se produjeron deposiciones de filamento no identificables con máximos de velocidades que fueron excluidas del análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo reafirma la relación inversamente proporcional detallada previamente. Las mediciones promedio del grosor superaron hasta en 897% (1.793 ± 0.2563 mm) al grosor ideal en el caso más crítico ($\text{C}_{20}\text{A}_0\text{Ca}_0$) mientras que el filamento más cercano ($\text{C}_0\text{A}_{20}\text{Ca}_2$) lo superó en 115% (0.230 ± 0.1218 mm). En base a los resultados, se seleccionaron los valores de velocidad óptimos para continuar con la prueba de altura de capa variable (Tabla 12).

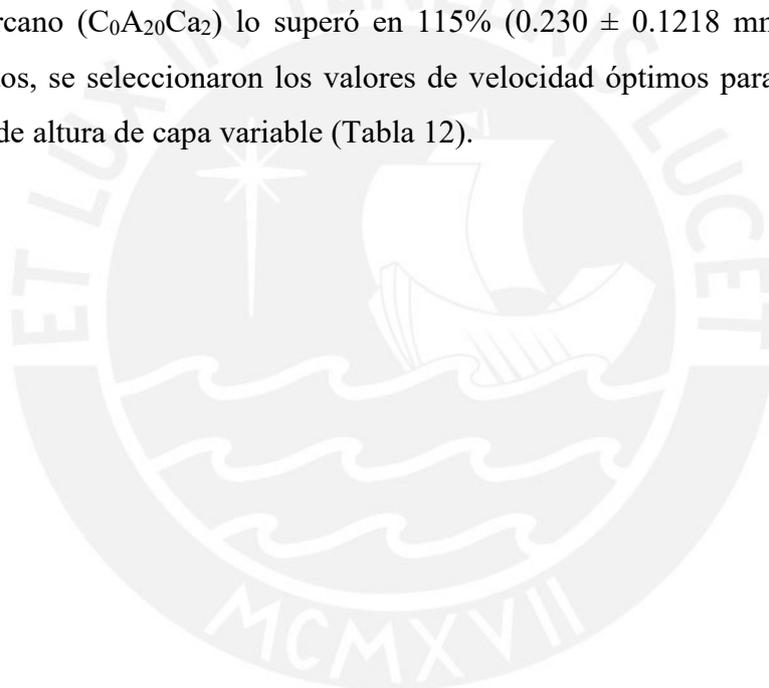
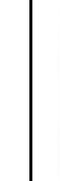
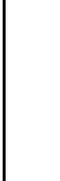
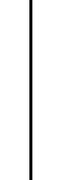
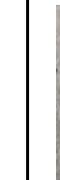
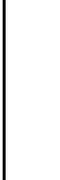


Tabla 9. Análisis cualitativo del efecto de la presión sobre el grosor del filamento. Hm: Homogénea, Ht: Heterogénea; Es: Escasa, N: Normal, SE: Semi Excesiva, E: Excesiva

Formulaciones	$C_{20}A_0Ca_0$							$C_{20}A_0Ca_2$						
	80	70	60	50	40	30	20	100	90	80	70	60	50	40
														
Deposición	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	X	X	Hm	Hm	Hm	Hm	Ht	X	X
	E	E	E	SE	SE	X	X	E	E	E	SE	SE	X	X
Formulaciones	$C_0A_{20}Ca_0$							$C_0A_{20}Ca_2$						
	110	100	90	80	70	60	50	110	100	90	80	70	60	50
														
Deposición	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	X	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht	X	X
	E	E	E	SE	SE	SE	X	E	E	SE	SE	N	X	X

Formulaciones	C ₂₀ A ₁₀ Ca ₀							C ₂₀ A ₁₀ Ca ₂						
	120	110	100	90	80	70	60	50*	40*	30*	20*	10*		
														
Deposición	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Ht	X	Ht	Hm	X	X	X		
	SE	SE	SE	N	N	N	X	E	SE	X	X	X		
Formulaciones	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₀							C ₁₀ A ₁₀ Ca ₂						
	90	80	70	60	50	40	30	80	70	60	50	40	30	20
														
Deposición	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht	X	X
	E	E	E	E	SE	N	N	E	E	E	SE	SE	X	X

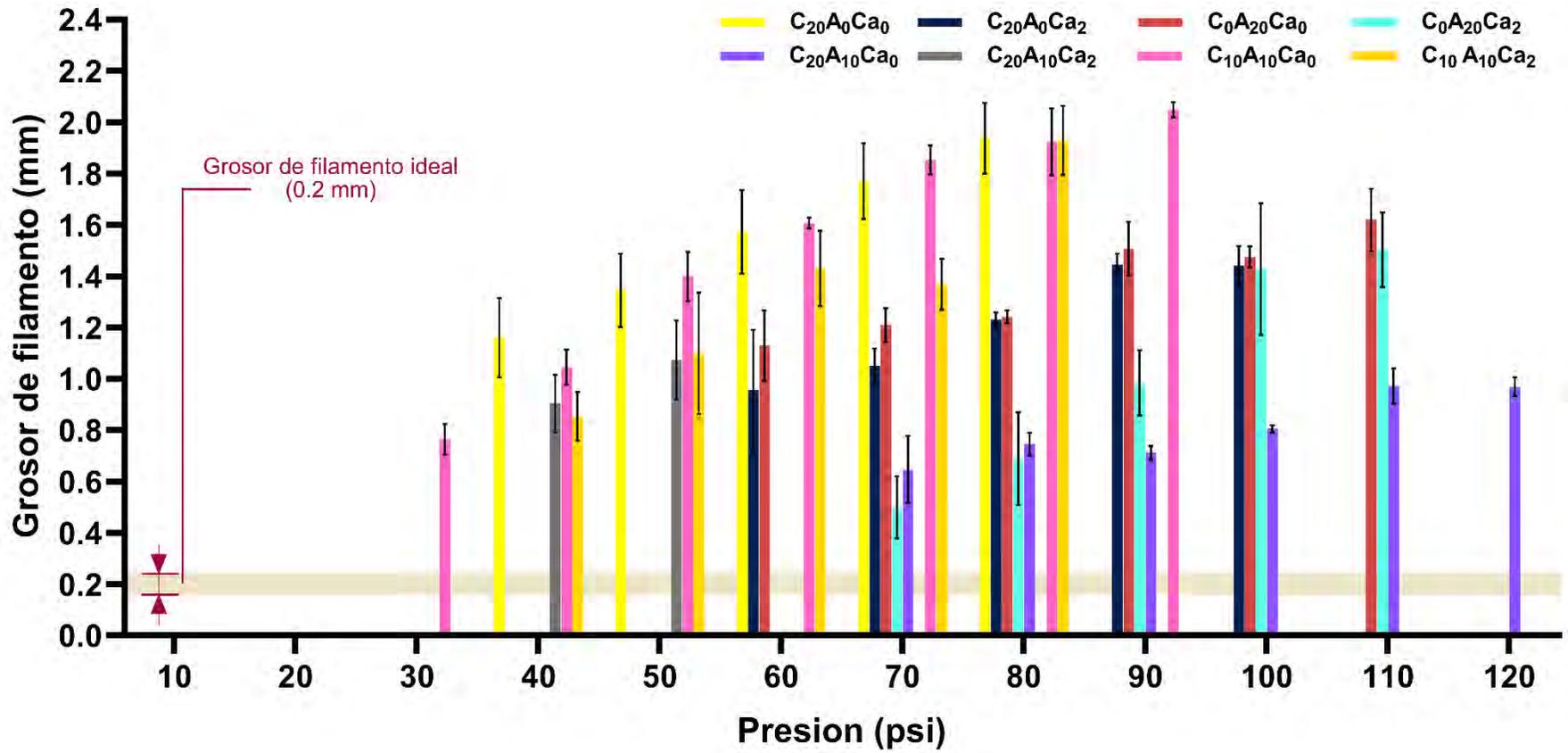


Figura 23 Análisis cuantitativo del efecto de la presión sobre el ancho del filamento

Tabla 10. Valores de presión seleccionados para cada formulación

Formulación	C ₂₀ A ₀ Ca ₀	C ₂₀ A ₀ Ca ₂	C ₀ A ₂₀ Ca ₀	C ₀ A ₂₀ Ca ₂	C ₂₀ A ₁₀ Ca ₀	C ₂₀ A ₁₀ Ca ₂	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₀	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₂
Presión seleccionada (psi)	50	70	80	90	90	40	40	50

Tabla 11. Análisis cualitativo del efecto de la velocidad sobre el grosor del filamento. Hm: Homogénea, Ht: Heterogénea, Es: Escasa, N: Normal, SE: Semi Excesiva, E: Excesiva

Formulaciones	$C_{20}A_0Ca_0$							$C_{20}A_0Ca_2$						
	10	9	8	7	6	5	4	10	9	8	7	6	5	4
														
Deposición	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Ht	X	X	Ht	Ht	Ht	Hm	Hm
	SE	SE	SE	E	E	E	E	X	X	N	N	N	N	SE
Formulaciones	$C_0A_{20}Ca_0$							$C_0A_{20}Ca_2$						
	10	9	8	7	6	5	4	7	6	5	4	3	2	1
														
Deposición	X	X	Ht	Hm	Hm	Hm	Hm	X	X	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht
	X	X	SE	N	SE	SE	SE	X	X	N	N	SE	SE	E

Formulaciones	C ₂₀ A ₁₀ Ca ₀							C ₂₀ A ₁₀ Ca ₂						
	10	9	8	7	6	5	4	10	9	8	7	6	5	4
														
Deposición	X	X	X	X	Ht	Hm	Hm	X	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht
	X	X	X	X	SE	N	N	X	SN	N	SE	N	SE	SE
Formulaciones	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₀							C ₁₀ A ₁₀ Ca ₂						
	7	6	5	4	3	2	1	9	8	7	6	5	4	3
														
Deposición	X	X	Ht	Ht	Hm	Hm	Hm	X	X	X	Ht	Ht	Hm	Ht
	X	X	N	SE	SE	SE	E	X	X	X	SE	SE	SE	SE

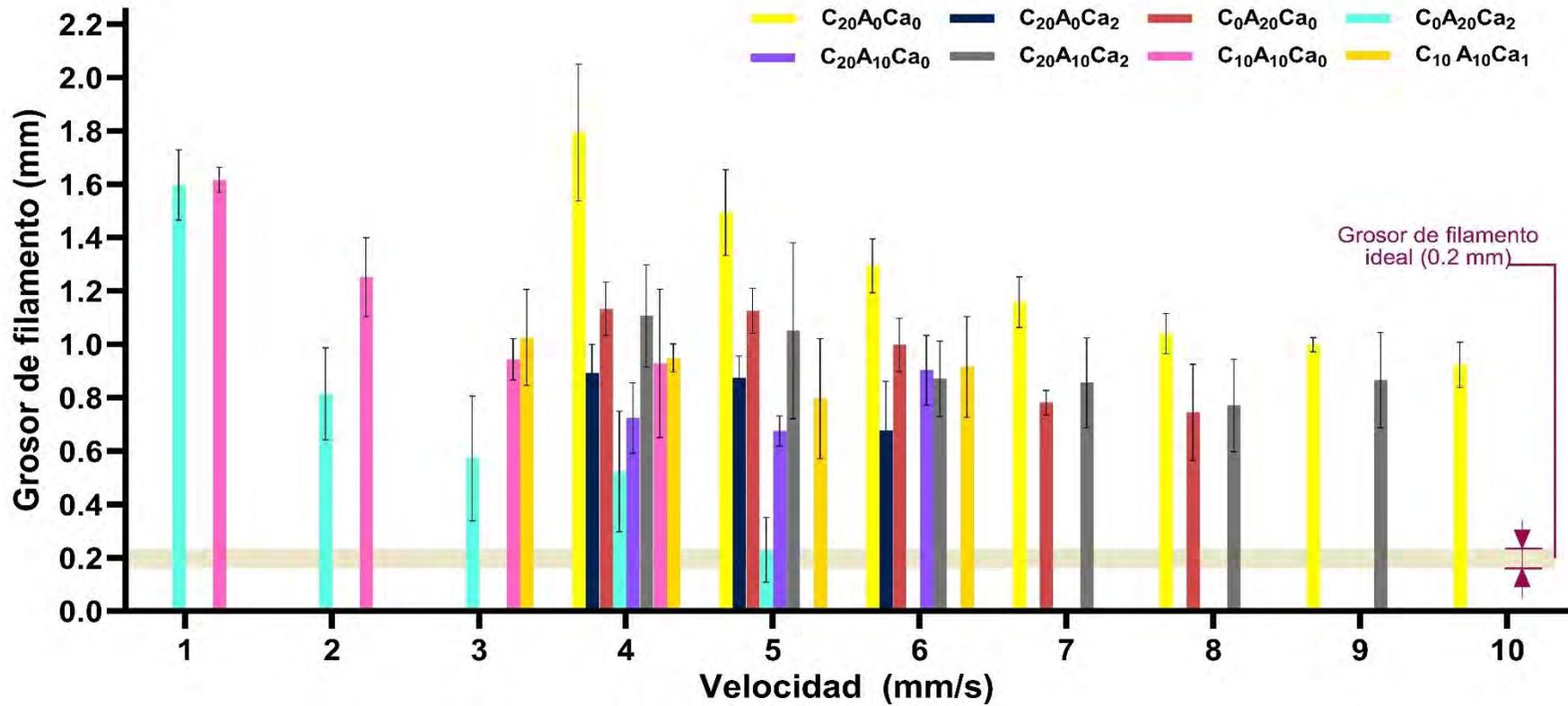


Figura 24. Análisis cuantitativo del efecto de la velocidad sobre el ancho del filamento

Tabla 12. Valores de velocidad seleccionados para cada formulación

Formulación	$C_{20}A_0Ca_0$	$C_{20}A_0Ca_2$	$C_0A_{20}Ca_0$	$C_0A_{20}Ca_2$	$C_{20}A_{10}Ca_0$	$C_{20}A_{10}Ca_2$	$C_{10}A_{10}Ca_0$	$C_{10}A_{10}Ca_2$
Velocidad seleccionada (mm/s)	10	5	6	2	5	4	3	4

El efecto de la distancia de impresión sobre el ancho del filamento se muestra en la Figura 25 y en la Tabla 13. No se identifica una tendencia de proporcionalidad al variar la distancia de impresión respecto al grosor del filamento. Sin embargo, se puede decir que la mayoría de las geometrías impresas a la distancia máxima (0.25 mm) describen esquinas con curvas redondas así como deposiciones semi-excesivas y excesivas. Esto podría estar relacionado con que a esta separación se tiene menos contacto con la plataforma de impresión, lo que aleja más el punto inicial de deposición de material, resultando en su acumulación progresiva a lo largo de la trayectoria. En base a los resultados, se mantuvo el valor de altura de capa con el que se venía trabajando (0.2 mm) para continuar con las siguientes pruebas.

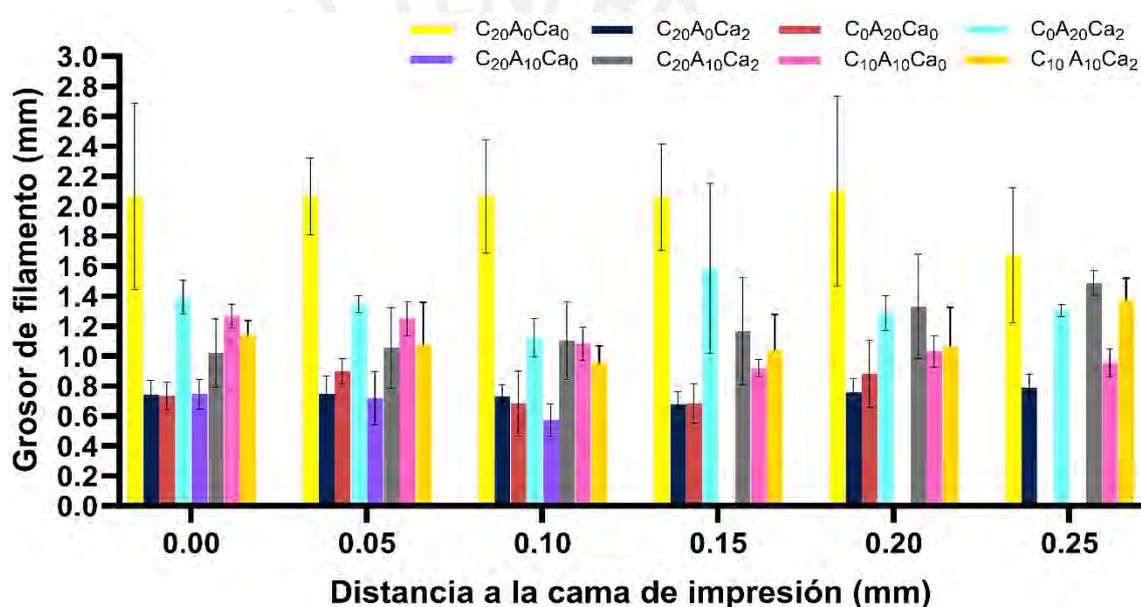
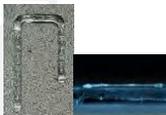
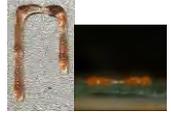


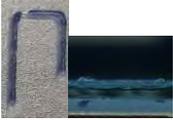
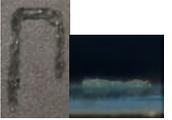
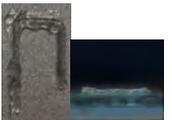
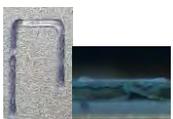
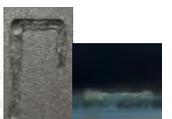
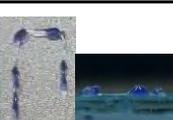
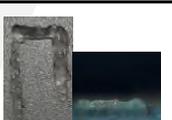
Figura 25. Análisis cuantitativo del efecto de la distancia a la cama de impresión sobre el ancho del filamento

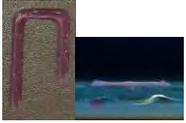
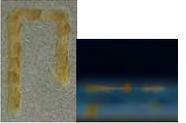
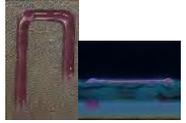
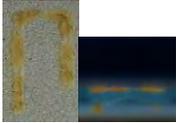
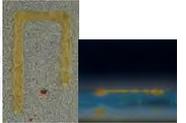
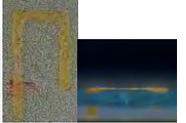
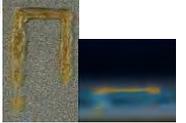
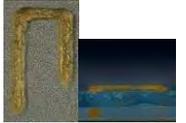
Tabla 13. Análisis cualitativo del efecto de la distancia a la plataforma de impresión sobre el grosor del filamento.

Distancia a la plataforma (mm)	C ₂₀ A ₀ Ca ₀			C ₂₀ A ₀ Ca ₂			
	Resultado	Esquinas	Deposición	Resultado	Esquinas	Deposición	
0		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea		Fina	Normal Heterogénea	
0.05		Redonda	Excesiva Homogénea		Fina	Normal Homogénea	
0.1		Redonda	Excesiva Homogénea		Fina	Normal Homogénea	
0.15		Redonda	Excesiva Homogénea		Fina	Normal Homogénea	
0.20		Redonda	Excesiva Homogénea		Redonda	Normal Homogénea	
0.25		Redonda	Excesiva Homogénea		Redonda	Semi-excesiva Homogénea	
		C ₀ A ₂₀ Ca ₀			C ₀ A ₂₀ Ca ₂		

Distancia a la plataforma (mm)	Resultado	Esquinas	Deposición	Resultado	Esquina	Deposición
0		Fina	Normal Homogénea		Fina	Excesiva Heterogénea
0.05		Redonda	Semi-excesiva Homogénea		Fina	Semi-excesiva Heterogénea
0.10		Fina	Normal Homogénea		Fina	Normal Heterogénea
0.15		Redonda	Normal Heterogénea		Redonda	Excesiva Heterogénea
0.20		Redonda	Excesiva Heterogénea		Fina	Semi-excesiva Homogénea
0.25		X	X		Fina	Excesiva Homogénea

	$C_{20}A_{10}Ca_0$	$C_{20}A_{10}Ca_2$
--	--------------------	--------------------

Distancia a la plataforma (mm)	Resultado	Esquinas	Deposición	Resultado	Esquina	Deposición
0		Fina	Normal Homogéneo		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.05		Fina	Normal Heterogéneo		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.10		Fina	Normal Heterogéneo		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.15		Redonda	Escaso Heterogéneo		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.20		X	X		Redonda	Excesiva Heterogénea
0.25		X	X		Redonda	Excesiva Heterogénea

Distancia a la plataforma (mm)	C ₁₀ A ₁₀ Ca ₀			C ₁₀ A ₁₀ Ca ₂		
	Resultado	Esquinas	Deposición	Resultado	Esquina	Deposición
0		Redonda	Semi-excesiva Homogenea		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.05		Redonda	Semi-excesiva Homogenea		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.10		Fina	Normal Homogenea		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.15		Fina	Normal Homogenea		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.20		Redonda	Semi-excesiva Homogenea		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea
0.25		Redonda	Semi-excesiva Homogenea		Redonda	Semi-excesiva Heterogénea

b) Precisión de impresión: Fusión de filamento

Las estructuras impresas en forma de gradillas describen macroporos variables según el tipo de formulación empleada, sin embargo, se identifica que para todos los casos, el macroporo de menor tamaño ($1 \times 1 \text{ mm}^2$) no se alcanza a formar, resultando con $Df_r = 100\%$ y $A_p = 0$ (Figuras 26 y 27). Se observa que las formulaciones con presencia de agente entrecruzante CaCl_2 al 2% formaron líneas ininterrumpidas y homogéneas que dieron lugar a una cantidad igual o mayor de macroporos viables cuando se les compara con sus contrapartes sin CaCl_2 (Tabla 14). La Df_r disminuye en relación al aumento del tamaño de macroporo, a diferencia del índice A_p cuyos valores se mantienen en su mayoría en el rango admisible definido en la literatura: 1 ± 0.1 (Ouyang, 2016). Cuantitativamente, la formulación $\text{C}_{20}\text{A}_{10}\text{Ca}_2$ muestra a la mayoría de sus índices de A_p (1.04, 1.08 y 1.10) dentro del rango antes mencionado, lo que implica una geometría casi cuadrada (ideal) de los macroporos. Además, al comparar dicha formulación con aquellas tuvieron índices A_p similares, como $\text{C}_{20}\text{A}_0\text{Ca}_2$ y $\text{C}_0\text{A}_{20}\text{Ca}_0$, exhibe una difusión visualmente imperceptible, lo cual es validado al revisar sus valores de Df_r .

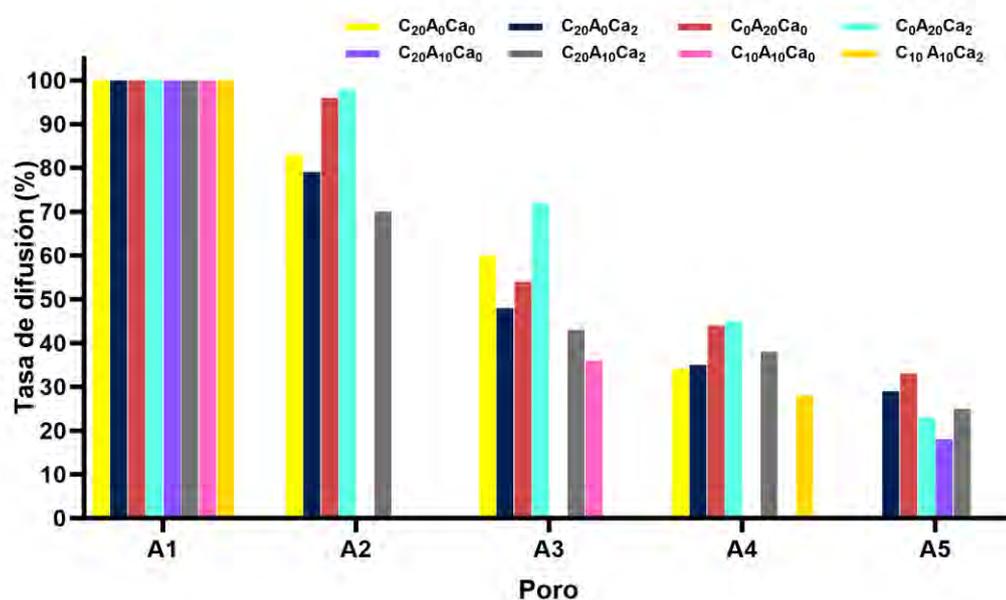


Figura 26. Análisis cuantitativo del ensayo de fusión de filamento: Tasa de difusión (%)

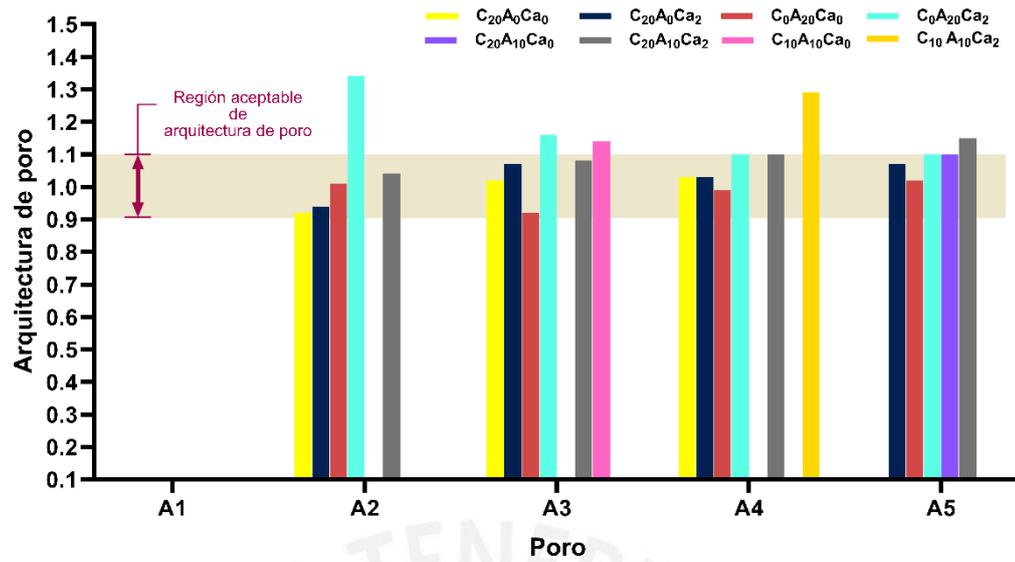


Figura 27. Análisis cuantitativo del ensayo de fusión de filamento: Arquitectura de poro



Tabla 14. Ensayo de fusión de filamento (áreas viables de los macroporos sombreadas en blanco)

Fusión de Filamento	Formulaciones			
	$C_{20}A_0Ca_0$	$C_{20}A_0Ca_2$	$C_0A_{20}Ca_0$	$C_0A_{20}Ca_2$
Macro-poros				
Vista Lateral				
	$C_{20}A_{10}Ca_0$	$C_{20}A_{10}Ca_2$	$C_{10}A_{10}Ca_0$	$C_{10}A_{10}Ca_2$
Macro-poros				
Vista Lateral				

c) Integridad de forma: Colapso de filamento

La observación cualitativa del ensayo de colapso (Tabla 15) permite identificar que las formulaciones $C_{20}A_{10}Ca_0$ y $C_{10}A_{10}Ca_0$ no son capaces de mantener la integridad del filamento en ninguna separación, mientras que la formulación $C_{20}A_0Ca_0$ colapsa a partir de 3 mm. El mismo escenario ocurre para las formulaciones $C_{20}A_0Ca_2$ y $C_{10}A_{10}Ca_2$ con valores de separación de 4 mm en adelante. El resto de las formulaciones conservaron filamentos capaces de recorrer los espacios entre todos los pilares. En el caso de la composición $C_0A_{20}Ca_2$, se calcularon valores de F_C en el rango de 8 a 36% que disminuían conforme se incrementa la distancia de separación (Figura 28), sin embargo, se identifican visualmente discontinuidades en el filamento sobre el segundo y cuarto pilar. Por otro lado, la formulación $C_0A_{20}Ca_0$ muestra valores de F_C (0-3%) que sugieren un buen desempeño en el ensayo; sin embargo, al contratarlos con los resultados cualitativos, se demuestra que si bien alcanza a formar un filamento continuo entre los pilares, el grosor mismo es casi imperceptible, lo que lo hace susceptible a rupturas. Por el contrario, la formulación $C_{20}A_{10}Ca_2$ genera un filamento casi recto que da lugar a valores de F_C nulos: 0%, en las separaciones desde 1 hasta 3 mm, así como valores mínimos: 4 y 8%, en las separaciones de 4 y 5 mm.

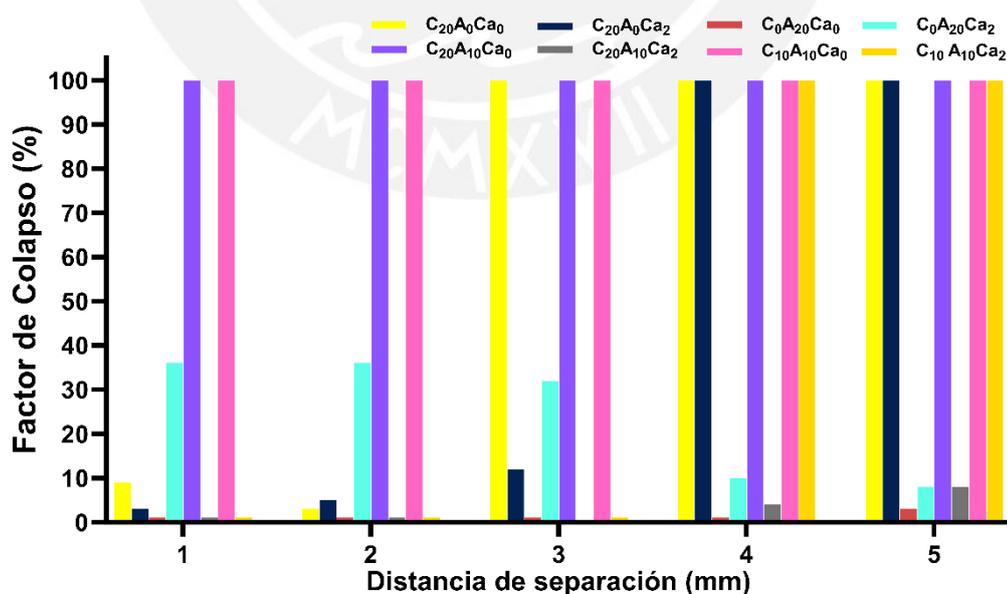


Figura 28. Análisis cuantitativo del ensayo de integridad de forma: colapso de filamento

Tabla 15. Ensayo de colapso de filamento

Formulaciones	Colapso de Filamento	
$C_{20}A_0Ca_0$		
$C_{20}A_0Ca_2$		
$C_0A_{20}Ca_0$		
$C_0A_{20}Ca_2$		
$C_{20}A_{10}Ca_0$		
$C_{20}A_{10}Ca_2$		
$C_{10}A_{10}Ca_0$		
$C_{10}A_{10}Ca_2$		

d) Integridad de forma: Impresión de estructuras tridimensionales de interés biomédico

Analizando el desempeño de todas las formulaciones en los ensayos anteriores, bajo criterios que se discuten en el Capítulo 4, se determinó que la tinta de biomaterial de composición $C_{20}A_{10}Ca_2$ sería la empleada para el ensayo de manufactura de los constructos propuestos: vascular, orgánico y para ensayos in vitro. Se registraron las dimensiones de cada constructo impreso y se compararon porcentualmente tomando como referencia los diseños preconfigurados (Figuras 20-22).

El constructo vascular exhibió 50, 92 y 117% de desviación, en relación al diámetro interno, altura y diámetro externo, respectivamente, siendo la dimensión más comprometida la del diámetro interno (Figura 29).

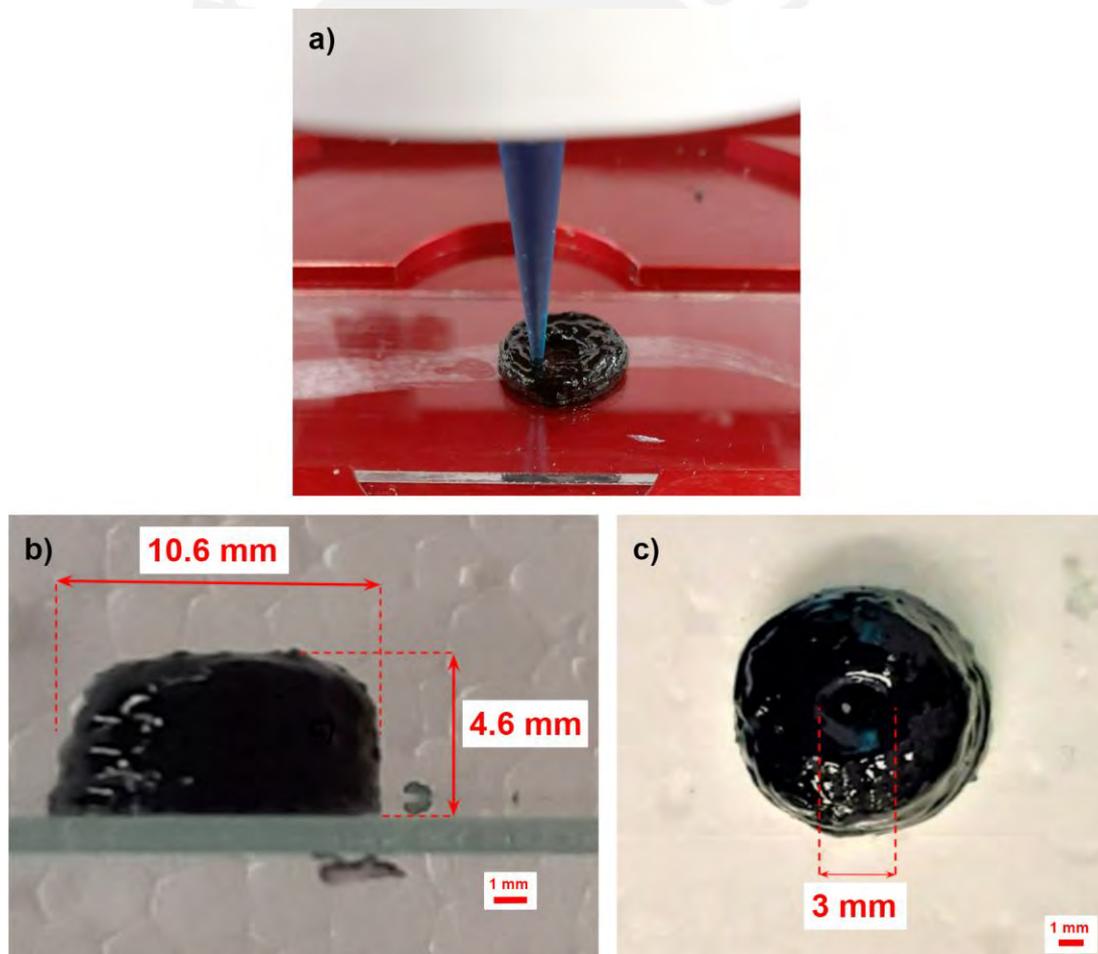


Figura 29. Impresión con $C_{20}A_{10}C_2$ del constructo vascular planteado.

El constructo orgánico exhibió 121, 124 y 114% de desviación, en relación al largo, ancho y altura, respectivamente, siendo la dimensión más comprometida la del largo interno (Figura 30).

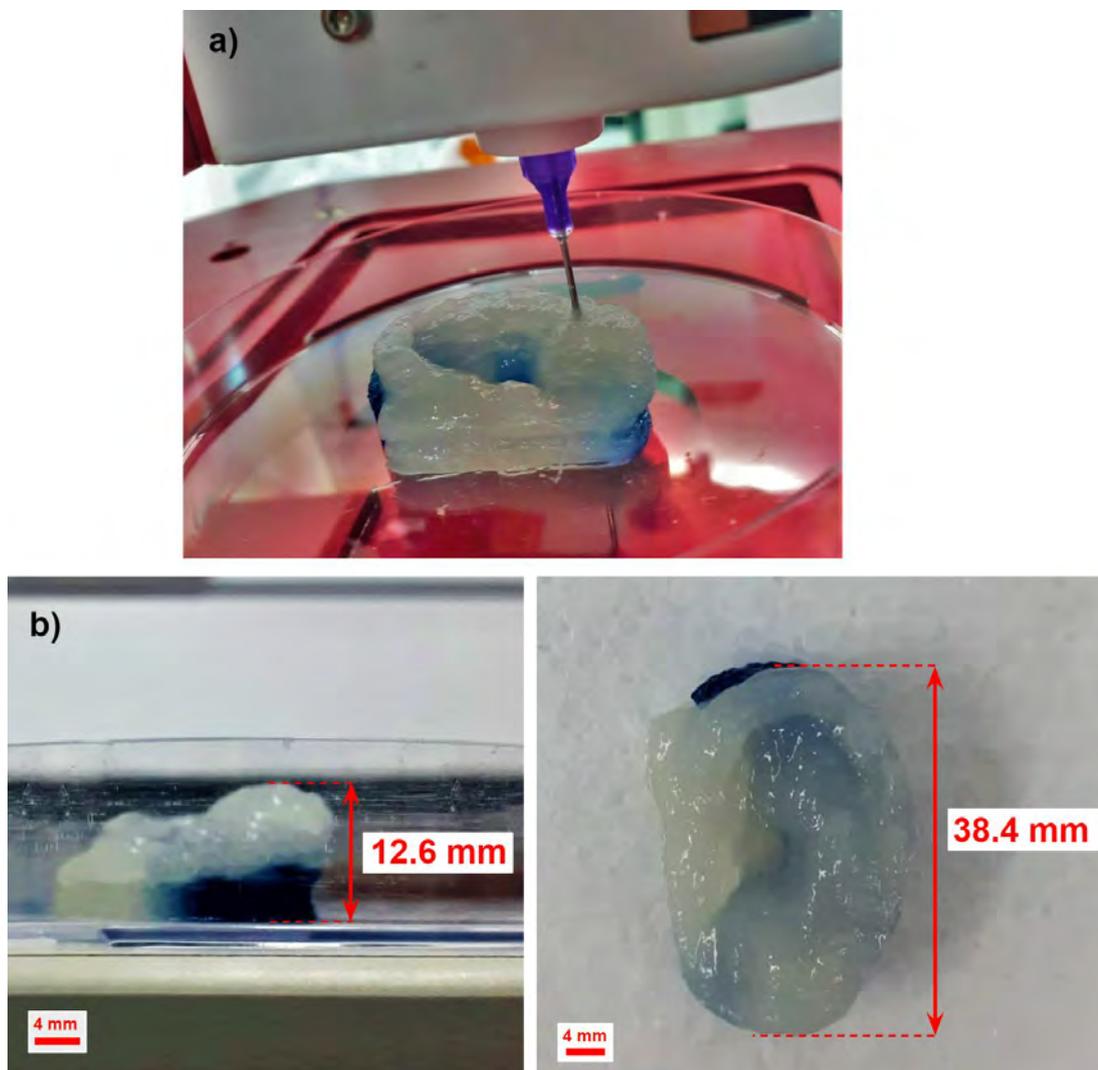


Figura 30. Impresión con $C_{20}A_{10}C_2$ del constructo orgánico planteado.

El constructo para ensayos in vitro exhibió 98, 135% y 103% de desviación, en relación al largo, ancho, y altura, respectivamente, siendo la dimensión más comprometida la del ancho (Figura 31).

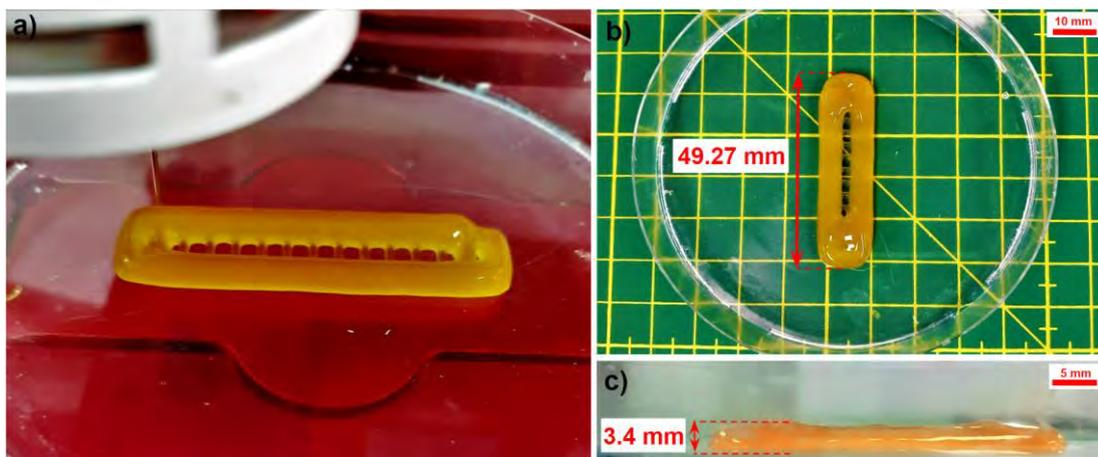


Figura 31. Impresión con $C_{20}A_{10}C_2$ del constructo para ensayos in vitro planteado.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se abordaron las etapas de preprocesamiento y procesamiento de una metodología general para el desarrollo de constructos con tecnologías de bioimpresión bajo el enfoque de estructuras comúnmente empleadas en ingeniería biomédica representativas de aplicaciones *in vivo* e *in vitro*: estructura vascular, estructura orgánica, estructura para ensayos *in vitro*. Experimentalmente, se formularon ocho tintas de biomaterial a base de combinaciones entre carboximetilcelulosa, alginato y cloruro de calcio, para ser sometidas a algunos ensayos de caracterización y determinar cuál de ellas sería viable de usar para la fabricación de los constructos tridimensionales.

El análisis reológico realizado como parte de la etapa de preprocesamiento permitió conocer el comportamiento y las magnitudes asociadas a la viscoelasticidad de un hidrogel formulado a base de sal sódica de carboximetilcelulosa al 15%. La significancia de dichos resultados, si bien es independiente del tipo de la técnica de bioimpresión a implementar, es discutida bajo el enfoque de extrusión planteado para la presente tesis. La curva mostrada en la Figura 10, describe tres regiones: una región inicial donde la viscosidad incrementa hasta su valor máximo, una región media donde su viscosidad aparente disminuye en función a la velocidad de corte, y una región final donde el valor de la viscosidad tiende a ser una constante. Contrastando con la literatura, la primera región no es propia de un comportamiento de '*shear-thinning*' de fluidos no newtonianos, pues en esta, la viscosidad (η_0) debería ser constante ante los cambios de velocidad de corte (Galindo-Rosales, 2021). Por otro lado, diversos autores han reportado curvas de viscosidad de sus biotintas donde se observa únicamente a la región media (Paxton, 2017; Kessel, 2020; Kesti, 2016) y en algunos casos, esta es seguida por la región final (Jin, 2017, O'Connell, 2016; Montero, 2019). Por otro lado, la ausencia del valor y_c en el ensayo de barrido de deformación limita la obtención de información útil y el cálculo de parámetros asociados que permiten predecir el comportamiento del material en los ensayos de fidelidad de impresión. Por ejemplo, Mouser *et al* demostró que y_c tiene un rol crucial en la formación y deposición de filamentos, mientras que Ribeiro *et al* propuso un modelo teórico simplificado que relaciona directamente el colapso del filamento con y_c . Una de las características más

importantes identificada en los materiales ‘imprimibles’ es que se mantenga una relación $G' \gg G''$ siempre que el material siga siendo capaz de fluir (Mazzocchi, 2018). Biotintas comerciales previamente caracterizadas tienen tangentes de pérdida entre 0.30 y 0.45 (Hung, 2016). Por el contrario, el hidrogel evaluado (NaCMC 15%) presentó un módulo viscoso G'' (451) superior al módulo elástico G' (290) y una tangente de pérdida de 1.56, indicando un comportamiento viscoso predominante. A pesar de que el ensayo reológico no se realizó con las ocho formulaciones propuestas, los resultados obtenidos exhiben la necesidad de encontrar una formulación con menor tangente de pérdida y así ser potencialmente imprimible.

La capacidad de absorción de agua fue evaluada para todas las formulaciones propuestas en términos del indicador porcentual de tasa de hinchamiento, obteniendo resultados variables. La significancia de este indicador recae en la etapa de maduración de los constructos bioimpresos, puesto a que está relacionada con la retención de nutrientes durante el periodo de incubación, la eliminación de residuos y el intercambio gaseoso (Schuurman, 2013). Sin embargo, tasas excesivas impactan negativamente sobre la porosidad (reduciendo el tamaño de poro) y sobre la geometría macroscópica del constructo, aumentando sus dimensiones. Los resultados no guardan relación con el comportamiento esperado según la composición de los hidrogeles, ya que, el entrecruzamiento con CaCl_2 o la presencia de dos polímeros deberían limitar el espacio disponible en la red del hidrogel para la infiltración de moléculas de agua, resultando en menores tasas de hinchamiento.

Los hidrogeles en forma de filamento son los componentes básicos de la bioimpresión por extrusión. A la fecha, en lo que respecta al conocimiento del autor, si bien se tienen proyectos en desarrollo (ASTM WK72274), ninguna organización de estándares internacional ha aprobado un método para evaluar la fidelidad de impresión de biotintas para bioimpresión basada en extrusión. Por ello, fue fundamental proponer un conjunto de ensayos para evaluar esta capacidad cada una de las formulaciones.

El primer ensayo buscó determinar un perfil de parámetros óptimo para cada composición, en términos de la presión, velocidad y distancia en Z. En ese sentido, el criterio cualitativo priorizado fue la deposición homogénea y normal del filamento,

mientras que el cuantitativo fue la cercanía al grosor ideal. Particularmente para la selección de la presión óptima, se consideró el hipotético caso ideal en donde las formulaciones contendrían células (biotintas). Por ello, se buscó seleccionar aquellos valores de presión mínimos con los que se obtenían filamentos aceptables, sabiendo que este parámetro está relacionado con el esfuerzo de cizallamiento que experimentan las células al atravesar la boquilla y este último reduce la viabilidad celular del constructo. En lo que respecta a la selección de velocidad (de movimiento) óptima, no se identificaron criterios adicionales a tomar en cuenta para maximizar una hipotética viabilidad celular. Similarmente, la selección del valor de distancia en Z no implicó un análisis crítico pues se identificó que el grosor de filamento era independiente de parámetro.

Los resultados del ensayo de precisión de impresión (fusión de filamento) tuvieron como principal determinante al CaCl_2 concentrado al 2% por su influencia en la formación de macroporos definidos. Esto puede explicarse por el entrecruzamiento de cadenas poliméricas que es capaz de generar tanto en el alginato como en la NaCMC dado a que la conformación química ambos contiene grupos carboxilo ($-\text{COO}^-$) que forman enlaces iónicos con cationes divalentes, en este caso, Ca^{2+} . El efecto mejora cuando se combinan ambos polímeros, debido a que entre sus grupos carboxilo forman enlaces de hidrógeno (Riyajan, 2013), haciendo al hidrogel híbrido aún más estable. En ese sentido, se comprobó que la formulación $\text{C}_{20}\text{A}_{10}\text{Ca}_2$ presenta los mejores resultados en términos de sus valores de Df_r y de A_p . No obstante, las formulaciones $\text{C}_{20}\text{A}_0\text{Ca}_2$ y $\text{C}_0\text{A}_{20}\text{Ca}_0$ tuvieron resultados muy cercanos por lo que podrían también tomarse en consideración.

El ensayo de integridad de forma que evalúa el colapso del filamento es importante para determinar qué formulación es más resistente a la deformación axial del filamento debido al efecto de la gravedad. Dicho factor es clave cuando se imprimen estructuras con porosidad transversal cuyos filamentos que se extienden sobre un determinado espacio entre dos estructuras subyacentes pudiendo cerrar los poros formados en la dirección Z y comprometer la integridad estructural. Las estructuras de pilares empleadas en otras investigaciones, varían respecto a las dimensiones de los espacios, con tamaños de 1 a 16 y de 1 a 20 mm (Gonzalez-Fernandez, 2020; Nelson, 2021; Cai,

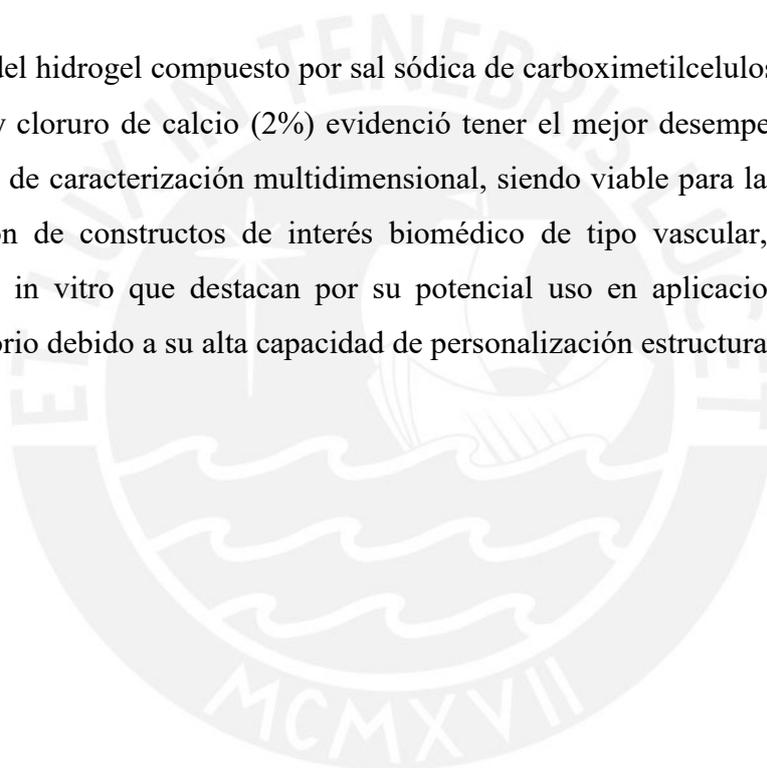
2021; Ribeiro, 2017). Sin embargo, se implementó una estructura con tamaños de 1 a 5 mm siguiendo el enfoque de la presente tesis de constructos con dimensiones reducidas que imposibilitan que su porosidad transversal interna tenga separaciones mayores a 5 mm. Los resultados demuestran que la adición de CaCl_2 tuvo un efecto positivo sobre las formulaciones, similar a lo descrito en el ensayo de precisión de impresión. El agente entrecruzante permitió que los filamentos completaran mayores distancias sin llegar a colapsar o sin presentar uniones entre pilares casi imperceptibles. Las formulaciones $\text{C}_{20}\text{A}_{10}\text{Ca}_0$ y $\text{C}_{10}\text{A}_{10}\text{Ca}_0$ llegaron a formar filamentos que terminaron rompiéndose rápidamente dando lugar a gotas situadas sobre los pilares, esto puede deberse a que las fuerzas de cohesión hidrogeles en forma de filamento fueron inferiores a la tensión adhesiva existente entre el pilar y el propio hidrogel. Nuevamente, la formulación $\text{C}_{20}\text{A}_{10}\text{Ca}_2$ fue la que describió mejores resultados según la evaluación por inspección visual realizada y los valores de su F_C .

En base a los resultados obtenidos se determinó que la formulación $\text{C}_{20}\text{A}_{10}\text{Ca}_2$ era la adecuada para la manufactura de los constructos tridimensionales como último ensayo de caracterización. El constructo vascular fue impreso en dirección vertical para prescindir de material de soporte, sin embargo, dado a que el diámetro interno fue menor al esperado, se deja evidencia que se requiere de la impresión multimaterial para la inclusión de una tinta de biomaterial de sacrificio particularmente en la zona interna del constructo que permita conservar el diámetro especificado en el diseño. Asimismo, no se descarta la impresión con la geometría en otra orientación. Por otro lado, el constructo orgánico se imprimió con la ayuda de material de soporte debido al hélix anatómico que representaba un voladizo según la orientación configurada. Se encontraron dimensiones aumentadas respecto al diseño preconfigurado, que pueden estar atribuidas a la expansión de la tinta de biomaterial en zonas inferiores sometidas al peso del resto de la estructura. Finalmente, respecto a la impresión del constructo para ensayos in vitro se identificó el mismo evento de expansión de la tinta de biomaterial, esto cobra mayor relevancia para este tipo de aplicación puesto a que frecuentemente se emplean técnicas de microfluídica para la interacción de sistemas vivos y no vivos, mientras menor sea la escala, más comprometida se ve la reproducibilidad y la funcionalidad de los dispositivos.

CONCLUSIONES

Se desarrollaron ensayos de caracterización multidimensionales que permitieron evaluar cualitativamente y cuantitativamente la fidelidad de impresión de una serie de tintas de biomaterial a base de sal sódica de carboximetilcelulosa, alginato y cloruro de calcio en un sistema de impresión basado en extrusión. Ante la falta de estándares aprobados y consenso en la literatura actual sobre la definición de fidelidad de impresión, este conjunto de ensayos representa una herramienta integral que se puede adoptar para múltiples aplicaciones.

El uso del hidrogel compuesto por sal sódica de carboximetilcelulosa (20%), alginato (10%) y cloruro de calcio (2%) evidenció tener el mejor desempeño general en los ensayos de caracterización multidimensional, siendo viable para la bioimpresión por extrusión de constructos de interés biomédico de tipo vascular, orgánico y para ensayos in vitro que destacan por su potencial uso en aplicaciones clínicas y de laboratorio debido a su alta capacidad de personalización estructural.



RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Todos los factores abordados tienen relevancia en la evaluación general de formulaciones de hidrogel para ser empleadas en bioimpresión por extrusión. No se debe dejar de tomar en consideración que por más excelente que sea la fidelidad de la impresión del material, es de poca utilidad como biotinta si no puede facilitar el crecimiento y la regeneración de tejidos, por ello, las decisiones tomadas fueron bajo criterios que consideraron la futura inclusión de células en el proceso para el desarrollo de prototipo con potencial de traslación al entorno clínico.

El ensayo reológico estuvo limitado a la evaluación de una única muestra, es necesario la caracterización de las ocho formulaciones propuestas para poder elaborar conjeturas y relacionar comportamientos observados en los ensayos de fidelidad de impresión con el perfil reológico de cada una de ellas. Asimismo, el rango de deformación aplicado no permitió registrar un valor de deformación crítica, por lo que se recomienda configurar un espectro más amplio en el reómetro antes de la ejecución del ensayo.

En un entorno *in vivo*, el constructo vascular debe estar en contacto con el flujo sanguíneo, cuyo pH oscila entre 7.35 y 7.45. En el ensayo de tasa de hinchamiento, se empleó agua destilada como medio líquido sobre el cual se colocaba el hidrogel a ser caracterizado. En ese sentido, el uso de solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) con pH = 7.4 en lugar de agua, sometería al material a condiciones más realistas permitiendo obtener mejores resultados.

Este trabajo fue realizado sin tener información consensuada sobre los métodos más adecuados para evaluar la fidelidad de impresión de biotintas. Como se indica en el Capítulo 1, se empleó una definición amplia que enfatiza la importancia de seguir métodos objetivos para la evaluación de aspectos para determinar la ‘imprimibilidad’ de una biotinta o tinta de biomaterial así como la influencia de los parámetros de impresión y de sus propiedades inherentes durante el proceso, independientemente la técnica que se utilice. El desarrollo de nuevas biotintas o tintas de biomaterial que realmente aporte a la manufactura de tejidos y órganos funcionales o a la creación de plataformas *in vitro* avanzadas para tratamientos de medicina personalizada o para

promover métodos alternativos de evaluación de fármacos requiere que se promuevan estándares para poder sistematizar esta característica y los protocolos puedan ser más fácilmente transferidos al entorno clínico.



BIBLIOGRAFÍA

- Ayan, B., Celik, N., Zhang, Z., Zhou, K., Kim, M. H., Banerjee, D., Wu, Y., Costanzo, F., & Ozbolat, I. T. (2020). Aspiration-assisted freeform bioprinting of pre-fabricated tissue spheroids in a yield-stress gel. *Communications Physics*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42005-020-00449-4>
- Bernal, P. N., Delrot, P., Loterie, D., Li, Y., Malda, J., Moser, C., & Levato, R. (2019). Volumetric bioprinting of complex living-tissue constructs within seconds. *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla.), 31(42), 1904209. <https://doi.org/10.1002/adma.201904209>
- Bernstein, J. L., Cohen, B. P., Lin, A., Harper, A., Bonassar, L. J., & Spector, J. A. (2018). Tissue engineering auricular cartilage using late passage human auricular chondrocytes. *Annals of Plastic Surgery*, 80(4 Suppl 4), S168–S173. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001400>
- Billiet, T., Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., & Dubruel, P. (2012). A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*, 33(26), 6020–6041. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.050>
- Bouchet, M., Gauthier, M., Maire, M., Ajji, A., & Lerouge, S. (2019). Towards compliant small-diameter vascular grafts: predictive analytical model and experiments. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 715-723.
- Caceres-Alban, J., Sanchez, M., & Casado, F. L. (2023). Bioprinting: A strategy to build informative models of exposure and disease. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 16, 594–610. <https://doi.org/10.1109/RBME.2022.3146293>
- Cai, F. F., Heid, S., & Boccaccini, A. R. (2021). Potential of Laponite® incorporated oxidized alginate–gelatin (ADA-GEL) composite hydrogels for extrusion-based 3D printing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(8), 1090-1104.
- Casanello, P., Schneider, D., Herrera, E. A., Uauy, R., & Krause, B. J. (2014). Endothelial heterogeneity in the umbilico-placental unit: DNA methylation as an innuendo of epigenetic diversity. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 49.
- Daly, A. C., Davidson, M. D., & Burdick, J. A. (2021). 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nature Communications*, 12(1), 753. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21029-2>
- de Llano, J. J. M., Fuertes, G., García-Vicent, C., Torró, I., Fayos, J. L., & Lurbe, E. (2007). Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels. *Translational research*, 149(1), 1-9.
- Eble, J., & Niland, S. (2009). The Extracellular Matrix of Blood Vessels. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 15, Issue 12, pp. 1385–1400). <https://doi.org/10.2174/138161209787846757>

- Egorova, A. D., DeRuiter, M. C., De Boer, H. C., Van De Pas, S., Groot, A. C. G., Van Zonneveld, A. J., Poelmann, R. E., & Hierck, B. P. (2011). Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 48(1), 21–29. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9470-z>
- Ergun, R., Guo, J., & Huebner-Keese, B. (2016). Cellulose. En Elsevier eBooks (pp. 694–702). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00127-6>
- Fisch, P., Broguiere, N., Finkielstein, S., Linder, T., & Zenobi-Wong, M. (2021). Bioprinting of cartilaginous auricular constructs utilizing an enzymatically crosslinkable bioink. *Advanced Functional Materials*, 31(16), 2008261. <https://doi.org/10.1002/adfm.202008261>
- Gaggi, G., Izzicupo, P., Di Credico, A., Sancilio, S., Di Baldassarre, A., & Ghinassi, B. (2019). Spare parts from discarded materials: Fetal annexes in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1573.
- Galindo-Rosales, F. J., Rubio-Hernández, F. J., & Angermann, L. (2010). Numerical simulation in steady flow of non-newtonian fluids in pipes with circular cross-section. *Numerical Simulations—Examples and Applications in Computational Fluid Dynamics*, 20.
- Gao, G., Park, J. Y., Kim, B. S., Jang, J., & Cho, D. W. (2018). Coaxial cell printing of freestanding, perfusable, and functional in vitro vascular models for recapitulation of native vascular endothelium pathophysiology. *Advanced healthcare materials*, 7(23), 1801102.
- Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A. G., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2), 022003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d>
- Gillispie, G. J., Prim, P., Copus, J., Fisher, J. P., Mikos, A. G., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2), 022003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d>
- Gonzales, K. (2019). Síntesis de hidrogeles con derivado de quitosana y caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas. Tesis de maestría en Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de Posgrado.
- Gonzalez-Fernandez, T., Tenorio, A. J., Campbell, K. T., Silva, E. A., & Leach, J. K. (2020). Evaluation of Alginate-Based Bioinks for 3D Bioprinting, Mesenchymal Stromal Cell Osteogenesis, and Application for Patient-Specific Bone Grafts. *bioRxiv*.
- Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D.-W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., Jüngst, T., Malda, J., Mironov, V. A., Nakayama, K., Ovsianikov, A., Sun, W., Takeuchi, S., Yoo, J. J., & Woodfield, T. B. F. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, 11(1), 013001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52>

- Holland, I., Logan, J., Shi, J., McCormick, C., Liu, D., & Shu, W. (2018). 3D biofabrication for tubular tissue engineering. *Bio-design and Manufacturing*, 1(2), 89-100.
- Hong, S., Kim, J. S., Jung, B., Won, C., & Hwang, C. (2019). Coaxial bioprinting of cell-laden vascular constructs using a gelatin–tyramine bioink. *Biomaterials science*, 7(11), 4578-4587.
- Hou, M., Bai, B., Tian, B., Ci, Z., Liu, Y., Zhou, G., & Cao, Y. (2021). Cartilage regeneration characteristics of human and goat auricular chondrocytes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 766363. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.766363>
- Hull, S. M., Brunel, L. G., & Heilshorn, S. C. (2022). 3D Bioprinting of Cell-Laden Hydrogels for Improved Biological Functionality. *Advanced Materials*, 34(2), 2103691.
- Hung, K. C., Tseng, C. S., Dai, L. G., & Hsu, S. H. (2016). Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 83, 156-168.
- Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Flores-Torres, S., Kort-Mascort, J., & Kinsella, J. M. (2019). Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication. *Applied Physics Reviews*, 6(1). <https://doi.org/10.1063/1.5059393>
- Jin, Y., Chai, W., & Huang, Y. (2017). Printability study of hydrogel solution extrusion in nanoclay yield-stress bath during printing-then-gelation biofabrication. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 313-325.
- Kačarević, Ž., Rider, P., Alkildani, S., Retnasingh, S., Smeets, R., Jung, O., Ivanišević, Z., & Barbeck, M. (2018). An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects. *Materials*, 11(11), 2199. <https://doi.org/10.3390/ma11112199>
- Kelly, B. E., Bhattacharya, I., Heidari, H., Shusteff, M., Spadaccini, C. M., & Taylor, H. K. (2019). Volumetric additive manufacturing via tomographic reconstruction. *Science* (New York, N.Y.), 363(6431), 1075–1079. <https://doi.org/10.1126/science.aau7114>
- Keriquel, V., Oliveira, H., Rémy, M., Ziane, S., Delmond, S., Rousseau, B., Rey, S., Catros, S., Amédée, J., Guillemot, F., & Fricain, J.-C. (2017). In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01914-x>
- Kessel, B., Lee, M., Bonato, A., Tinguely, Y., Tosoratti, E., & Zenobi-Wong, M. (2020). 3D bioprinting of macroporous materials based on entangled hydrogel microstrands. *Advanced Science*, 7(18), 2001419.
- Kesti, M., Fisch, P., Pensalfini, M., Mazza, E., & Zenobi-Wong, M. (2016). Guidelines for standardization of bioprinting: a systematic study of process parameters and their effect on bioprinted structures. *BioNanoMaterials*, 17(3-4), 193-204.

- Kim, B. S., Gao, G., Kim, J. Y., & Cho, D. W. (2019). 3D cell printing of perfusable vascularized human skin equivalent composed of epidermis, dermis, and hypodermis for better structural recapitulation of native skin. *Advanced healthcare materials*, 8(7), 1801019.
- Knowlton, S., Onal, S., Yu, C. H., Zhao, J. J., & Tasoglu, S. (2015). Bioprinting for cancer research. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.007>
- Kumar, H., & Kim, K. (2020). Stereolithography 3D Bioprinting. *En Methods in Molecular Biology* (pp. 93–108). Springer US.
- Kwak, E. A., Ahn, S., & Jaworski, J. (2015). Microfabrication of custom collagen structures capable of guiding cell morphology and alignment. *Biomacromolecules*, 16(6), 1761-1770.
- Laurent, S., Girerd, X., Mourad, J., Lacolley, P., Beck, L., Boutouyrie, P., Mignot, J., & Safar, M. E. (1994). Elastic modulus of the radial artery wall material is not increased in patients with essential hypertension. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14(7), 1223–1231. <https://doi.org/10.1161/01.atv.14.7.1223>
- Li, H., Pei, H., Wang, S., Zhang, B., Zeng, F., Liu, Y., Xie, X., Zhou, Y., Xu, L., Jia, Y., Bai, Y., Han, Y., Chen, L., He, L., Nan, X., Yue, W., & Pei, X. (2020). Arterial endothelium creates a permissive niche for expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01880-8>
- Li, N., Guo, R., & Zhang, Z. J. (2021). Bioink formulations for bone tissue regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 630488.
- Luu, N. T., Rahman, M., Stone, P. C., Rainger, G. E., & Nash, G. B. (2010). Responses of endothelial cells from different vessels to inflammatory cytokines and shear stress: evidence for the pliability of endothelial phenotype. *Journal of vascular research*, 47(5), 451-461.
- Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., Groll, J., & Huttmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(36), 5011–5028. <https://doi.org/10.1002/adma.201302042>
- Mallakpour, S., Tukhani, M., & Hussain, C. M. (2021). Recent advancements in 3D bioprinting technology of carboxymethyl cellulose-based hydrogels: Utilization in tissue engineering. *Advances in Colloid and Interface Science*, 292, 102415.
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D.-H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances*, 34(4), 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Mazzocchi, A., Devarasetty, M., Huntwork, R., Soker, S., & Skardal, A. (2018). Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver

microenvironments. *Biofabrication*, 11(1), 015003.

Montero, F. E., Rezende, R. A., Da Silva, J. V., & Sabino, M. A. (2019). Development of a smart bioink for bioprinting applications. *Frontiers in Mechanical Engineering*, 5, 56.

Montini-Ballarín, F., Calvo, D., Caracciolo, P. C., Rojo, F., Frontini, P. M., Abraham, G. A., & Guinea, G. V. (2016). Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 60, 220-233.

Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>

Naghieh, S., & Chen, X. (2021). Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(5), 564–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001>

Nelson, C., Tuladhar, S., Launen, L., & Habib, A. (2021). 3D Bio-Printability of Hybrid Pre-Crosslinked Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13481.

D O'Connell, C., Di Bella, C., Thompson, F., Augustine, C., Beirne, S., Cornock, R., ... & Wallace, G. G. (2016). Development of the Biopen: a handheld device for surgical printing of adipose stem cells at a chondral wound site. *Biofabrication*, 8(1), 015019.

Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3), 035020.

Ozbolat, I. T., Moncal, K. K., & Gudapati, H. (2017). Evaluation of bioprinter technologies. *Additive Manufacturing*, 13, 179-200.

Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., & Jungst, T. (2017). Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, 9(4), 044107.

Pedroza-González, S. C., Rodríguez-Salvador, M., Pérez Benítez, B. E., Alvarez, M. M., & Trujillo-de Santiago, G. (2021). Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress. *International journal of bioprinting*, 7(2). <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i2.337>

Priya, G., Madhan, B., Narendrakumar, U., Suresh Kumar, R. V., & Manjubala, I. (2021). In vitro and in vivo evaluation of carboxymethyl cellulose scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS omega*, 6(2), 1246-1253.

Régent, A., Ly, K. H., Lofek, S., Clary, G., Tamby, M., Tamas, N., ... & Mouthon, L. (2016). Proteomic analysis of vascular smooth muscle cells in physiological condition and in pulmonary arterial hypertension: Toward contractile versus synthetic phenotypes. *Proteomics*, 16(20), 2637-2649.

Ribeiro, A., Blokzijl, M. M., Levato, R., Visser, C. W., Castilho, M., Hennink, W. E.,

... & Malda, J. (2017). Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*, 10(1), 014102.

Riyajan, S. A., & Nuim, J. (2013). Interaction of green polymer blend of modified sodium alginate and carboxymethyl cellulose encapsulation of turmeric extract. *International Journal of Polymer Science*, 2013.

Roehm, K. D., & Madihally, S. V. (2017). Bioprinted chitosan-gelatin thermosensitive hydrogels using an inexpensive 3D printer. *Biofabrication*, 10(1), 015002.

Kyle, S., Jessop, Z. M., Tarassoli, S. P., Al-Sabah, A., & Whitaker, I. S. (2018). Assessing printability of bioinks. En *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery* (pp. 173–189). Elsevier.

Schöneberg, J., Lorenzi, F., Theek, B., Blaeser, A., Rommel, D., Kuehne, A. J. C., Kiessling, F., & Fischer, H. (2018). Engineering biofunctional in vitro vessel models using a multilayer bioprinting technique. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28715-0>

Schuurman, W., Levett, P. A., Pot, M. W., Van Weeren, P. R., Dhert, W. J., Hutmacher, D. W., Melchels, F. P., Klein, T. J., & Malda, J. (2013b). Gelatin-Methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of Tissue-Engineered cartilage constructs. *Macromolecular Bioscience*, 13(5), 551–561. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200471>

Seo, H. W., Jeong, H. E., Joo, H. J., Choi, S. C., Park, C., Kim, J. H., Choi, J. H., Cui, L., Hong, S. J., Chung, S., & Lim, D. S. (2016). Intrinsic FGF2 and FGF5 promotes angiogenesis of human aortic endothelial cells in 3D microfluidic angiogenesis system. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep28832>

Shapiro, J. M., Drinkwater, B. W., Perriman, A. W., & Fraser, M. (2021). Sonolithography: In-air ultrasonic particulate and droplet manipulation for multiscale surface patterning. *Advanced Materials Technologies*, 6(3), 2000689. <https://doi.org/10.1002/admt.202000689>

Shih, W. Y., Shih, W. H., & Aksay, I. A. (1999). Elastic and yield behavior of strongly flocculated colloids. *Journal of the American Ceramic Society*, 82(3), 616-624.

Stekelenburg, M., Rutten, M. C., Snoeckx, L. H., & Baaijens, F. P. (2009). Dynamic straining combined with fibrin gel cell seeding improves strength of tissue-engineered small-diameter vascular grafts. *Tissue Engineering Part A*, 15(5), 1081-1089.

Kyle, Stuart, Jessop, Z. M., Al-Sabah, A., & Whitaker, I. S. (2017). ‘printability’ of candidate biomaterials for extrusion based 3D printing: State-of-the-art. *Advanced Healthcare Materials*, 6(16), 1700264. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700264>

Suntornond, R., An, J., & Chua, C. K. (2017). Bioprinting of thermoresponsive hydrogels for next generation tissue engineering: a review. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(1), 1600266.

Teixeira, I., University of Minho, Mechanical Engineering Department, University of

- Minho, Campus de Azurém, Guimarães, Portugal, Castro, I., Carvalho, V., Rodrigues, C., Souza, A., Lima, R., Teixeira, S., Ribeiro, J., MEtRICs, Mechanical Engineering Department, University of Minho, Campus de Azurém, Guimarães, Portugal, ALGORITMI, Production and Systems Department, School of Engineering, University of Minho, Campus de Azurém, Guimarães, Portugal, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Bragança, Portugal, & CIMO, Campus Sta Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. (2021). Polydimethylsiloxane mechanical properties: A systematic review. *AIMS materials science*, 8(6), 952–973. <https://doi.org/10.3934/mat.2021058>
- Tomasina, C., Bodet, T., Mota, C., Moroni, L., & Camarero-Espinosa, S. (2019). Bioprinting Vasculature: Materials, Cells and Emergent Techniques. *Materials*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/ma12172701>
- Turky, G., Moussa, M. A., Hasanin, M., El-Sayed, N. S., & Kamel, S. (2021). Carboxymethyl cellulose-based hydrogel: dielectric study, antimicrobial activity and biocompatibility. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1), 17-30.
- Li, W., Wang, M., Ma, H., Chapa-Villarreal, F. A., Lobo, A. O., & Zhang, Y. S. (2023). Stereolithography apparatus and digital light processing-based 3D bioprinting for tissue fabrication. *IScience*, 26(2), 106039. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106039>
- Xu, Y., Duan, L., Li, Y., She, Y., Zhu, J., Zhou, G., Jiang, G., & Yang, Y. (2020). Nanofibrillar decellularized wharton's jelly matrix for segmental tracheal repair. *Advanced Functional Materials*, 30(14), 1910067. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910067>
- Li, Y., Liu, Y., Xun, X., Zhang, W., Xu, Y., & Gu, D. (2019). Three-dimensional porous scaffolds with biomimetic microarchitecture and bioactivity for cartilage tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(40), 36359–36370. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b12206>
- Yi, H. G., Jeong, Y. H., Kim, Y., Choi, Y. J., Moon, H. E., Park, S. H., ... & Cho, D. W. (2019). A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nature Biomedical Engineering*, 3(7), 509-519.
- Zennifer, A., Senthilvelan, P., Sethuraman, S., & Sundaramurthi, D. (2021). Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications. *Carbohydrate Polymers*, 256, 117561.