

03-025

### **BIOMATERIALS: SCAFFOLDS DEVELOPMENT FOR TISSUE ENGINEERING**

*Rubio-Valle, José Fernando* <sup>(1)</sup>; *Perez-Puyana, Víctor* <sup>(2)</sup>; *Jimenez-Rosado, Mercedes* <sup>(2)</sup>; *Rodríguez Ortíz, José Antonio* <sup>(2)</sup>; *Romero, Alberto* <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Univerisdad de Sevilla, <sup>(2)</sup> Universidad de Sevilla

Tissue Engineering is defined as the science of design and manufacture of new tissues. It is a multidisciplinary field that requires the combination of biology (responsible for the technology of cultured cells together with growth factors), with materials engineering (whose purpose is the development of 3D structures called scaffolds) for their implementation in regenerative medicine. In this sense, in the present work a device formed by a polycaprolactone (PCL) support was developed on which a gelatin matrix (GE) is deposited and, finally, on the top, a collagen-based scaffold (C) is bioprinted together with a colony of cells. Once the device has been prepared at 22 °C, the gelatin matrix is discarded in an incubation stage at 37 °C, leaving the scaffold (C) deposited on the PCL support. Finally, the PCL-scaffold assembly is taken to a stage in a bioreactor to promote cell growth. This device is mechanically and microstructurally evaluated, together with cell viability studies, considered as one step further in its application in Tissue Engineering for the reconstruction of muscle tissue.

*Keywords: tissue engineering; 3D bioprinting; scaffold; collagen; cell viability; histochemical studies*

### **DESARROLLO DE ANDAMIOS MEDIANTE BIOIMPRESIÓN 3D CON UN POTENCIAL USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

La Ingeniería Tisular se define como la ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos. Es un campo multidisciplinar que precisa de la combinación de la biología (encargada de la tecnología de células cultivadas junto con factores de crecimiento), con la ingeniería de materiales (cuyo fin es el desarrollo de estructuras 3D denominadas andamios) para su implementación en medicina regenerativa. En este sentido, en el presente trabajo se desarrolla un dispositivo formado por un soporte de policaprolactona (PCL) sobre la que se deposita una matriz de gelatina (GE) y, finalmente, en la parte superior, se bioimprime un andamio de base colágeno (C) junto con una colonia de células. Una vez elaborado el dispositivo a 22 °C, se desecha la matriz de gelatina en una etapa de incubación a 37 °C, quedando por lo tanto el andamio (C) depositado sobre el soporte de PCL, finalmente el conjunto PCL-andamio es llevado a una etapa en un biorreactor para favorecer el crecimiento celular. A este dispositivo se le evalúan las propiedades mecánicas y microestructurales, además de realizar estudios de viabilidad celular, permitiendo dar un paso más en su aplicación en Ingeniería Tisular para la reconstrucción de tejido muscular.

*Palabras clave: ingeniería de tejidos; bioimpresion 3D; andamios; colágeno; viabilidad celular; estudios histoquímicos*

Correspondencia: José Fernando Rubio Valle jrvalle@us.es



©2020 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introducción

La Ingeniería Tisular, o Ingeniería de Tejidos (IT) surgió por primera vez en los años 80, tomando como punto de partida los estudios pioneros de Yannas, y, sobre todo Vacanti, quien concibió la idea de dotar a las células de un soporte para que pudieran crecer y, en último término, formar un tejido (Dagalakis et al., 1980). No obstante, hasta el año 2000 no se obtuvo una definición de IT que fuera aceptada por la mayoría de las personas que trabajaban en el campo, definiéndose como la ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para el restablecimiento funcional de órganos alterados y la sustitución de estructuras dañadas por traumatismo y enfermedades (Reddi, 2000; Machluf y Atala, 1998). De esta forma, la IT es un campo multidisciplinar donde interactúan distintas ramas de la ciencia como pueden ser la Química, Medicina, Biología e incluso la Ingeniería. En este sentido, la IT consta esencialmente de tres elementos: las células, los factores de crecimiento, que permiten el control preciso y continuo de las condiciones de crecimiento celular, y los andamios, siendo estos últimos la plataforma de anclaje y adhesión para las células, dando lugar a su proliferación y diferenciación. Dentro de los andamios, aquellos con una determinada porosidad se han utilizado ampliamente en IT para proporcionar una estructura tridimensional para los estudios de regeneración de tejidos. Independientemente de la aplicación, la materia prima utilizada y la estructura interna del andamio tienen un efecto significativo sobre la actividad celular, por lo que es evidente que la elección de un andamio adecuado es esencial para un crecimiento celular óptimo (Sachlos y Czernuszka, 2003). Además, el andamio debe satisfacer una serie de condiciones, como ser biocompatible, tener una estructura macroscópica que imite aquel tejido que va a sustituir, tener cierta resistencia mecánica o constar de una estructura interna porosa con un determinado tamaño de poro e interconectividad. Estas últimas características influyen en la actividad celular, pues un tamaño y una distribución de poros adecuada garantizan una buena inserción y crecimiento celular en el interior del andamio, favoreciendo su biointegración.

Dichos andamios se construyen con materiales cuya naturaleza esté acorde con la función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar. Aunque los polímeros sintéticos son los que más se emplean hoy en día (Geutjes, et al., 2006) las opciones más atractivas son aquellas basadas en proteínas y polisacáridos, debido a su alta biocompatibilidad. Así, se pueden encontrar andamios de colágeno, gelatina, fibrina, elastina, alginato, quitosano, etc. No obstante, entre todas las materias primas posibles, destacan el colágeno tipo I y la gelatina que pueden adoptar multitud de estructuras, similares a las biológicas.

El colágeno tipo I, se encuentra abundantemente en la dermis, huesos y tendones. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro agrupándose, formando fibras mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas  $\alpha$  de dos tipos (llamadas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), que difieren ligeramente en su composición aminoacídica y en su secuencia (Di Lullo et al., 2002). El colágeno desnaturalizado (denominado gelatina) tiene multitud de aplicaciones, entre las que destaca su aplicación en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria (Senaratne et al., 2006).

Existe un amplio abanico de técnicas para la elaboración de andamios que van desde el autoensamblaje hasta el electrohilado, pasando por técnicas de separación de fases (Pérez-Puyana et al., 2020; Park et al., 2002). Sin embargo, en los últimos años, se está desarrollando un interés muy relevante por la impresión 3D. La bioimpresión 3D consiste, en grandes rasgos, en un proceso de construcción capa a capa de andamios tridimensionales basados en un diseño previo realizado por ordenador, estos se fabrican

de polímeros biocompatibles los cuales no producen rechazo por el cuerpo. Una vez fabricados los andamios, estos deben albergar los otros dos componentes imprescindibles en la Ingeniería de Tejidos como son las células y los factores de crecimiento. Por esto, la metodología actual de siembra 3D se realiza en biorreactores en lugar de hacer un crecimiento estático. El biorreactor recrea las condiciones propias del tejido muscular in vivo, sometiendo al andamio sembrado a la estimulación mecánica, promoviendo así de manera más eficiente la repoblación celular, la diferenciación y la remodelación del andamio diseñado (Akter, 2016; Wang et al., 2013). Tras cumplir su papel como estructura base, los andamios desaparecen porque son biodegradables.

Este trabajo es parte de la línea de investigación dedicada a la reología y procesado de geles biopoliméricos a base de proteínas y/o polisacáridos, perteneciente al grupo de investigación “Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes” (TEP-229). En este contexto, se desarrolló un dispositivo, para la fabricación de andamios basados en colágeno, utilizando la técnica de bioimpresión 3D, así como la caracterización dichos andamios desarrollados.

### **1.1 Bioimpresión 3D**

La bioimpresión 3D, a pesar de que es una técnica futurista, comenzó a desarrollarse en la década de los 90, mediante la modificación de una impresora 3D convencional. Las primeras impresiones se llevaron a cabo con distintas soluciones y células, creando así las primeras biotintas, cuyo objetivo final era formar tejidos (Seedhouse, 2014).

Posteriormente, en 1996 surge por primera vez la idea de bioimpresión 3D de órganos, con los estudios de Forgacs y Hull (Murphy y Atala, 2014). En dichos estudios se observó que las partes biológicas presentan propiedades similares entre ellas, permitiendo así, que los tejidos biológicos como las células de la sangre se puedan imprimir en cuestión de segundos.

La tendencia de la bioimpresión 3D en los últimos años se centra en dos líneas muy definidas. La primera de ellas se basa en hacer andamios permanentes, es decir prótesis. Entre los diversos estudios destacan el desarrollo de nuevos filamentos cerámicos con potenciales aplicaciones en Ingeniería de Tejidos (Rojas-Lozano et al., 2019), las nuevas prótesis otorrinolaringológicas que se consiguen gracias a las tecnologías de adquisición de imágenes avanzadas (Di Gesù et al., 2020) y las nuevas prótesis con sensores y/o actuadores (Zolfagharian et al., 2016). La segunda línea de investigación es el desarrollo de andamios biodegradables, cuya finalidad es la reconstrucción o regeneración de órganos y/o tejidos (Wu et al., 2020; Leberfingher et al., 2019).

## **2. Objetivos**

El objetivo principal del proyecto consiste en el desarrollo de un dispositivo múltiple. Para ello, se utilizó la técnica de bioimpresión 3D, desarrollando así andamios basados en colágeno, con células incorporadas. Estos andamios, además, deben presentar unas adecuadas propiedades mecánicas y morfológicas para su uso potencial en el campo de la Ingeniería de Tejidos. El dispositivo consta de un soporte de policaprolactona (PCL) sobre el que se bioimprime una matriz de gelatina (GE) y, sobre esta, un andamio de base colágeno (C). Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Fabricación de andamios con diferentes materias primas.
- Caracterización de las propiedades mecánicas y morfológicas de los andamios.
- Evaluación de la viabilidad celular de los andamios.

### 3. Metodología

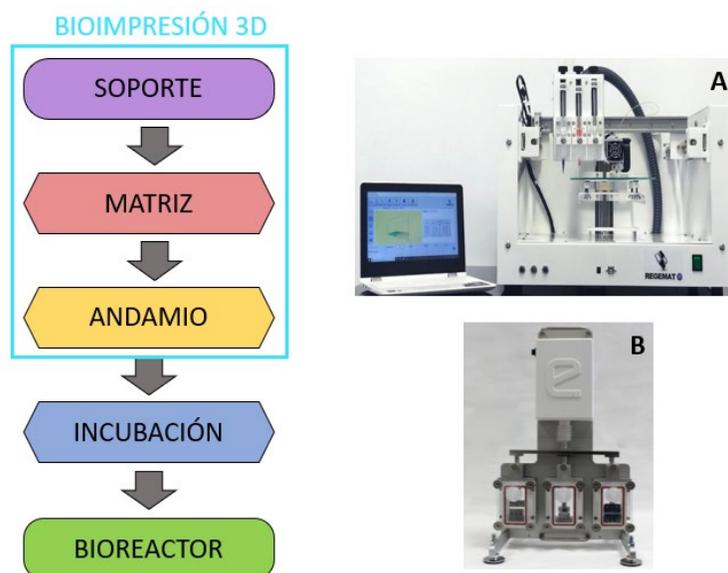
#### 3.1 Materiales

El **soporte** es fabricado de policaprolactona de alto peso molecular (50.000 g/mol) y es suministrado por la empresa 3D4MAKERS (Holanda). Para la **matriz** se ha utilizado un concentrado proteico de gelatina (G) procedente de la empresa HERNAN BOOM GELTAIN CO. LTD. (China). La ficha técnica indica que se trata de tipo II, la cual tiene un índice de Bloom comprendido entre 80-120 y posee un porcentaje de materia proteica superior al 95 % (tratándose, por tanto, de un aislado proteico) y de cenizas inferior al 1% y como disolvente ácido acético 0,05 M el cual tiene un pH ácido de 3,2 que solubiliza a la gelatina (Pérez-Puyana et al., 2019). Por último, para los **andamios** se ha utilizado un concentrado proteico de colágeno (C) suministrado por la empresa HERNAN BOOM GELTAIN CO. LTD. (China). La ficha técnica indica que se trata de colágeno tipo I, procedente de la cola del fibroblasto L-929 y posee un porcentaje de materia proteica superior al 98 % y también se usan como materias primas en menor cantidad (a'): matrigel (MG) suministrada por la empresas CORNING MATRIGEL (EE. UU.), fibrinógeno suministrado por MP BIOMEDICALS LLC (China), albumina de suero bovino suministrada por SIGMA-ALDRICH (Alemania) y por último, trombina suministrada por SIGMA-ALDRICH (Alemania).

#### 3.2 Procesado del dispositivo

En la Figura 1 aparece el esquema de las etapas de fabricación de los andamios con todos sus dispositivos (soporte y matriz) hasta su incubación y posterior implantación en el biorreactor. El dispositivo está formado por: el andamio de base de colágeno que va colocado sobre una matriz de gelatina que a su vez se inyecta sobre un soporte de PCL y que permitirá que el andamio una vez colocado sobre el mismo se puedan someter a esfuerzos periódicos de tracción permitiendo así el crecimiento de células. Cabe destacar que en todo momento se controla las condiciones ambientales, tanto la temperatura como la humedad, ya que se realiza en un quirófano. Para el desarrollo del dispositivo se ha empleado bioimpresora 3D de la marca comercial REGEMAT 3D S.L. (España), tal y como se puede observar en la Figura 1.A.

**Figura 1. Esquema del proceso de fabricación del andamio. A. Bioimpresora Regemat 3D. B. Biorreactor TC3**



El **soporte** tiene la función de servir de plataforma de anclaje del conjunto que forman la matriz-andamio y ayudar a que no pierda el andamio la integridad cuando se estimulen las células en el biorreactor. Para la realización del soporte se ha empleado como se ha comentado anteriormente PCL como materia prima, el hecho de que sea de PCL es debido a su carácter hidrofóbico, evita que se produzca la adhesión del andamio y permite su eliminación tras el proceso de crecimiento celular en el biorreactor.

Una vez que se obtiene el soporte, se inyecta (imprime) sobre éste 2 mL de la **matriz** de gelatina, la cual esta previamente preparada y colocada en la jeringuilla de la bioimpresora debido a la disposición de una serie de jeringuillas para disoluciones. Esta matriz tiene la función de servir como plataforma del andamio el cual se inyecta en la etapa posterior. Para la fabricación de la matriz se prepara una disolución de ácido acético de 20 mL al 1,5 % en peso de gelatina, una vez preparada dicha disolución, se deja en un frigorífico a 4 °C durante un periodo de 2 horas, para su gelificación.

A continuación, se inyecta un hidrogel de base colágeno (**andamio**) junto con una colonia de células sobre la matriz previamente inyectada. Para ello, se depositan unos 2 mL de la materia prima utilizada formada por colágeno (C) y los aditivos mencionados anteriormente. Para la evaluación de sus propiedades se han realizado 3 sistemas diferentes, con distintas relaciones en la composición de las materias primas tal y como se recoge en la Tabla 1.

**Tabla 1. Composición y referencia utilizada de las materias primas para la fabricación de los andamios**

Composición	Referencia
Colágeno	C
Colágeno + Matrigel	C-MG
Colágeno + Fibrinógeno + Matrigel + Albumina + Trombina	C-a'

El protocolo para realizar los distintos sistemas es el siguiente; se parte de las materias primas suministradas por el fabricante en estado líquido, se añan en un volumen de 20 mL dependiendo que sistema estemos realizando, junto con la colonia de células y, finalmente, se añade un agente reductor el cual cambia el pH y hace que los sistemas gelifiquen a temperatura ambiente.

Una vez que se tiene formado el conjunto (soporte-matriz-andamio), éste se lleva a una **incubadora** la cual es suministrada por la empresa ICT S.L. (España); las condiciones de operación son 37 °C y la duración 1 hora (Park et al., 2017). En esta etapa la matriz de gelatina se disuelve y, por consiguiente, el andamio ocupa la posición que ocupaba la matriz en el soporte; adicionalmente tiene la función de favorecer el crecimiento del cultivo celular implantado en el andamio.

Por último, se lleva al **biorreactor** para aplicarle ciclos de tracción los cuales se realizan a una frecuencia de 4,7 Hz y a la temperatura de 37 °C (Figura 1.B). El biorreactor utilizado es el modelo TC3 suministrado por la marca comercial EBERS MEDICAL TECHNOLOGY SL (España). Con este paso se busca que las células crezcan gracias a la temperatura y a las sollicitaciones mecánicas. Una vez que hayan crecido las células lo suficiente se libera el soporte del andamio en un tiempo aproximado de 10-15 días (Saber et al., 2010).

Mencionar, que el proceso de fabricación del dispositivo es un proceso que opera en continuo, es decir, partimos del diseño del soporte preestablecido, de la matriz fabricada y colocada en la jeringa correspondiente al igual que el andamio.

### 3.3. Caracterización de andamios

#### 3.3.1 Caracterización reológica

La caracterización mecánica de los andamios se realizó utilizando un analizador dinámico-mecánico (DMA), modelo RSA3 (TA Instruments, EE. UU.) El RSA3 es un equipo de deformación controlada, en el cual el motor aplica una deformación a la probeta mientras un transductor mide la fuerza generada por la resistencia de esta a ser deformada. Los ensayos se realizaron en modo de compresión, utilizando una geometría circular placa-placa de 8 mm de diámetro. Primero, se realizó un barrido por deformación entre  $2 \cdot 10^{-4}$  y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz, cuyo objetivo es determinar el rango viscoelástico lineal y la deformación crítica ( $\gamma_c$ ). Posteriormente, se llevaron a cabo barridos de frecuencia de 0,02 a 20 Hz y utilizando una tensión constante dentro del rango viscoelástico lineal estudiado anteriormente. Estos ensayos se realizaron primero a la temperatura de 22 °C (temperatura ambiente, a la cual se realiza la fabricación del andamio) y a 37 °C que es la temperatura de aplicación (temperatura de las etapas de incubación y del biorreactor para el crecimiento de las células). Por lo tanto, se estudió la evolución del módulo elástico ( $E'$ ) con frecuencia. Además, se seleccionó el módulo elástico ( $E'_5$ ) y la viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) a 5 Hz (está última calculada a partir de la Ecuación 1) para hacer una comparación adecuada entre los sistemas. El motivo de dar el módulo elástico a 5 Hz se debe a que el biorreactor trabaja con ciclos de 4,7 Hz y el de dar la viscosidad compleja es para saber cómo fluyen los sistemas en la etapa de inyección durante su fabricación.

$$\eta^* = \sqrt{\left(\frac{E''}{\omega}\right)^2 + \left(\frac{E'''}{\omega}\right)^2} \quad (1)$$

#### 3.3.2 Caracterización celular: Viabilidad celular del andamio

Se evaluó la viabilidad celular de los andamios, para ello los sistemas fueron visualizados utilizando el microscopio óptico Olympus BX-61 (Japón), con un aumento de 10x para obtener una imagen representativa de la muestra donde se puede visualizar tanto el andamio como los núcleos celulares formados. Para las tareas de análisis de las microfotografías se ha utilizado el software ImageJ versión FIJI. Para medir la viabilidad celular se utilizó la Ecuación 2.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Área celular}}{\text{Área total del andamio}} \times 100 \quad (2)$$

#### 3.3.3 Caracterización morfológica: Microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM)

Por último, se evaluó la microestructura de una matriz seleccionada utilizando criomicroscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM). Esta técnica se utiliza porque la matriz es un hidrogel que tiene un porcentaje de humedad superior al 90%, siendo imposible fijar su estructura utilizando un microscopio electrónico de barrido convencional, requiriendo así un dispositivo de fijación criogénica. Para este propósito, las matrices se introdujeron en un baño de nitrógeno líquido y luego se recubrieron con una capa muy fina de oro. Posteriormente, las matrices se observaron a través de un microscopio electrónico Zeiss EVO (EE. UU.) con un detector de electrones secundario con un voltaje de aceleración de 10 kV.

### 3.4 Análisis estadístico

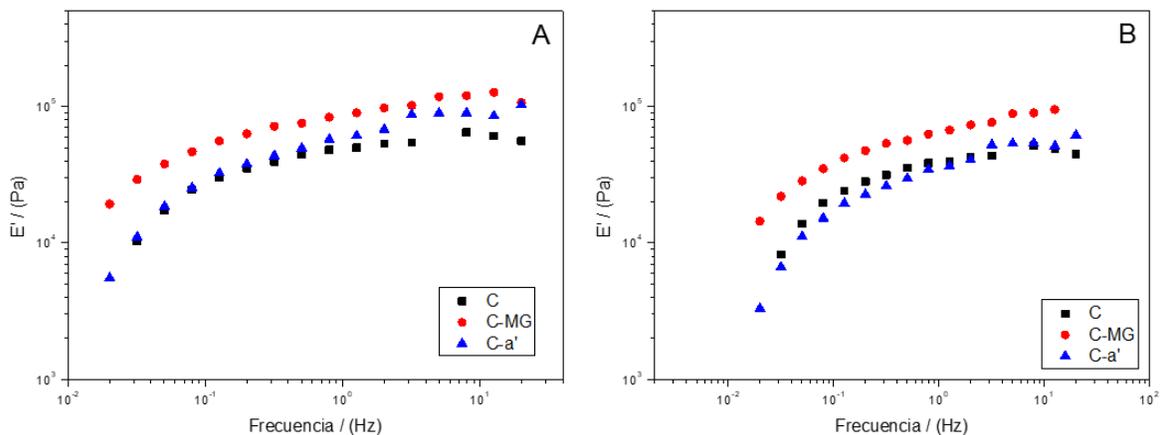
Finalmente, se llevaron a cabo tres replicados de cada medida usando análisis de varianza (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Las medias y desviaciones estándares se calcularon para todos los parámetros estudiados.

## 4. Resultados

### 4.1 Propiedades reológicas

El primer paso para caracterizar el andamio reológicamente es realizar un barrido de deformación para elegir un valor de deformación (por debajo de la deformación crítica) dentro de la región viscoelástica lineal (LVE) y hacer el barrido de frecuencia con ese valor y así asegurar que la estructura permanece prácticamente inalterable durante el ensayo. En la Figura 2 se muestran los valores de los módulos elásticos en función de la frecuencia a temperatura ambiente (Figura 2.A) y a la temperatura de aplicación (Figura 2.B) para los distintos andamios elaborados, usando las distintas relaciones de colágeno y de aditivos correspondientes a los sistemas descritos con anterioridad en la Tabla 1.

**Figura 2. Evolución del módulo elástico ( $E'$ ) en función de la frecuencia para los sistemas elaborado a la temperatura de: A. 22 °C (temperatura ambiente) y B. 37 °C (temperatura de aplicación)**



En la Figura 2.A se observa que los sistemas evaluados siguen la misma evolución, presentando una variación del módulo elástico con la frecuencia, evidenciando cierta inestabilidad con un comportamiento de gel débil. Además, se observa cómo influye la composición de las materias primas obteniendo mayores módulos para el sistema de colágeno con matrigel (C-MG). En la Figura 2.B se obtienen los módulos elásticos para el barrido de frecuencia a la temperatura de aplicación (37 °C). Se observa que los módulos son ligeramente más dependientes con la frecuencia que en la Figura 2.A (medidos a temperatura ambiente), evidenciando una mayor inestabilidad de los sistemas con la frecuencia. Como ocurre en la Figura 2.A al incrementar la frecuencia aumenta el módulo elástico, además, se observa cómo influye la composición de las materias primas utilizadas en el módulo elástico siguiendo el mismo patrón que a temperatura ambiente, es decir, el sistema que presenta mayores módulos elásticos es el sistema colágeno y matrigel (C-MG).

Con objeto de comparar los diferentes comportamientos en la Tabla 2 se muestran los valores de deformación crítica ( $\gamma_c$ ) obtenida a partir de los barridos de deformación (comentados en el apartado anterior), el  $E'_5$  y la  $\eta^*_5$  correspondientes a los valores del módulo elástico y la viscosidad compleja a la frecuencia de 5 Hz, para los ensayos realizados a temperatura ambiente (22 °C) y a la temperatura de aplicación (37 °C).

**Tabla 2. Valores de la deformación crítica ( $\gamma_c$ ), del módulo elástico ( $E'_5$ ) y de la viscosidad compleja ( $\eta^*_5$ ) a 5 Hz para los andamios elaborados con las distintas relaciones de colágeno (C), colágeno-matrigel (C-MG) y colágeno-aditivos (C-a') para los ensayos a temperatura ambiente (22 °C) y a la temperatura de aplicación (37 °C)**

Temperatura	Composición	$\gamma_c$ (%)	$E'_5$ (MPa)	$\eta^*_5$
T <sup>a</sup> 22 °C (T <sup>a</sup> ambiente)	C	0,184 <sup>a</sup>	0,035 <sup>A</sup>	1103 <sup>aa</sup>
	C-MG	0,336 <sup>b</sup>	0,118 <sup>B</sup>	2428 <sup>bb</sup>
	C-a'	0,243 <sup>c</sup>	0,091 <sup>C</sup>	3031 <sup>aa</sup>
T <sup>a</sup> 37 °C (T <sup>a</sup> aplicación)	C	0,201 <sup>d</sup>	0,027 <sup>A</sup>	-
	C-MG	0,351 <sup>e</sup>	0,085 <sup>C</sup>	-
	C-a'	0,311 <sup>f</sup>	0,054 <sup>D</sup>	-

Nota: Letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes

Primero se estudiará las propiedades obtenidas a la temperatura ambiente, se observa que el andamio que posee una mayor viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) es el C-a'. Si nos centramos ahora en los módulos elásticos a 5 Hz ( $E'_5$ ) se corrobora lo que veíamos en la Figura 2.A obteniendo mayor módulo elástico el sistema C-MG que además presenta mayores valores de deformación crítica ( $\gamma_c$ ). Por otro lado, se aprecia que los sistemas medidos a la temperatura de aplicación (37 °C), presentan un patrón similar en cuanto a las propiedades mecánicas de los sistemas medidos con anterioridad a temperatura ambiente (22 °C), produciéndose un ligero descenso de los módulos elásticos pero un aumento de la deformación crítica.

Con objeto de cuantificar y comparar la evolución de los sistemas con la temperatura, se plantea el uso del parámetro  $\beta$ , definido en la Ecuación 3, que no es más que la relación de los módulos elásticos a 5 Hz ( $E'_5$ ) de dos sistemas con la misma composición (i) y medidos a temperatura ambiente (22 °C) y a la temperatura de aplicación (37 °C). Los resultados quedan expuestos en la Tabla 3.

$$\beta = \frac{iE'_{5}(T^a 37 \text{ }^{\circ}\text{C})}{iE'_{5}(T^a 22 \text{ }^{\circ}\text{C})} \times 100 \quad (3)$$

**Tabla 3. Relación entre los módulos elásticos a 5 Hz ( $E'_5$ ) de dos sistemas con la misma composición y medidos a temperatura ambiente (22 °C) y a la de aplicación (37 °C)**

Composición	$\beta$
C	0,791
C-MG	0,847
C-a'	0,609

Se puede observar que el sistema sobre el cual el efecto de la temperatura tiene menor efecto es el de C-MG siendo éste más estable a 37 °C, esto es debido a que el valor de  $\beta$  es más próximo a 1, produciéndose un leve empobrecimiento de las propiedades (degradación) en torno a un 15 %, también se aprecia que el sistema menos estable es el de C-a' ya que éste se ha empobrecido casi un 40% con respecto al medido a 22 °C. En cualquier caso, los sistemas elaborados presentan unas propiedades mecánicas adecuadas tanto a temperatura ambiente (22 °C) como a la temperatura de aplicación (37 °C) para su uso potencial como andamio en Ingeniería de Tejidos, ya que poseen una viscosidad compleja permitida para su correcta bioimpresión, unos módulos elásticos y unas deformaciones críticas suficientemente elevadas como para soportar las sollicitaciones mecánicas que reciba el andamio en la etapa del biorreactor (De la Portilla, 2016). Por consiguiente, las propiedades mecánicas (reológicas) que poseen los sistemas no es un factor limitante a la hora de seleccionar uno de ellos como sistema de referencia, para su posterior caracterización de las propiedades morfológicas (microestructurales). Hay que mencionar que cuando los sistemas salgan de la etapa del biorreactor, estos tendrán unas propiedades completamente diferentes debido al crecimiento de las células y a la formación de los tejidos en éste.

## 4.2 Viabilidad celular

Con objeto de comparar los resultados del análisis de las micrográficas obtenidas, se utilizó el software ImageJ para evaluar la viabilidad celular de cada muestra (Tabla 4).

**Tabla 4. Valores obtenidos de viabilidad celular para los sistemas elaborados con las distintas relaciones de colágeno (C), colágeno-matrigel (C-MG) y colágeno-aditivos (C-a')**

Composición	Viabilidad celular (%)
C	22,6 <sup>A</sup>
C-MG	19,7 <sup>B</sup>
C-a'	53,0 <sup>C</sup>

Nota: Letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes

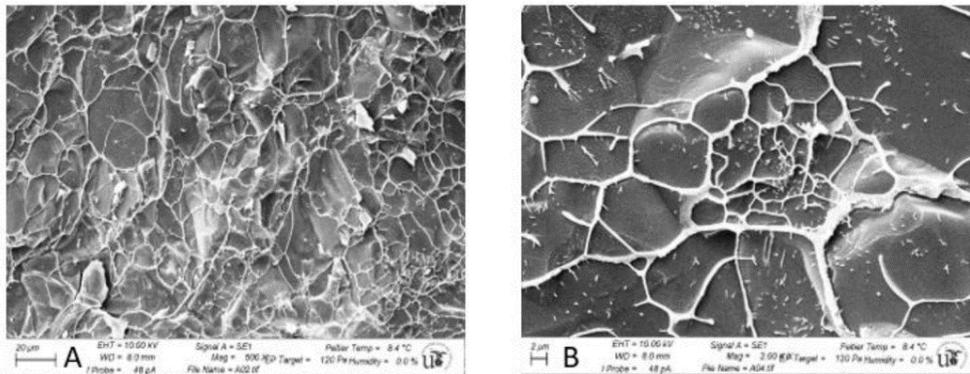
En la tabla 4 se puede apreciar que el sistema que mayor viabilidad celular presenta es el de colágeno y aditivos (C-a'), donde un 53,0 % de la colonia de células que se implantan en el andamio están vivas y son funcionales. Los sistemas de C y de C-MG presentaron una viabilidad celular similar 19,7 y 22,6 %, respectivamente, es decir que en torno al 80 % de las colonias de células que se implantaron en estos sistemas no se encuentran vivas, por tanto, no son funcionales y no pueden formar tejidos. Por consiguiente, el sistema C-a', se considera como muestra de referencia, el cual será utilizada para los posteriores ensayos de caracterización microestructural (propiedades morfológicas); puesto que presenta notablemente una mayor viabilidad celular. Esta viabilidad es un marcador predictivo para un buen funcionamiento de los futuros tejidos creados, debido al crecimiento de dicha población de células. Además, estos andamios poseen una viscosidad compleja permitida para el proceso de bioimpresión y unos módulos elásticos y deformaciones críticas suficientemente elevadas como para soportar las sollicitaciones mecánicas que reciba el andamio en la etapa del biorreactor.

### 4.3 Propiedades morfológicas

En la Figura 3 se puede observar la microestructura que presenta el sistema de referencia (C-a') que constituye macroscópicamente un hidrogel. Esta red tridimensional correspondiente a un hidrogel está formada por fibras de colágeno y de los aditivos (a') constituyen una estructura organizada donde los poros en las dos imágenes están distribuidos heterogéneamente por todo el andamio quedando, por tanto, una distribución mayoritaria de poros grandes (en forma de huecos) y una distribución minoritaria de poros pequeños; observándose una buena interconectividad entre dichos poros.

La porosidad que presenta el andamio es un parámetro fundamental y excluyente ya que dependiendo de las aplicaciones consideradas debe reunir diferentes características, pero una distribución de poros bien interconectados es necesaria en la mayoría de las aplicaciones de la Ingeniería de Tejidos con el fin de lograr un mejor transporte de nutrientes y facilitar la migración celular. También se suele requerir una porosidad elevada y una relación área superficial/volumen alta para el anclaje celular y el crecimiento de neo-tejidos así como para un transporte uniforme de células. Parámetros arquitectónicos de los poros tales como la geometría, el tamaño, la interconectividad, la orientación y la distribución también son importantes para el cultivo celular, el transporte de masa, la formación de tejido en tres dimensiones y las propiedades mecánicas teniendo en cuenta que las estructuras deben ser procesables fácilmente en estructuras tridimensionales. Todo esto nos hace indicar que la muestra de referencia de C-a', sea adecuada para las aplicaciones de la Ingeniería de Tejidos.

**Figura 3. Imágenes de Crio-SEM para el andamio de referencia de C-a'. Micrografía con una magnificación de: A. 500x y B. 2000x**



### 5. Discusión y conclusiones

En el presente trabajo se ha demostrado que es posible desarrollar un dispositivo múltiple mediante bioimpresión 3D, desarrollando así andamios con células incorporadas.

Se han construido andamios (hidrogeles) basados en colágeno con diferentes materias primas (matrigel, fibrinógeno, albúmina y trombina). De esta forma, se ha encontrado que todos los sistemas elaborados presentan unas propiedades mecánicas adecuadas ya que poseen una viscosidad compleja adecuada para su correcta bioimpresión. Además de tener unos módulos elásticos y deformaciones críticas suficientemente elevadas como para soportar las sollicitaciones mecánicas que reciba el andamio en la etapa del biorreactor. Por otro lado, los estudios de viabilidad celular muestran que el sistema que presenta notablemente una mayor viabilidad celular es el de colágeno y aditivos (C-a'), seleccionándose éste como sistema de referencia para la caracterización microestructural.

Los parámetros arquitectónicos que se obtienen en dicha caracterización denotan, que el sistema C-a' presenta unas propiedades favorables para el cultivo celular, el transporte de masa y la formación de tejido en tres dimensiones.

Se concluye por tanto que los sistemas formados por C-a' tienen una potencial aplicación como andamios en Ingeniería de Tejidos, debido a que tienen unas propiedades mecánicas y morfológicas (microestructurales) adecuadas y además presentan una buena viabilidad celular, mayor que en los otros sistemas elaborados. No obstante, es importante realizar en el futuro ensayos in vivo e in situ con este sistema, para demostrar la adecuada funcionalidad de los mismo.

### **5.1 Limitaciones encontradas y posibles líneas futuras**

La principal limitación que se encuentra en el presente viene dada por la necesidad de incluir un elemento intermedio como es la matriz, cuya finalidad es hacer posible la correcta bioimpresión del andamio sobre el soporte de PCL. Esto es debido a las características físicas que presenta el andamio, las cuales provocan que éste no pueda depositarse homogéneamente sobre el soporte.

En estudios futuros para solventar dicho problema se pretende asistir térmicamente el proceso de bioimpresión del andamio, con objeto de disminuir la viscosidad de éste durante la bioimpresión, consiguiendo, por tanto, que la deposición del andamio sobre el soporte sea homogénea en toda la superficie.

### **Agradecimientos**

Este proyecto está financiado por un proyecto MICINN (Ref.: RTI2018-097100-B-C21). Los autores también agradecen la beca predoctoral concedida a Mercedes Jiménez-Rosado (FPU2017/01718-MEFP).

### **Referencias**

- Akter, F., 2016. Tissue Engineering Made Easy. 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier.
- Dagalakis N., Flink J., Stasikelis P., Burke J.F., Yannas I.V., 1980. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *Journal of Biomedical Materials Research*, 14, 511–528.
- De la Portilla, F., Pereira, S., Molero, M., De Marco, F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A., Romero, A., 2016. Microstructural, mechanical, and histological evaluation of modified alginate-based scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(12), 3107-3114.
- Di Gesù, R., Acharya, A. P., Jacobs, I., Gottardi, R., 2020. 3D printing for tissue engineering in otolaryngology. *Connective Tissue Research*, 61(2), 117-136.
- Di Lullo G.A., Sweeney S.M., Körkkö J., Ala-Kokko L., San Antonio J.D., 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4223-423
- Geutjes P.J., Daamen W.F., Buma P., Feitz W.F., Faraj K.A., Van Kuppevelt T.H., 2006. From molecules to matrix: construction and evaluation of molecularly defined bioscaffolds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 585, 279-295.
- Machluf M., Atala A., 1998. Tissue engineering; emerging concepts. *Graft*, 1, 1-31.

- Murphy, S. V., Atala, A., 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*, 32(8), 773.
- Park, J., Lee, S. J., Chung, S., Lee, J. H., Kim, W. D., Lee, J. Y., Park, S. A., 2017. Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: characterization and evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 678-684.
- Park S.N., Park J.C., Kim H.O., Song M.J., Suh H., 2002. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23, 1205–1212.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Guerrero, A., Romero, A., 2019. Gelatin vs collagen-based sponges: evaluation of concentration, additives and biocomposites. *Journal of Polymer Research*, 26(8), 190.
- Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J. F., Jiménez-Rosado, M., Guerrero, A., Romero, A., 2020. Alternative processing methods of hybrid porous scaffolds based on gelatin and chitosan. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 102, 103472.
- Leberfinger, A. N., Dinda, S., Wu, Y., Koduru, S. V., Ozbolat, V., Ravnic, D. J., Ozbolat, I. T., 2019. Bioprinting functional tissues. *Acta biomaterialia*, 95, 32-49.
- Reddi A.H., 2000. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Engineering*, 6(4), 351-359.
- Rojas-Lozano, J., Diaz-Rodriguez, P., Barreiro, P., López-Senraa, E., Rodríguez-Valencia, C., López-Álvarez, M., Serra, J., 2019. Desarrollo de nuevos filamentos para impresión 3D basados en cerámicas bioinspiradas. *Materiales Compuestos*, 3(4), 65-69
- Saber, S., Zhang, A. Y., Ki, S. H., Lindsey, D. P., Smith, R. L., Riboh, J., Chang, J., 2010. Flexor tendon tissue engineering: bioreactor cyclic strain increases construct strength. *Tissue Engineering Part A*, 16(6), 2085-2090.
- Sachlos E., Czernuszka J.T., 2003. Making Tissue Engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, 5, 29-40.
- Seedhouse, E., 2014. *Beyond human: engineering our future evolution*. 1<sup>st</sup> Edition, Springer.
- Senaratne L.S., Park P., Kim S., 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97, 191–197.
- Wang, B., Wang, G., To, F., Butler, J. R., Claude, A., McLaughlin, R. M., Liao, J., 2013. Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations. *Langmuir*, 29(35), 11109-11117.
- Wu, Y., Ravnic, D. J., Ozbolat, I. T., 2020. Intraoperative Bioprinting: Repairing Tissues and Organs in a Surgical Setting. *Trends in Biotechnology*.
- Zolfagharian, A., Kouzani, A. Z., Khoo, S. Y., Moghadam, A. A. A., Gibson, I., Kaynak, A., 2016. Evolution of 3D printed soft actuators. *Sensors and Actuators A: Physical*, 250, 258-272.

### **Objetivos de desarrollo sostenible**

El objetivo de desarrollo sostenible (ODS) que se persigue en este trabajo es el objetivo 3, cuyo fin es, garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.