

03-043

TEST DEVICE FOR THE OPTIMISATION OF 3D BIOPRINTING

Rodríguez Rego, Jesús Manuel ⁽¹⁾; Mendoza Cerezo, Laura ⁽¹⁾; Macías García, Antonio ⁽¹⁾;
Carrasco Amador, Juan Pablo ⁽¹⁾; Marcos Romero, Alfonso Carlos ⁽¹⁾

(1) Universidad de Extremadura

3D bioprinting is a process of manufacturing functional tissues and organs from biomaterials by means of computer software that generates a 3D model. The materials used must have a balance between printability and biocompatibility. Due to these conditions and the high cost of commercial biomaterials used in 3D bioprinting, it is necessary to carry out a correct characterisation of these materials in order to analyse the usefulness of the biomaterial for the objectives, and to ensure, through the application of well-defined boundary conditions, a correct 3D bioprinting of the previously designed structure. The aim of this work is to develop a device specially designed to analyse and test the materials used for 3D bioprinting of biomimetic structures under controlled conditions of humidity, temperature, CO₂ and sterility. In this way, in addition to characterising the mechanical properties of the hydrogel in a sterile environment suitable for the subsequent incorporation of cells and defining the most suitable applications, it also provides information on the optimum conditions of pressure and temperature applied to the hydrogel, so that the extrusion is correct.

Keywords: 3D bioprinting; product engineering; printability; 3D design; optimisation; standardisation

DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA BIOIMPRESIÓN 3D

La bioimpresión 3D es un proceso de fabricación de tejidos funcionales y órganos a partir de biomateriales, por medio de un software computarizado que genera un modelo 3D. Los materiales utilizados deben tener un equilibrio entre imprimibilidad y biocompatibilidad. Debido a estos condicionantes y a que los biomateriales comerciales usados en la bioimpresión 3D tienen un alto coste, se hace necesario llevar a cabo una correcta caracterización de estos que permita, analizar la utilidad del biomaterial para los objetivos, y asegurar, mediante la aplicación de unas condiciones de contorno bien definidas, una correcta bioimpresión 3D de la estructura previamente diseñada. El objetivo de este trabajo es desarrollar un dispositivo especialmente diseñado para analizar y testear los materiales utilizados para la bioimpresión 3D de estructuras biomiméticas, en condiciones controladas de humedad, temperatura, CO₂ y esterilidad. De esta forma, además de caracterizar propiedades mecánicas del hidrogel en un entorno estéril adecuado para la posterior incorporación de células y definir las aplicaciones más convenientes, informa de las condiciones óptimas de presión y temperatura aplicadas a dicho hidrogel, para que la extrusión sea correcta.

Palabras clave: bioimpresión 3D; ingeniería de producto; imprimibilidad; diseño 3D; optimización; normalización

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) en el marco del proyecto (BIOSIMPRO) con el código 2021/00110/001.



© 2023 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 bioimpresión 3D es un proceso que consiste en la adición de capas sucesivas de biomaterial con células embebidas en su matriz (Ozolat & Yu, 2013), con la dificultad añadida de que debe realizarse en unas condiciones que aseguren su supervivencia y proliferación. Es por ello que los materiales utilizados deben tener un equilibrio entre imprimibilidad (o fidelidad de forma) y biocompatibilidad, de manera que la estructura generada posea suficiente estabilidad estructural a la vez que garantiza una alta viabilidad celular.

Debido a estos condicionantes se hace necesario llevar a cabo una correcta caracterización de los mismos que permita, en primer lugar, analizar la utilidad del biomaterial para los objetivos, y, en segundo lugar, asegurar mediante la aplicación de unas condiciones de contorno bien definidas una correcta bioimpresión 3D de la estructura previamente diseñada.

La elección de los biomateriales usados en bioimpresión 3D es compleja debido a que deben poseer propiedades muy específicas. Normalmente suelen usarse hidrogeles, polímeros hidrófilos y reticulados que pueden absorber e hincharse en agua y biofluidos, y transformarse en redes tridimensionales insolubles que les confieren propiedades elásticas cuando se someten a diferentes tensiones durante la bioimpresión (Fatimi et al., 2022). Pueden estar compuestos de materiales naturales, sintéticos o híbridos (Cha & Kim, 2017). Además, deben asegurar una correcta viabilidad celular e integridad estructural cuando se ven sometidos a condiciones de contorno específicas.

Antes de iniciar el proceso de bioimpresión 3D de estructuras, se deben realizar ciertos ensayos para determinar la estabilidad de los hidrogeles. Lo más comunes son los estudios de reometría y viscosidad y los ensayos de viabilidad celular.

La desventaja de utilizar los equipos existentes es su elevado precio, que puede estar fuera del alcance de muchos equipos de investigación (Rodríguez-Rego et al., 2023).

Por otro lado, las bioimpresoras son dispositivos que permiten imprimir los hidrogeles, pero no analizar la imprimibilidad ni la capacidad estructural de los biomateriales comúnmente utilizados para la bioimpresión.

Debido a lo anterior, se hace necesario un dispositivo capaz de analizar los biomateriales usados en bioimpresión, con el objetivo de obtener valores reproducibles y normalizables de imprimibilidad y capacidad estructural, asegurando las condiciones de esterilidad para las pruebas de viabilidad celular y salvaguardando las condiciones de contorno óptimas para el proceso de bioimpresión, para poder analizar su potencial de uso en la bioimpresión de tejidos biomiméticos.

2. Objetivos

El objetivo principal que persigue la realización de este trabajo es el desarrollo de un dispositivo capaz de caracterizar los materiales usados en la bioimpresión 3D, bajo unas condiciones controladas de temperatura, presión, humedad y CO₂, generando un informe sobre las propiedades a tener en cuenta para generar estructuras bioimpresas. De esta forma, el dispositivo podría:

- Caracterizar la imprimibilidad y diferentes características mecánicas de los biomateriales utilizados en la bioimpresión 3D.
- Obtener unos resultados reproducibles y normalizables con independencia del lugar donde se realicen las mediciones.
- Optimizar la cantidad de material a analizar.
- Permitir que grupos de investigación con bajos recursos puedan testear sus materiales mediante un equipo de menor coste que los comerciales.

3. Metodología

3.1 Materiales y software utilizados

Para la realización de este trabajo se ha utilizado el hidrogel CELLINK Start como material de partida para las pruebas de testeo, debido a que es un hidrogel asequible y que presenta unas propiedades mecánicas que permiten la ejecución de los análisis necesarios para la realización de este trabajo.

El dispositivo, previo a la fabricación, fue diseñado con un software de modelado paramétrico de sólidos en 3D (Autodesk Inventor) (Inventor Software | Autodesk, n.d.). Este programa permite la integración de datos en 2D y 3D en un único entorno, creando una representación virtual del producto final.

El hecho de tener la máquina de caracterización diseñada, posibilita la realización de cambios en forma y diseño, y la realización de prototipos sencillos en impresión 3D que usen el programa Cura (Ultimaker Cura | Ultimaker, n.d.) como software para modificar los parámetros de impresión y transformarlos a código G.

Para la realización de todas las partes estructurales y móviles se ha utilizado acero inoxidable expuesto de forma continua a una humedad elevada. Este material resulta muy interesante por su resistencia a la corrosión, conseguida por la reacción del cromo con el oxígeno que crea una capa autoprotectora pasiva muy fina (Hickethier, 1922; López Meléndez, 2012). Esta característica resulta vital debido a que las condiciones de ambientales a las que se van a ver sometidos algunas partes del dispositivo van a ser muy favorables para la formación de óxido (Gutiérrez, 2002), lo que puede conllevar a fallos mecánicos importantes y por lo tanto pérdida de precisión y utilidad del dispositivo.

La cámara que permite aislar el dispositivo del ambiente exterior está fabricada de un material plástico transparente capaz de proteger de los rayos UVC (Policarbonato Con Protección UV | Polimertecnic ©, n.d.) para la correcta visualización del proceso de testeo de materiales, y se encuentra anexa a la estructura fija, lo que permite su movimiento sobre el eje vertical de la cámara.

El resto de las partes móviles que forman el dispositivo están fabricadas mediante tecnologías de fabricación aditiva, más concretamente en resina de poliuretano semirrígido y resistente, capaz de soportar fuertes impactos. La resina PU Rigid 1000 ha sido evaluada como producto en contacto con la piel de acuerdo con la norma ISO 10993-1 y ha superado los requisitos de la norma EN ISO 10993-5 (*Materiales de Impresión 3D: Resinas Para Ingeniería* | Formlabs, n.d.).

3.2 Modo de utilización del equipo

La primera fase comienza con la colocación de un portamuestras en la cámara (Figura 1). Posteriormente, se carga el hidrogel dentro del extrusor y se cierra la cámara, permitiendo, mediante un controlador, la activación del proceso de análisis.

A continuación, una segunda fase continúa con el encendido de los ventiladores con los filtros HEPA y de la luz ultravioleta para conseguir la esterilización dentro de la cámara. Además, se activarán las resistencias térmicas, el humidificador y el generador de ozono para conseguir las condiciones ambientales deseadas.

La tercera fase consiste en dar comienzo al primer test o estudio del flujo que realiza el dispositivo. Para ello, el extrusor comienza a aumentar gradualmente la presión aplicada sobre la jeringuilla que contiene el hidrogel con el objetivo de visualizar mediante una cámara el flujo que presenta dicho hidrogel. De esta forma, siempre y cuando la fluidez del hidrogel sea la correcta, el dispositivo registra las condiciones ambientales a las cuales estaba

sometido, y la presión aplicada cuando se consiguió la fluidez buscada. El dispositivo podrá repetir el proceso a diferentes temperaturas, registrando todos los parámetros recogidos.

Figura 1: Portamuestras utilizado para el primer test.

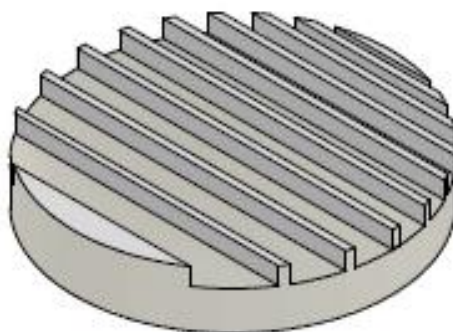


La cuarta fase consiste en la apertura de la cámara siguiendo los protocolos de esterilidad conocidos para cambiar el portamuestras por otro de las mismas características. Seguidamente, se da comienzo al test 2 o estudio de la imprimibilidad. El dispositivo, tras generar y controlar la temperatura, humedad, CO₂ y presión aplicadas, comienza a realizar la impresión de una estructura en forma de rejillas de diferentes dimensiones, mediante el control del movimiento de las plataformas móviles en todos los ejes y de la presión aplicada por extrusor sobre la jeringuilla. Esta prueba permite analizar la capacidad del hidrogel para reproducir geometrías previamente configuradas, mediante la medición y comparación cuantitativa de las áreas teóricas y las áreas reales de los polígonos generados en el interior de la rejilla. Los resultados de esta prueba quedan grabados y fotografiados por la cámara integrada en la plataforma móvil superior.

La quinta fase consiste en la sustitución del portamuestras por uno nuevo especialmente diseñado para el test de colapso (Figura 2), que comienza tras el cierre de la cámara y la nueva aplicación de las condiciones de contorno marcadas. Tras ello, comienza el test 3 o estudio de colapso. Consiste en imprimir una única línea de hidrogel sobre un portamuestras especial, conformado por una estructura con pilares a diferentes distancias. De esta forma, mediante el fotografiado final de la prueba, se visualiza la capacidad del hidrogel para generar puentes y no colapsar.

Por último, y tras terminar las pruebas, el dispositivo informa de los datos recogidos.

Figura 2: Portamuestras especialmente diseñado para su combinación con el dispositivo que se presenta en este trabajo para realizar la prueba de colapso.

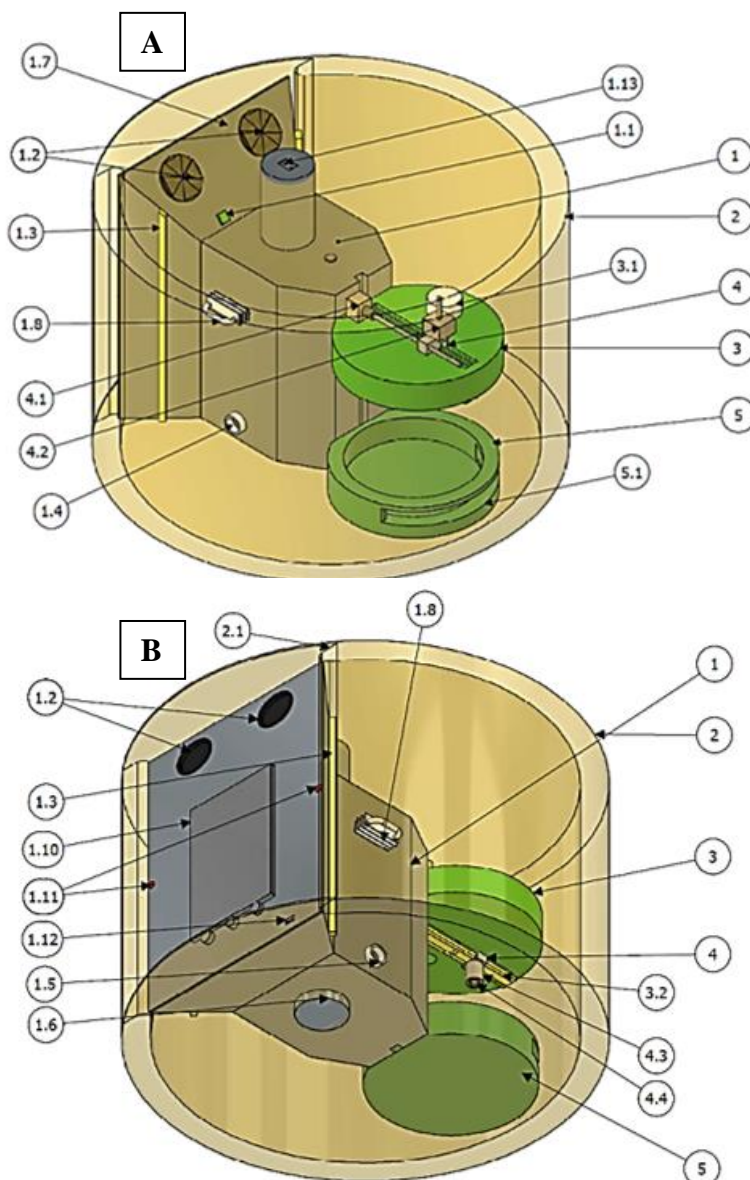


4. Resultados

4.1 Diseño del equipo y selección de cada una de las partes que lo componen

Para poder cumplir con todos los objetivos planteados, el dispositivo debe contener un sistema de filtrado de aire, una luz ultravioleta, unos medios de generación y medición de condiciones ambientales, unos medios de visualización y transmisión remota de los parámetros recogidos, una cámara, una electrónica de control, dos plataformas móviles, y un extrusor (Figura 3).

Figura 3: Máquina de caracterización de materiales diseñada con todas las partes mencionadas, con la vista delantera (A) y la trasera (B).



Las diferentes partes que componen la máquina de caracterización de materiales se indican en la Tabla 1.

Con el diseño planteado (Figura 3) y todas las partes que lo componen (Tabla 1), el equipo puede realizar medidas reproducibles y controladas de la capacidad del hidrogel para generar estructuras biomiméticas 3D.

Tabla 1: Clasificación de cada una de las partes que componen el equipo.

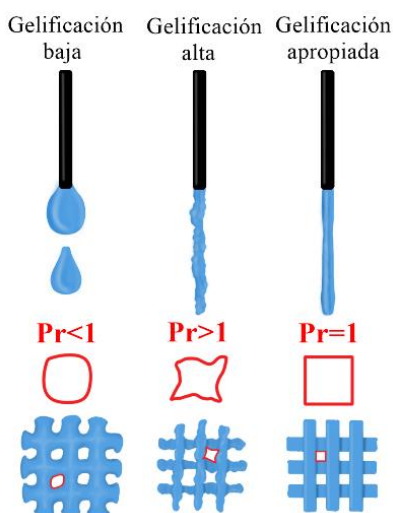
1. Estructura fija	2. Cámara	3. Soporte móvil superior	4. Extrusor	5. Soporte móvil inferior
1.1. Sensores de Temperatura, humedad y CO ₂	2.1. Apertura de la cámara	3.1. Cámara	4.1. Soporte de movimiento eje x del extrusor	5.1. Apertura del soporte móvil inferior
1.2. Ventiladores con filtro HEPA		3.2. Rieles	4.2. Accionador de presión del extrusor	
1.3. Luces ultravioletas UVC			4.3. Depósito del extrusor	
1.4. Salida de generación de humedad			4.4. Tapón del extrusor	
1.5. Salida de generación de CO ₂				
1.6. Estructura giratoria				
1.7. Cámara multifunción de la estructura fija				
1.8. Resistencia generadora de calor				
1.9. Célula refrigeradora				
1.10. Pantalla de control				
1.11. Sensores de posición				
1.12. Bus de comunicaciones				
1.13. Toma de corriente				

4.2 Resultado del proceso de caracterización de hidrogeles

Con el objetivo de comprobar la efectividad de la máquina de caracterización para ejecutar las pruebas descritas, se realizó el procedimiento del modo de funcionamiento descrito en este trabajo.

En la prueba de la visualización del estado de gelificación de un hidrogel (Figura 4), en el test 1, el dispositivo presentado fue de gran utilidad para determinar de una forma visual la gelificación que presentaba mediante el control remoto por cámara.

Figura 4: Determinación visual del estado de gelificación.

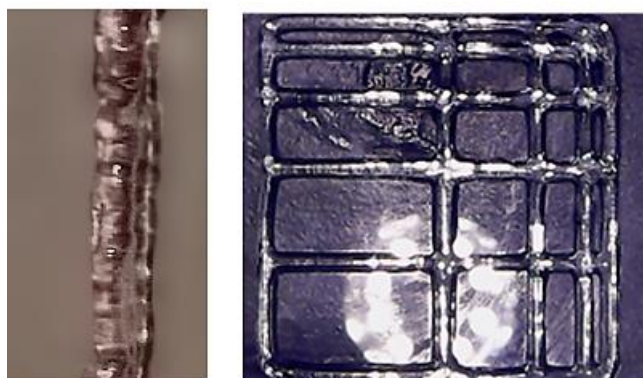


En la Figura 5 se visualiza un ejemplo de las fotografías que tomaría el dispositivo una vez depositado el hidrogel en el portamuestras de la Figura 1.

Figura 5: Visualización del estado gelificación del hidrogel. A) Se visualiza el proceso de extrusión de filamento (test 1); B) Se visualiza la grilla impresa para determinar el ángulo generado de los cuadrados (test 2).

A)

B)



Se puede observar que, para el hidrogel CELLINK Start, Pr es igual a 1, lo que implica que el estado de gelificación es el apropiado.

Tabla 2: Resultado del estado de gelación y de la desviación entre la grilla bioimpresa con el hidrogel CELLINK Start (Figura 5B) y la grilla diseñada previamente. Los resultados se presentan en milímetros.

		C1	C2	C3	C4
	Área teórica	829,22	431,02	215,52	107,75
F1	Área real	825,00	429,12	210,25	105,94
	Desviación típica	2,98	1,34	3,73	1,28
	Área teórica	647,74	337,77	168,89	84,44
F2	Área real	639,08	338,52	177,11	86,88
	Desviación típica	4,33	0,38	4,11	1,22
	Área teórica	491,70	255,58	127,61	63,89
F3	Área real	488,78	253,98	122,27	66,20
	Desviación típica	1,46	0,80	2,67	1,16
	Área teórica	321,98	167,36	83,56	41,83
F4	Área real	324,00	167,01	82,00	36,54
	Desviación típica	1,01	0,18	0,78	2,65
	Área teórica	155,14	81,16	41,18	20,29
F5	Área real	150,33	78,68	38,92	7,25
	Desviación típica	2,40	1,24	1,13	6,52

En la Tabla 2 se muestra un ejemplo del resultado que proporciona el dispositivo tras realizar los test 1 y 2 descritos en este trabajo. Se visualizan las desviaciones entre las dimensiones en milímetros de las rejillas diseñadas y las impresas y el estado de gelación del hidrogel.

Se ve claramente la capacidad del hidrogel para reproducir grillas de diferentes dimensiones, por lo que esta prueba proporciona información muy importante para conocer, de forma previa a la impresión, la idoneidad del hidrogel a la hora de generar los andamios internos que presenten la estructuras a bioimprimir. Analizando los resultados optimizamos los recursos utilizados y los resultados obtenidos.

El test 3 o prueba de colapso, mediante el uso del equipo y el portamuestras de la Figura 2, consigue determinar el coeficiente de colapso.

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

A_t^c : Área total.

A_a^c : Área generada tras depositar el filamento (área real).

Los datos obtenidos en este ensayo proporcionan una tabla para comparar diferentes hidrogeles, proporcionando así un método cuantitativo para determinar la estabilidad mecánica de los hidrogeles que permite compararlos con mayor precisión.

Los resultados de la prueba de colapso del hidrogel CELLINK Start indicaron que, para cada C_i , el resultado fue 0. Esto implica que el hidrogel no colapsó en ningún momento, y presenta una excelente capacidad para generar puentes.

4.2 Toxicidad celular

Por último, para caracterizar completamente un hidrogel y poder afirmar que es, en principio, biocompatible, se debe realizar un test de toxicidad celular. Se pueden realizar diversos test de toxicidad con numerosos tipos celulares diferentes, por lo que se propone uno de ellos que se ha considerado apto por reducir costes:

- Mezclar células HeLa, una línea celular inmortal derivada de un adenocarcinoma cervical, con el hidrogel a estudiar. Se propone esta línea celular debido a fue una de las primeras cultivadas con éxito in vitro, y ha sido ampliamente utilizada en numerosos estudios (González, 2022).
- Cultivar las células en medio DMEM (ThermoFischer) suplementado con 10% FBS (Gibco, ThermoFischer) y 1% penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich) a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂.
- Comprobar la supervivencia celular a las 24 horas mediante el ensayo LIVE/DEAD de Invitrogen™ para observar si existe viabilidad celular. Las imágenes de fluorescencia se toman con un microscopio de fluorescencia.

5. Conclusiones

La invención propuesta se refiere a un dispositivo especialmente diseñado para analizar y testear los materiales utilizados para la bioimpresión 3D de estructuras biomiméticas en condiciones controladas de humedad, temperatura, CO₂ y esterilidad. Las mayores ventajas asociadas son la polivalencia de su utilización, la optimización del material utilizado y la reproductibilidad de los resultados al realizar todas las pruebas en condiciones controladas.

Con el dispositivo de la invención se consigue una solución integral para la caracterización estandarizada de los materiales utilizados para bioimpresión 3D, optimizando la cantidad de material utilizado. Además, plantea soluciones importantes a las problemáticas que plantean los dispositivos comerciales, que necesitan de la adquisición de varios dispositivos de alto coste no especializados en la tecnología de bioimpresión 3D, lo que supone que el campo de estudio de la bioimpresión 3D necesite de altos recursos económicos y una baja reproductividad de resultados, complicando el avance científico en esta rama de investigación.

En conclusión, este dispositivo permitiría realizar una caracterización normalizada, reproducible y centrada en la bioimpresión 3D, donde los resultados se podrán visualizar de dos formas:

- Visualización remota mediante un módulo de conexión wifi conectado a un router móvil dentro de la cámara multifunción de la estructura fija (1.7) y un soporte web.
- Visualización en PC mediante la conexión del dispositivo que aquí se presenta con un ordenador mediante un bus de comunicaciones (1.12).

6. Referencias

- Cha, J., & Kim, P. (2017). Biomimetic strategies for the glioblastoma microenvironment. *Frontiers in Materials*, 4, 45. <https://doi.org/10.3389/FMATS.2017.00045/XML/NLM>
- Fatimi, A., Okoro, O. V., Podstawczyk, D., Siminska-Stanny, J., & Shavandi, A. (2022). Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review. *Gels* 2022, Vol. 8, Page 179, 8(3), 179. <https://doi.org/10.3390/GELS8030179>
- González, P. (2022). *Las células HeLa y su aportación al progreso de la ciencia* [Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/143773/GONZALEZ%20GONZALEZ-BOZA%2c%20PAULA%20%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gutiérrez, J. A. (2002). Química de Todos los Días: Un Mundo de Óxidos. *Acta Universitaria*, 12(3), 29–40.
- Hickethier, C. F. (1922). *Estudio teórico experimental sobre corrosión del hierro* [Universidad de Buenos Aires]. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n0152_Hickethier.pdf
- Inventor Software | Autodesk*. (n.d.). Retrieved December 26, 2022, from <https://www.autodesk.com/products/inventor/overview?term=1-YEAR&tab=subscription>
- López Meléndez, C. (2012). *Obtención de películas delgadas de acero inoxidable 304 y su caracterización electroquímica*. Centro de investigación en materiales avanzados, s.c.
- Materiales de impresión 3D: Resinas para ingeniería | Formlabs*. (n.d.). Retrieved April 19, 2023, from <https://formlabs.com/es/materials/engineering/>
- Ozbolat, I. T., & Yu, Y. (2013). Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 60(3), 691–699. <https://doi.org/10.1109/TBME.2013.2243912>
- Polycarbonato con protección UV | Polimertecnic* ©. (n.d.). Retrieved April 19, 2023, from <https://www.polimertecnic.com/materiales-plasticos/polycarbonato-en-placas/compacto/proteccion-uv/polycarbonato-incoloro/polycarbonato-con-proteccion-uv/>
- Rodríguez-Rego, J. M., Mendoza-Cerezo, L., Macías-García, A., Carrasco-Amador, J. P., & Marcos-Romero, A. C. (2023). Methodology for characterizing the printability of hydrogels. *International Journal of Bioprinting*, 9(2). <https://doi.org/10.18063/IJB.V9I2.667>
- Ultimaker Cura | Ultimaker*. (n.d.). Retrieved December 30, 2022, from <https://ultimaker.com/es/software/ultimaker-cura>

**Comunicación alineada con los
Objetivos de Desarrollo
Sostenible**

