

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Propuesta de un proceso para desarrollar productos de la ingeniería de tejidos por bioimpresión empleando baños de soporte tipo FRESH

Proposal of a process to develop tissue engineering products by bioprinting using FRESH-type support baths

Lizardo Torres-Ayala ^{1a}, Fanny L. Casado ^{2b*}

¹ Sección Bioingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú

² Grupo de Investigación en Dispositivos Médicos, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú

^a a20172082@pucp.edu.pe, ^b fanny.casado@pucp.edu.pe

* Autor de correspondencia

| Recibido: 15/12/22 |
| Arbitrado por pares |
| Aceptado: 26/01/23 |

Resumen

Introducción: La tecnología de la bioimpresión en tres dimensiones se está desarrollando con rapidez y, en consecuencia, existen publicaciones en diversas disciplinas que contribuyen al desarrollo científico y tecnológico de esta herramienta para la ingeniería de tejidos. Sobresale la técnica de impresión en baños de soporte FRESH, que permite la bioimpresión a microescala con alta integridad de forma que evita el colapso de las estructuras poco viscosas por efectos de la gravedad.

Objetivo: En este trabajo se busca sintetizar una serie de recomendaciones generadas a partir de la experiencia en el desarrollo de diferentes aplicaciones con énfasis en las Buenas Prácticas de Manufactura y el control de calidad necesarios para la fabricación de productos médicos de la ingeniería de tejidos. Se espera que estas recomendaciones faciliten la traslación de tecnologías propias de la ingeniería de tejidos para aplicaciones

en el campo de la medicina regenerativa.

Métodos: El presente artículo revisa una serie de artículos y normas técnicas relevantes propuestos a partir de búsquedas sistemáticas estructuradas de procesos para desarrollar este tipo de productos. Se enfatizan los ensayos recurrentes para lograr este objetivo, desde el pretratamiento de los materiales hasta el post procesado previo al almacenamiento.

Resultados: Se ha generado una propuesta para incluir Buenas Prácticas de Manufactura de productos médicos mediante ingeniería de tejidos que usen la bioimpresión con baños de soporte tipo FRESH, de manera que pueda ser replicable a diferentes escalas de producción

Conclusiones: Las bondades de la manufactura aditiva empleando baños de soporte tipo FRESH se pueden trasladar y estandarizar fácilmente para la fabricación de productos médicos hechos por ingeniería de tejidos.

Palabras claves: productos médicos de la ingeniería de tejidos, Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), bioimpresión, manufactura aditiva, baños de soporte FRESH

Abstract

Introduction: Three-dimensional bioprinting technology is developing rapidly and, consequently, there are publications in various disciplines that contribute to the scientific and technological development of this tool for tissue engineering. The printing technique using FRESH support baths stands out because it allows microscale bioprinting with high integrity while preventing the collapse of low-viscosity structures due to the effects of gravity.

Objective: This work aims to synthesize a series of recommendations generated from the experience in the development of different applications with emphasis on Good Manufacturing Practices and quality control necessary for the manufacture of tissue engineering medical products. These recommendations are expected to facilitate the translation of tissue engineering technologies for applications in the field of regenerative medicine.

Methods: This article reviews a series of articles and relevant technical standards proposed from a systematic structured search for processes to develop this type of products. Recurrent testing is emphasized to achieve this goal, from pretreatment of materials to post-processing prior to storage.

Results: A proposal has been generated to include Good Manufacturing Practices for medical products through tissue engineering that use bioprinting with FRESH-type support baths so that it can be replicated at different production scales.

Conclusions: The benefits of additive manufacturing using FRESH-type support baths can be easily transferred and standardized for the manufacture of tissue-engineered medical products.

Keywords: tissue-engineered medical products (TEMP), Good Manufacturing Practices (GMP), bioprinting, additive manufacturing, FRESH support baths

Introducción

Uno de los anhelos de la bioimpresión es esculpir la anatomía humana con una distribución espacial precisa para replicar la complejidad de los tejidos humanos y en consecuencia su función biológica. La metodología de manufactura aditiva por impresión 3D en modo de extrusión es la más utilizada por su facilidad de uso, y consiste en la agregación de células en un biomaterial, el cual será depositado desde una jeringa en un patrón capa a capa. Los biomateriales generalmente utilizados con este enfoque son altamente viscosos, con la ventaja estructural de retener la forma previamente modelada por software CAD bajo el riesgo de perder la viabilidad, adherencia, proliferación celular y maduración tisular. Sin embargo, los biomateriales que sí permiten estos últimos requerimientos tienen pobres propiedades mecánicas, generando el colapso de las estructuras bioimpresas.

La técnica de “fijación reversible de forma libre de hidrogel suspendido” (FRESH, por sus siglas en inglés) permite producir estructuras complejas con resolución a microescala, permitiendo la bioimpresión de modelos anatómicos realistas, manipulables, suturables y perfundibles (Mirdamadi et al., 2020). FRESH abre la posibilidad de usar materiales blandos sin perder la geometría por efectos de la gravedad (Rodriguez et al., 2018). En relación a estos aspectos, el continuo desarrollo de esta técnica permitirá su aplicación en ingeniería de tejidos para ser empleados en la medicina regenerativa.

El objetivo de este artículo de revisión es evaluar sistemáticamente artículos originales de bioimpresión con baños de soporte, a fin de proponer un flujo de trabajo que asegure las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) considerando variables de impresión (temperatura, presión, pH), propiedades mecánicas (módulo de almacenamiento y restauración) y viabilidad celular (proliferación y citotoxicidad celular) para proponer un flujo de trabajo para el desarrollo de “productos médicos hechos por ingeniería de tejidos” (TEMPs, por sus siglas en inglés).

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda sistemática con el objetivo de contestar a la pregunta ‘¿Cuáles son los requerimientos de calidad en la manufactura de estructuras bioimpresas en baños de soporte?’ Para ello, se revisaron dos bases de datos (SCOPUS, ScienceDirect) y todos los artículos con videos del Journal of Visualized Experiments (JoVE) empleando los términos de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (bioprinting AND (FRESH or Bath support)).

Se incluyeron artículos originales bajo los siguientes criterios de inclusión:

- (1) Los artículos están relacionados directamente con bioimpresión en FRESH.
- (2) Artículos relacionados a la manufactura de biomateriales y ensayos útiles en el manejo de BPM.

Se excluyeron resúmenes, artículos de revisión, revistas, enciclopedias y mini revisiones. Luego de leer toda la información, se procedió a proponer un flujo de trabajo actualizando la hoja de ruta presentada en el año 2015 para la fabricación de productos y tecnologías para la fabricación de TEMP's (Hunsberger et al., 2015). De manera específica, la propuesta se concentró en el post-procesamiento del andamio, el pre-procesamiento de materiales y la parametrización de la bioimpresión.

Resultados

La figura 1 muestra los resultados de la búsqueda sistemática empleando los términos: TITLE-ABS-KEY (bioprinting AND (FRESH or Bath support)).

Figura 1

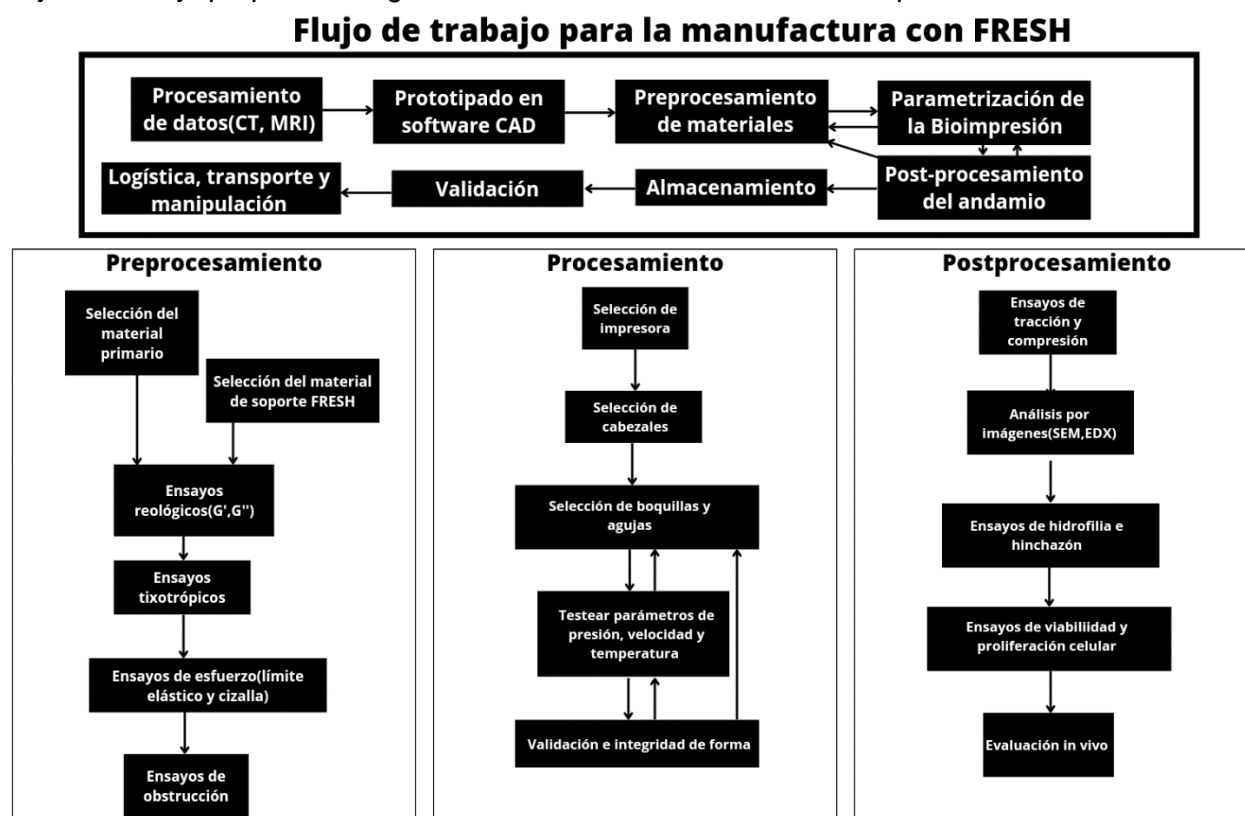
Resumen de la metodología empleada a partir de los resultados de la búsqueda avanzada según los términos TITLE-ABS-KEY (bioprinting AND (FRESH or Bath support)) en diferentes bases de datos.

Revisión de artículos originales relacionados a la manufactura de materiales para FRESH		
Identificación	SCIENCE DIRECT (n = 253) SCOPUS (n = 48) JOVE (n = 35)	Registros eliminados antes del tamizaje: Artículos eliminados por criterios de exclusión (n = 116)
Tamizaje	Registros examinados (n = 220)	Registros excluidos (n = 186) Resúmenes únicamente (n = 3) Duplicados (n = 4)
Inclusión	Estudios incluidos en la revisión (n = 38)	Artículos considerados de alta importancia (n = 4)

Luego de revisar la información contenida en 38 artículos de interés, se procedió a organizar la información para proponer un flujo de trabajo reproducible, que se inicia con el pre-procesamiento de materiales definido como el tratamiento que deberán tener los materiales previamente a su empleo en bioimpresión. A continuación, se analizan los aspectos más relevantes relacionados con *el ajuste de parámetros* a considerar durante la bioimpresión, y los ensayos necesarios para obtener la geometría deseada. Finalmente, durante el post procesamiento se describen los ensayos a realizarse después de la bioimpresión para tener un control sobre las células y su comportamiento en el constructo impreso después de los procedimientos realizados que se encuentran resumidos y contextualizados en la Figura 2.

Figura 2

Flujo de trabajo propuesto dirigido hacia el desarrollo de TEMP bioimpresión FRESH.



Pre-procesamiento de materiales

El material empleado en el baño de soporte tipo FRESH debe comportarse como fluido frente a esfuerzos cortantes para dejar un canal libre para depositar biotintas, al retirarse la aguja el material debe recuperarse y solidificarse. Si FRESH no se recupera, el material a depositar sufrirá rupturas debido a fuerzas de empuje en el fluido remanente (O'Bryan et al., 2017). Si el material del baño de soporte no se comporta como fluido, se generará una grieta permanente. Las propiedades reológicas caracterizan ambos extremos a fin de proponer nuevos baños de soporte con los requerimientos de esfuerzo necesarios (Leblanc et al., 2016).

El material más utilizado en bioimpresión directa es el *alginato* (Alg) por sus buenas propiedades mecánicas, aunque no presenta sitios de unión celular y, por ende, tiene pobre biocompatibilidad. La pobre adhesión celular en Alg se puede tratar para obtener *alginato metacrilado oxidado* (OMA, por sus siglas en inglés), material testado en FRESH, permitiendo la bioimpresión por goteo con la capacidad de criopreservar

<https://doi.org/10.54353/ritp.v3i2.e013>

células dentro del material hasta por un mes (Jeon et al., 2019).

La *gelatina* es el material más utilizado como baño de soporte. Generalmente se utiliza como material de impresión directa a la mezcla de hidrogel conocida como *gelatina-meta acrilol* (GelMA, por sus siglas en inglés) que, a diferencia del Alg, se caracteriza por su buena compatibilidad y degradabilidad, pero no integridad de forma debido a sus propiedades termo-sensibles. Una elevada temperatura genera una pobre gelificación después de la impresión, mientras que lo contrario puede ocasionar un taponamiento de la aguja de impresión (Townsend et al., 2019).

El *carbopol* es también ampliamente utilizado como baño de soporte FRESH por su comportamiento viscoelástico estable. Sin embargo, requiere cambios de pH o agregar sales para licuar el baño como, por ejemplo, una solución de tampón de fosfato y liberar el constructo impreso, lo cual limita la proliferación celular (Ning et al., 2020).

La *agarosa* parece ser un material prometedor para su uso en FRESH, ya que los enlaces de hidrógeno formados entre las partículas durante la bioimpresión sobre agarosa son suficientes para mantener la estructura impresa, posteriormente el gel puede liberar el constructo generado con la aplicación de un pequeño esfuerzo sobre el mismo (Moxon et al., 2017).

La tixotropía es la propiedad que determina la velocidad de recuperación del material luego de un esfuerzo mecánico. Consiste en repetir las pruebas reológicas en periodos oscilatorios y evaluar la capacidad de retención de forma en el tiempo, lo cual permite caracterizar la recuperación de la viscoelasticidad después de múltiples ciclos. En términos generales, el aumento de la concentración de los materiales disminuye la capacidad de reconstitución del gel (Yang et al., 2022). La *fibroína de seda* es un polímero atractivo debido a su fácil procesamiento en condiciones acuosas, cito-compatibilidad, reticulación cito-compatible y degradabilidad rápida, por lo cual suele usarse junto con baños de soporte de laponita (Rajput et al., 2022; Rodriguez et al., 2018). La *laponita* es una arcilla sintética formadora de gel que se usa industrialmente como potenciador de la viscosidad de polímeros y como estabilizador de emulsión en lociones y cremas. Se preparó FRESH con Laponita y PEG, permitiendo la bioimpresión de fibroína sin reticulación. La laponita exhibe comportamientos tixotrópicos y adelgazamiento por alto cizallamiento en concentraciones que exceden al 2%, lo que permite la deposición de proteínas en estado líquido dentro de la matriz del gel (Rodriguez et al., 2018).

Pluronic F127 es un material con capacidad de mantenerse como gel a temperatura corporal, y al llegar a los 10°C se comporta como líquido. Se utilizó en combinación con laponita para obtener un baño de soporte en presencia de iones de

Calcio. Este material compuesto tuvo el comportamiento termorreversible de Pluronic y el comportamiento tixotrópico de la laponita, permitiendo utilizar como biotinta principal materiales poco viscosos y a bajas concentraciones (Afghah et al., 2020).

Nuevas publicaciones presentan materiales como poly(N-isopropylacrylamida)(PNIPAAm), con la integridad de forma necesaria en un baño de soporte capaz de producir estructuras precisas de múltiples capas en escalas desde 80 a 200 μm (Navara et al., 2022).

Una aplicación que vale la pena mencionar son los sistemas microfluídicos conocidos como órgano en un chip, que buscan replicar fenómenos biológicos. Sin embargo, el material plástico comúnmente utilizado no recrea fielmente la matriz extracelular, por lo que se propuso combinar esta tecnología con la bioimpresión con baños de soporte utilizando como material *nano-cristales de celulosa* (CNC, por sus siglas en inglés) que, al auto ensamblarse, generan la forma de chip deseada bajo el entrecruzamiento por CaCl_2 (Afghah et al., 2020).

La aparición de hidrogeles de “doble red” (DN, por sus siglas en inglés) ha llamado mucho la atención debido a su excelente rendimiento mecánico y fácil proceso de preparación. Se desarrolló una biotinta de *nanoarcilla incorporada de doble red* (NIDN, por sus siglas en inglés) autorrecuperable, que se caracterizó y analizaron los posibles mecanismos de interacción con el *ácido hialurónico metacrilado* (HAMA, por sus siglas en inglés) y Alg para ilustrar las razones de la buena conformabilidad estructural. Se caracterizaron las redes de reticulación interna de los hidrogeles NIDN después de la solidificación, y se fabricaron diversos filamentos 1D y estructuras 3D directamente en el aire. Finalmente, el hidrogel NIDN se usó como material de soporte para micropartículas magnéticas para aplicaciones como la impresión 3D o el movimiento guiado magnético (Guo et al., 2021).

Los materiales del baño de soporte exhiben comportamientos viscoelásticos. El módulo de almacenamiento (G') describe el comportamiento elástico, mientras que el módulo de pérdida (G'') representa el comportamiento viscoso. G' y G'' se miden en el tiempo, frecuencia, deformación con el reómetro en un barrido de temperaturas, a un rango convencional entre 22 y 37°C, con frecuencias de 0.01 a 1 Hz (Polley et al., 2020). Valores mayores a 100 Pa de G' evitan el colapso del andamio (Grosskopf et al., 2018). Este parámetro se ajusta variando la concentración. Por ejemplo, agregar HAMA en laponita como nanoarcilla a varias concentraciones cambia el comportamiento del material (Guo et al., 2021). En un baño de soporte de laponita (nanoarcilla), el aumento de G' mejoró la resolución de impresión y disminuyó la rugosidad de la superficie de los filamentos impresos (Jin et al., 2017). Se evaluó también el comportamiento reológico de biotintas de GelMA al 5 % y al 10 %. Las temperaturas más bajas indujeron una tinta

más viscosa con un G'' más grande, mientras que temperaturas más altas produjeron una solución más líquida con un valor de G'' mayor. Los puntos de gelificación se identificaron como 24 y 26 °C, respectivamente (Ning et al., 2020).

Los ensayos reométricos permiten evaluar la tixotropía como los esfuerzos necesarios aplicables con las biotintas. El material del baño de soporte debe comportarse idealmente como un fluido de límite elástico cuyo comportamiento para un baño de soporte se puede describir idealmente mediante el modelo matemático de Herschel-Bulkley (Townsend et al., 2019). Un método común para evaluar a qué concentración se comporta mejor un material como baño de soporte es evaluar el esfuerzo cortante a diferentes concentraciones y velocidades de cizalla. Por ejemplo, para una tinta de agarosa, se estimó que una concentración del 5% tiene un buen desempeño como baño de soporte (Yang et al., 2022). Se mostró que cuando G' caía por debajo de G'' al incrementar el esfuerzo cortante en un ensayo reológico, el gel se comportaba como fluido. Es frecuente tomar como punto de evaluación la intersección entre G' y G'' .

Existen modelos matemáticos formulados a partir de condiciones experimentales de viscosidad y adelgazamiento por cizalla en FRESH para evaluar las mejores condiciones de un material que permita optimizar la viabilidad celular, aunque falta todavía realizar más ensayos al respecto, y con diferentes materiales que puedan validar los procesos y ecuaciones planteadas (Shah et al., 2020). El software de análisis por elementos finitos ANSYS permitió realizar simulaciones de la dinámica de fluidos utilizando viscosidad, velocidad y presión como parámetros de entrada con modelos matemáticos aplicados sobre diseños en software CAD (O'Bryan et al., 2017). La medición de la fuerza de inyección se realiza por compresión para trazar curvas de fuerza vs. desplazamiento. Soluciones de GelMA en concentraciones al 5 % y al 10 % se pipetearon por separado en una jeringa de 5 mL (volumen de GelMA de 1 mL). La fuerza aplicada en la muestra al 10 % fue de $16,7 \pm 1,2$ N, superior a la necesaria para la inyección de GelMA al 5 % ($4,4 \pm 0,3$ N). Una tinta a una concentración más alta siempre requeriría una fuerza más alta para inyectar la solución a una velocidad de flujo predefinida (Yang et al., 2022). La medición de la fuerza de inyección se realiza por compresión para trazar curvas de fuerza vs desplazamiento. Soluciones de GelMA en concentraciones al 5 % y al 10 % se pipetearon por separado en una jeringa de 5 mL (volumen de GelMA de 1 mL). La fuerza aplicada en la muestra al 10 % fue de $16,7 \pm 1,2$ N, superior a la necesaria para la inyección de GelMA al 5 % ($4,4 \pm 0,3$ N). Una tinta a una concentración más alta siempre requeriría una fuerza más alta para inyectar la solución a una velocidad de flujo predefinida (Yang et al., 2022).

En resumen, se aprecia que se debe prestar atención a diferentes características de los materiales de la biotinta así como del baño de soporte para garantizar resultados óptimos para cada aplicación. Debido a la diversidad de combinaciones posibles, es

importante apoyarse por cálculos previos y simulaciones.

Preparación de la bioimpresión: Ajuste de parámetros.

Esta sección trata los parámetros a considerar durante la bioimpresión, y los ensayos necesarios para obtener la geometría deseada. Mientras más exacta sea la estructura deseada en comparación al modelo diseñado en computadora, entonces tiene una mejor integridad de forma. La bioimpresión 3D convencional tiene una baja resolución espacial al tratar con geometrías complejas. FRESH busca depositar material con una resolución espacial elevada (Allencherry et al., 2022). Un método interesante para evaluar la integridad de forma es mediante el uso del software ImageJ para comparar el área de una cuadrícula de ensayo bioimpresa y el modelo generado en el computador (Giuseppe et al., 2018). Los primeros experimentos de bioimpresión se realizan generalmente sin células, a fin de estandarizar las condiciones para obtener una mejor integridad de forma, y después incluir células. Se puede evaluar la impresión macroscópica mediante la impresión de letras, formas exactas (cuadrados, círculos), la formación de estructuras huecas o cúbicas en FRESH (Polley et al., 2020; Pusch et al., 2018), dependiendo de los patrones más críticos del diseño.

Se recomienda un procedimiento experimental para determinar la mejor proporción de biotinta, de acuerdo al siguiente caso encontrado en la literatura para una biotinta de alginato a diferentes concentraciones de alginato de Sodio y cloruro de Calcio, a fin de obtener una mejor resolución espacial. Se registraron fotografías de muestras bioimpresas y se analizaron con una red neuronal convolucional diseñada para clasificar las bioimpresiones en buena, regular y mala calidad. Se demostró como mejor opción para obtener una elevada resolución espacial un tamaño de aguja para una punta de diámetro 14G y la concentración de alginato de Sodio al 4% con CaCl_2 como agente de entrecruzamiento al 0.3% y una presión de entre 30 y 45 kPa (Allencherry et al., 2022). Un parámetro optimizable para mejorar la integridad de forma es la densidad de relleno. Por ejemplo, al bioimprimir formas complejas tales como la forma de un delfín, la integridad de forma mejoró cuando se incrementó la densidad de relleno (Guo et al., 2021).

Las bioimpresoras generalmente utilizan jeringas de 10 mL y pequeño diámetro ($< 250 \mu\text{m}$) para minimizar la carga del extrusor. De aumentar el volumen, se pierde rendimiento y precisión al tener que utilizar boquillas de gran diámetro, por lo se debe reducir velocidad. La retracción es la capacidad de una impresora 3D para detener e invertir la extrusión antes del movimiento entre las partes. Controlar esto es importante porque evita que el material se filtre o la formación de extrusiones involuntarias, tales como hilos delgados de material que pueden reducir la integridad de la impresión. Se

han logrado diseñar extrusores de gran volumen, retraible y de código abierto, que minimizan el costo y la dificultad de uso para fabricar objetos complejos por FRESH con agujas dispensadoras de calibres altos (18 a 100 mm) (Varian & Whulanza, 2021). La literatura presenta también modificaciones de impresoras 3D convencionales, como la Prusa I3 MK3 hacia bioimpresora con la capacidad de funcionar para FRESH (Bessler et al., 2019; Engberg et al., 2021) u otros sistemas de código abierto (Ding & Chang, 2018a; Fitzsimmons et al., 2018; Honiball et al., 2021).

Durante la bioimpresión, se deben evaluar las condiciones de presión, temperatura y velocidad para que mantengan la integridad de forma. Con fibroína de seda, se probaron valores en el rango de 50-90 kPa a una velocidad de 2-200 mm/s (Rodríguez et al., 2018). Se evaluaron los resultados relacionados con la bioimpresión de estructuras tubulares dentro de un baño de soporte en un estudio paramétrico experimental para optimizar la fidelidad de la forma estructural 3D mediante el ajuste de los parámetros del proceso, incluida la altura de la capa, el caudal de extrusión, la temperatura de impresión y la velocidad del cabezal de impresión (Lewicki et al., 2019). Un método propuesto para establecer el tamaño de boquilla ideal, la velocidad de impresión y presión necesarias manteniendo bajo el esfuerzo cortante teórico es el índice de optimización de parámetros (POI) utilizado con FRESH en una bioimpresora Allevi. Este método se basa en la medición del ancho de hebras bioimpresas mediante la evaluación de diferentes velocidades y presiones. La microscopía de campo claro y fluorescente resulta vital para definir una región de interés y realizar este ensayo (Wu et al., 2022).

El post procesamiento

Esta sección trata los ensayos a realizarse después de la bioimpresión para tener un control sobre las células y su comportamiento en el constructo impreso después de los procedimientos realizados.

Es valioso caracterizar las superficies y microestructura de los materiales bioimpresos según su aplicación, por ejemplo, en la superficie externa e interna de canales vasculares. Para esto se puede utilizar la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), pues permite determinar si es que los poros están interconectados, admitiendo la recepción de nutrientes, extracción de desechos e infiltración celular antes y durante la maduración del andamio (Somasekharan et al., 2021). La SEM puede ser complementada con espectroscopia de rayos X de dispersión de energía, que permite analizar la composición estructural de regiones de interés en el constructo bioimpreso (Rodríguez et al., 2018). La preparación de muestra para SEM incluye usar nitrógeno líquido para solidificar las muestras, laminar, liofilizar y recubrir

con Oro (Rajput et al., 2022), lo cual implica una especialización dedicada solo para este fin, por lo cual existen oportunidades para el desarrollo de nuevas técnicas de caracterización superficial e interfacial.

La microtomografía computarizada resulta útil para analizar la distribución de poros en un rango amplio. Se ha descrito una correlación entre el tamaño de poro del andamio y la unión celular viable con un tamaño de poro que oscila entre 90 y 150 μm , que han influido en la unión celular y la viabilidad (Murphy & O'Brien, 2010). Poros grandes permiten un mejor intercambio de nutrientes y Oxígeno, particularmente en ausencia de vasculatura (Antoine et al., 2014; O'Brien et al., 2005). La difusión en los poros puede medirse utilizando la Recuperación de Fluorescencia Posterior al Foto-blanqueamiento. Esta técnica, conocida como FRAP por sus siglas en inglés, emplea una sonda fluorescente cuya luz se distribuye uniformemente en el medio, se blanquea localmente y se toman imágenes a lo largo del tiempo para observar el perfil de disminución de la intensidad, que se puede utilizar para calcular la difusividad del material (Ding & Chang, 2018b). Otro instrumento de mayor resolución que puede ser utilizado para medir las fuerzas en el hidrogel inmerso es el microscopio de fuerza atómica, mediante la técnica de sondas coloidales (Navara et al., 2022).

Un andamio debe ser hidrófilo para permitir la proliferación y adherencia celular con facilidad. Para esto, el ensayo del ángulo de contacto con el agua es útil a fin de analizar la capacidad de retener agua (Somasekharan et al., 2021). El hinchamiento se caracteriza por la relación de hinchamiento en diferentes puntos de tiempo. Las muestras se secan a 37 °C y se pesan. Luego, las muestras se sumergen en agua desionizada y se pesan de nuevo cada 5, 10, 15, 30 y 60 minutos (Somasekharan et al., 2021). Otra forma reportada en la literatura consiste en liofilizar una sección del andamio impreso, antes del ensayo descrito con medio de cultivo o agua (Murphy & O'Brien, 2010).

Una forma rápida de medir la viabilidad celular en un material es cultivar un grupo de células a elección en medio de cultivo convencional (grupo control), para después hacer la inmersión en la biotinta (grupo experimental) e incubar durante una hora. La tasa de supervivencia celular se calcula mediante la siguiente fórmula: $\text{tasa de supervivencia (100 \%)} = (\text{OD del grupo experimental} / \text{OD del grupo de control}) * 100 \%$ (Somasekharan et al., 2021). También es frecuente realizar ensayos de vida/muerte para observar por microscopía confocal, la distribución espacial de células vivas en diferentes capas de la estructura impresas (Polley et al., 2020).

Se pueden medir por tracción axial y radial las muestras recortadas del material impreso con experimentos de una sola vez o en ciclos repetidos hasta alcanzar la fractura. Esta información es de utilidad para medir la resistencia última a la tracción y el alargamiento previo a la rotura. Es importante que estos valores sean comparables a los

del tejido nativo. Las propiedades mecánicas de alginato-gelatina (Alg-Gel) impresas a diferentes concentraciones se pueden evaluar con ensayos de tracción uniaxial y compresión. Se encontró que las concentraciones crecientes de Alg y Gel dieron como resultado un módulo de compresión más alto, y que el comportamiento compresivo de Alg-Gel se reduce rápidamente con el tiempo, y especialmente cuando se incubaba a 37 °C (Pusch et al., 2018).

Para obtener constructos 3D con integridad de forma es necesario revisar la distribución celular, que es afectada por las propiedades reológicas del material, tal como lo demostraron Ding y Chang (Ding & Chang, 2018b) cuando evaluaron la densidad y distribución celular en función de parámetros como la temperatura y composición de los hidrogeles en distribuciones 1D, 2D y 3D, empleando como baño de soporte laponita y como biotinta Alg-Gel. La propiedad de distribución celular en un baño de soporte puede ser utilizada para cocultivar varios tipos celulares, a fin de producir esferoides u organoides autoorganizados para modelar enfermedades. Esto se probó con neuroesferoides y astrocitos colocados en un baño de soporte para crear modelos similares a un cerebro blando dentro de un biomaterial diseñado mecánicamente para imitar la rigidez del cerebro (Jalandhra et al., 2022). El grado de separación es una métrica que permite cuantificar la proliferación celular en una distribución 1D para una imagen fluorescente de filamentos cargados de células. Se realiza un análisis de intensidades a una distancia radial definida mediante procesamiento digital de señales. Un valor elevado de Gs se traduce en una mayor proliferación celular (Li et al., 2020). Extendiendo este concepto a 2 y 3 dimensiones, se demostró que una mayor cantidad de células forma agregados celulares con una distribución no uniforme. Este fenómeno se demostró debido a que, contrario a lo que se observa macroscópicamente, la biotinta no es estática, pues las células continúan moviéndose, conservándose la dinámica del fluido en la dirección de la impresión (Li et al., 2020).

Además de la distribución espacial, la proliferación y diferenciación celular pueden ser evaluadas mediante diversos métodos de histología o inmunotinción para evaluar la presencia y distribución de los factores de crecimiento, moléculas o señales de matriz seleccionadas inicialmente para dirigir la diferenciación al bioimprimir con células madre y mantener el andamio en condiciones de cultivo (Song et al., 2022).

Es vital caracterizar la integración tisular, estabilidad y maduración de un andamio impreso in vitro y las modificaciones que puede tener in vivo debido a factores como la respuesta inflamatoria o vascularización, que puede variar por la composición granular de la biotinta. Para evaluar los andamios, se recomienda caracterizar el material antes y después de la implantación en ratones. Se realiza inspección visual, buscando una coloración que indique alguna reacción inflamatoria, se realizan ensayos mecánicos e inmunotinciones, buscando cambios en la composición, formación de matriz extracelular

o mineralización. Si, tras la extracción del injerto se observa la formación de una capa fina de tejido o vascularización local sobre el mismo, esto indicaría una respuesta inmunitaria menor (Machour et al., 2022). Las estructuras capilares bioimpresas en FRESH pueden ser evaluadas mediante la implantación in vivo en ratones mediante la técnica quirúrgica del manguito de los rotadores para injertos vasculares de pequeño diámetro. Esta técnica resulta útil cuando el bioimpreso no tiene la fuerza de retención necesaria mediante microcirugía convencional (Hunsberger et al., 2015). Finalmente, se puede evaluar un implante in vivo antes y después de la implantación con microtomografía. Este método resulta bastante valioso al realizar comparaciones en medicina regenerativa, por ejemplo, en andamios porosos o no porosos para medir el tiempo efectivo de regeneración in vivo. Esto se hizo en ratones, demostrando que la porosidad es efectivamente un parámetro importante in vivo (Guo et al., 2021).

Conclusiones y discusión

El rápido desarrollo de la tecnología de bioimpresión en 3D requiere del manejo y la gestión de BPM a fin de obtener productos útiles más allá del laboratorio. En este sentido, se propuso un flujo de trabajo que puede ser utilizado como hoja de ruta en la manufactura de productos TEMP enfocados a la bioimpresión 3D con FRESH. Para esto, se presentaron brevemente diversos ensayos utilizados en artículos originales y se presentaron aquellos considerados de utilidad para tratar, evaluar y normar las BPM con FRESH. Si bien no es estricto realizar todos los ensayos mencionados, es necesario al menos tener un control a nivel material (reología y esfuerzos necesarios según su aplicación), celular (citotoxicidad, proliferación) y de instrumentación (capacidad de la bioimpresora, condiciones de presión y temperatura) que garantice la calidad y reproducibilidad de los constructos.

La bioimpresión es un término que se emplea a un gran número de procesos que, metodológicamente, pueden tener una gama de variación en cuanto al andamio y biotinta que ya se están haciendo cada vez más ubicuos y de bajo costo. Si bien existe cierta normativa técnica sobre las mejores prácticas de manufactura productos tipo TEMP, esta suele ser muy general, como la ISO/TS 21560:2020, cuyo alcance escapa a las aplicaciones clínicas y de estudios de eficacia; o sumamente específica sobre la aplicación, y tratan de manera superficial los procesos de manufactura. Por otro lado, se encuentra en preparación normativa para la producción de implantes de grado médico mediante manufactura aditiva ISO/AWI 5092. Mientras tanto, la propuesta presentada tiene la especificidad necesaria para servir como referencia a la producción de TEMPs empleando baños de soporte tipo FRESH.

Contribución de autoría

Torres-Ayala contribuyó a la conceptualización del artículo, la recolección de información y escribió el manuscrito inicial.

Casado propuso la conceptualización del artículo, revisó críticamente el primer manuscrito y preparó la versión final.

Conflictos de interés

Los autores no tienen ningún conflicto de interés que declarar.

Referencias bibliográficas

- Afghah, F., Altunbek, M., Dikyol, C., & Koc, B. (2020). Preparation and characterization of nanoclay-hydrogel composite support-bath for bioprinting of complex structures. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61606-x>
- Allencherry, J., Pradeep, N., Shrivastava, R., Joy, L., Imbriacco, F., & Özel, T. (2022). Investigation of Hydrogel and Gelatin Bath Formulations for Extrusion-Based 3D Bioprinting using Deep Learning. *Procedia CIRP*, 110(C), 360–365. <https://doi.org/10.1016/J.PROCIR.2022.06.064>
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2014). Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(6), 683–696. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2014.0086>
- Bessler, N., Ogiermann, D., Buchholz, M. B., Santel, A., Heidenreich, J., Ahmmed, R., Zaehres, H., & Brand-Saberi, B. (2019). Nydus One Syringe Extruder (NOSE): A Prusa i3 3D printer conversion for bioprinting applications utilizing the FRESH-method. *HardwareX*, 6, e00069. <https://doi.org/10.1016/J.OHX.2019.E00069>
- Ding, H., & Chang, R. C. (2018a). Printability Study of Bioprinted Tubular Structures Using Liquid Hydrogel Precursors in a Support Bath. *Applied Sciences*, 8(3), 403. <https://doi.org/10.3390/APP8030403>
- Ding, H., & Chang, R. C. (2018b). Bioprinting of Liquid Hydrogel Precursors in a Support Bath by Analyzing Two Key Features: Cell Distribution and Shape Fidelity. *ASME 2018 13th International Manufacturing Science and Engineering Conference, MSEC 2018*, 1. <https://doi.org/10.1115/MSEC2018-6675>
- Engberg, A., Stelzl, C., Eriksson, O., O'Callaghan, P., & Kreuger, J. (2021). An open

- source extrusion bioprinter based on the E3D motion system and tool changer to enable FRESH and multimaterial bioprinting. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00931-1>
- Fitzsimmons, R. E., Aquilino, M. S., Quigley, J., Chebotarev, O., Tarlan, F., & Simmons, C. A. (2018). Generating vascular channels within hydrogel constructs using an economical open-source 3D bioprinter and thermoreversible gels. *Bioprinting*, 9, 7–18. <https://doi.org/10.1016/J.BPRINT.2018.02.001>
- Giuseppe, M. Di, Law, N., Webb, B., A. Macrae, R., Liew, L. J., Sercombe, T. B., Dilley, R. J., & Doyle, B. J. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 79, 150–157. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2017.12.018>
- Grosskopf, A. K., Truby, R. L., Kim, H., Perazzo, A., Lewis, J. A., & Stone, H. A. (2018). Viscoplastic Matrix Materials for Embedded 3D Printing. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(27), 23353–23361. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B19818>
- Guo, Z., Dong, L., Xia, J., Mi, S., & Sun, W. (2021). 3D Printing Unique Nanoclay-Incorporated Double-Network Hydrogels for Construction of Complex Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, 10(11), 2100036. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202100036>
- Honiball, J. R., Pepper, M. S., & Prinsloo, E. (2021). Step-by-step assembly and testing of a low-cost bioprinting solution for research and educational purposes. *MethodsX*, 8, 101186. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2020.101186>
- Hunsberger, J., Harrysson, O., Shirwaiker, R., Starly, B., Wysk, R., Cohen, P., Allickson, J., Yoo, J., & Atala, A. (2015). Manufacturing Road Map for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Technologies. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(2), 130–135. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2014-0254>
- Jalandhra, G. K., Molley, T. G., Hung, T. tyng, Roohani, I., & Kilian, K. A. (2022). In situ formation of osteochondral interfaces through “bone-ink” printing in tailored microgel suspensions. *Acta Biomaterialia*, 156, 75–87. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2022.08.052>
- Jeon, O., Lee, Y. B., Hinton, T. J., Feinberg, A. W., & Alsberg, E. (2019). Cryopreserved cell-laden alginate microgel bioink for 3D bioprinting of living tissues. *Materials Today Chemistry*, 12, 61–70. <https://doi.org/10.1016/J.MTCHEM.2018.11.009>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.05.144>
- Leblanc, K. J., Niemi, S. R., Bennett, A. I., Harris, K. L., Schulze, K. D., Sawyer, W. G., Taylor, C., & Angelini, T. E. (2016). Stability of High Speed 3D Printing in Liquid-Like Solids. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(10), 1796–1799.

<https://doi.org/10.1021/ACSBBIOMATERIALS.6B00184>

- Lewicki, J., Bergman, J., Kerins, C., & Hermanson, O. (2019). Optimization of 3D bioprinting of human neuroblastoma cells using sodium alginate hydrogel. *Bioprinting*, 16, e00053. <https://doi.org/10.1016/J.BPRINT.2019.E00053>
- Li, Y. C. E., Jodat, Y. A., Samanipour, R., Zorzi, G., Zhu, K., Hirano, M., Chang, K., Arnaout, A., Hassan, S., Matharu, N., Khademhosseini, A., Hoorfar, M., & Shin, S. R. (2020). Toward a neurospheroid niche model: optimizing embedded 3D bioprinting for fabrication of neurospheroid brain-like co-culture constructs. *Biofabrication*, 13(1), 015014. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ABC1BE>
- Machour, M., Szklanny, A. A., & Levenberg, S. (2022). Fabrication of Engineered Vascular Flaps Using 3D Printing Technologies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2022(183), e63920. <https://doi.org/10.3791/63920>
- Mirdamadi, E., Tashman, J. W., Shiowski, D. J., Palchesko, R. N., & Feinberg, A. W. (2020). FRESH 3D Bioprinting a Full-Size Model of the Human Heart. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(11), 6453–6459. <https://doi.org/10.1021/ACSBBIOMATERIALS.0C01133>
- Moxon, S. R., Cooke, M. E., Cox, S. C., Snow, M., Jeys, L., Jones, S. W., Smith, A. M., Grover, L. M., Moxon, S. R., Smith, A. M., Cooke, M. E., Cox, S. C., Snow, M., Grover, L. M., Jones, S. W., & Jeys, L. (2017). Suspended Manufacture of Biological Structures. *Advanced Materials*, 29(13), 1605594. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201605594>
- Murphy, C. M., & O'Brien, F. J. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*, 4(3), 377–381. <https://doi.org/10.4161/CAM.4.3.11747>
- Navara, A. M., Kim, Y. S., Xu, Y., Crafton, C. L., Diba, M., Guo, J. L., & Mikos, A. G. (2022). A dual-gelling poly(N-isopropylacrylamide)-based ink and thermoreversible poloxamer support bath for high-resolution bioprinting. *Bioactive Materials*, 14, 302–312. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.11.016>
- Ning, L., Mehta, R., Cao, C., Theus, A., Tomov, M., Zhu, N., Weeks, E. R., Bauser-Heaton, H., & Serpooshan, V. (2020). Embedded 3D Bioprinting of Gelatin Methacryloyl-Based Constructs with Highly Tunable Structural Fidelity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(40), 44563–44577. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C15078>
- O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26(4), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052>
- O'Bryan, C. S., Bhattacharjee, T., Hart, S., Kabb, C. P., Schulze, K. D., Chilakala, I., Sumerlin, B. S., Sawyer, W. G., & Angelini, T. E. (2017). Self-assembled micro-organogels for 3D printing silicone structures. *Science Advances*, 3(5).

<https://doi.org/10.1126/SCIADV.1602800>

- Polley, C., Kussauer, S., David, R., Barkow, P., Mau, R., & Seitz, H. (2020). Printing of vessels for small functional tissues-A preliminary study. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 6(3), 469–472. <https://doi.org/10.1515/CDBME-2020-3121>
- Pusch, K., Hinton, T. J., & Feinberg, A. W. (2018). Large volume syringe pump extruder for desktop 3D printers. *HardwareX*, 3, 49–61. <https://doi.org/10.1016/J.OHX.2018.02.001>
- Rajput, S., Deo, K. A., Mathur, T., Lokhande, G., Singh, K. A., Sun, Y., Alge, D. L., Jain, A., Sarkar, T. R., & Gaharwar, A. K. (2022). 2D Nanosilicate for additive manufacturing: Rheological modifier, sacrificial ink and support bath. *Bioprinting*, 25, e00187. <https://doi.org/10.1016/J.BPRINT.2021.E00187>
- Rodriguez, M. J., Dixon, T. A., Cohen, E., Huang, W., Omenetto, F. G., & Kaplan, D. L. (2018). 3D freeform printing of silk fibroin. *Acta Biomaterialia*, 71, 379–387. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.02.035>
- Shah, P. P., Shah, H. B., Maniar, K. K., & Özel, T. (2020). Extrusion-based 3D bioprinting of alginate-based tissue constructs. *Procedia CIRP*, 95, 143–148. <https://doi.org/10.1016/J.PROCIR.2020.06.007>
- Somasekharan, L. T., Raju, R., Kumar, S., Geevarghese, R., Nair, R. P., Kasoju, N., & Bhatt, A. (2021). Biofabrication of skin tissue constructs using alginate, gelatin and diethylaminoethyl cellulose bioink. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 398–409. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.114>
- Song, K., Ren, B., Zhai, Y., - , al, Zuo, Q., Lu, J., Hong, A., Del Monte, G., Camerin, F., Flégeau, K., Puiggali-Jou, A., & Zenobi-Wong, M. (2022). Cartilage tissue engineering by extrusion bioprinting utilizing porous hyaluronic acid microgel bioinks. *Biofabrication*, 14(3), 034105. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/AC6B58>
- Townsend, J. M., Beck, E. C., Gehrke, S. H., Berkland, C. J., & Detamore, M. S. (2019). Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting. *Progress in Polymer Science*, 91, 126–140. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2019.01.003>
- Varian, M., & Whulanza, Y. (2021). Hydrogel-based bioprinter design with support bath as printing environment. *AIP Conference Proceedings*, 2344(1), 020020. <https://doi.org/10.1063/5.0047166>
- Wu, X., Chen, K., Chai, Q., Liu, S., Feng, C., Xu, L., & Zhang, D. (2022). Freestanding vascular scaffolds engineered by direct 3D printing with Gt-Alg-MMT bioinks. *Biomaterials Advances*, 133, 112658. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2022.112658>
- Yang, B., Liu, T., Gao, G., Zhang, X., & Wu, B. (2022). Fabrication of 3D GelMA Scaffolds Using Agarose Microgel Embedded Printing. *Micromachines*, 13(3), 469. <https://doi.org/10.3390/M13030469>