



**UNSAM**

UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

Escuela de Ciencia y Tecnología  
Lab3Bio

# GENERACIÓN DE UN SUSTRATO 3D-IMPRESO DE COLÁGENO Y QUITOSANO PARA INGENIERÍA DE TEJIDO DE PIEL

Proyecto final integrador – Ingeniería Biomédica

Ana Carolina Heidenreich

Dirección: Dra. Élide Hermida  
Codirección: Dra. Mercedes Pérez-Recalde.

SEPTIEMBRE DE 2018

# Índice

Agradecimientos .....	4
1 Introducción.....	6
1.1 Motivación .....	6
1.2 La regeneración de piel.....	6
1.3 Prevalencia e incidencia de heridas en piel y complicaciones relacionadas .....	9
1.3.1 Características de los andamios o scaffolds.....	11
1.4 Sustitutos de piel sintéticos y biológicos .....	11
1.5 Bioimpresión 3D.....	12
1.5.1 Tipos de bioimpresión.....	13
1.6 Hidrogeles .....	14
1.6.1 Colágeno .....	15
1.6.2 Quitosano.....	16
1.7 Biotintas .....	16
1.7.1 Entrecruzamiento.....	17
1.7.2 Viscosidad .....	18
1.7.3 Fidelidad de impresión.....	22
1.7.4 Hacia una biotinta para piel. ....	23
1.8 Objetivos del trabajo.....	23
1.9 Referencias.....	25
2 Materiales y métodos .....	29
2.1 Materiales precursores de hidrogeles .....	29
2.1.1 Protocolo de extracción de colágeno [1] .....	29
2.2 Caracterización de los precursores de hidrogel.....	32
2.3 Reómetro .....	33
Protocolo de medición.....	35
2.4 Bioimpresora 3D .....	37
2.5 Imprimibilidad (Pr) .....	38
2.6 Entrecruzamiento del precursor de hidrogel.....	40
2.7.1 Mezclado con NaOH 1M .....	40
2.7.2 Nebulización NaHCO <sub>3</sub> 0,8M.....	41

2.7.3	Agregado de agentes entrecruzantes NHS y EDC con nebulización de NaHCO <sub>3</sub> 0,8 M.....	41
2.7	Analizador mecánico dinámico .....	41
2.8	Estabilidad en PBS.....	42
2.9	Degradación .....	42
2.10	Caracterización morfológica .....	43
2.11	Citotoxicidad .....	43
2.12	Referencias.....	45
3	Resultados y Discusión.....	46
3.1	Polímeros .....	46
3.1.1	Obtención de colágeno a escala laboratorio. ....	46
3.1.2	Mezclas de colágeno y quitosano .....	46
3.2	Motivación estudio reológico .....	47
3.2.1	Caudal y análisis de inyectabilidad.....	47
3.2.2	Velocidad de deformación .....	48
3.3	Caracterización reológica.....	48
3.3.1	Colágeno .....	48
3.3.2	Quitosano.....	49
3.3.3	Efecto del colágeno en solución de quitosano 1%.....	50
3.3.4	Efecto del quitosano en solución de colágeno 0,36%.....	50
3.3.5	Pre-entrecruzamiento.....	51
3.4	Análisis de la bioimpresora .....	53
3.5	Imprimibilidad (Printability=Pr) .....	55
3.6	Otras características reológicas del precursor de hidrogel. ....	58
3.7	Generación de sustratos .....	60
3.7.1	Gelación simultánea de colágeno y quitosano. ....	60
3.7.2	Gelación por nebulización de NaHCO <sub>3</sub> .....	61
3.7.3	Incorporación de los agentes entrecruzantes NHS y EDC.....	63
3.8	Rigidez del sustrato .....	64
3.9	Estabilidad en PBS.....	65
3.10	Comportamiento en un entorno de biodegradación in vitro .....	65
3.11	Microestructura .....	66
3.12	Citotoxicidad .....	68
3.13	Referencias.....	70

4	Conclusiones .....	71
4.1	La tinta .....	71
4.2	Sustratos .....	71
4.3	Tecnología para la bioimpresión 3D .....	72
5	Trabajo a futuro y perspectivas .....	73
6	Anexo .....	74
	Pruebas gelificación tintas de colágeno obtenido en el laboratorio. ....	74

## Agradecimientos

Quiero mencionar a todas las personas que me apoyaron y motivaron en el trabajo que permitió el desarrollo de este documento.

A mis padres, por la diversidad y riqueza que me brindaron y contribuyó a mi forma de encarar los desafíos.

A Marina y Jorge, que siempre estuvieron para escucharme y aconsejarme.

A mi directora, Élide Hermida, por haber confiado en mí y haber estado guiando y motivando las líneas de trabajo.

A mi co-directora, Mercedes Pérez Recalde, tu optimismo, tu rigurosidad y tu presencia fueron claves para el desarrollo del trabajo.

A Ana González Wusneger por su colaboración en los ensayos de citotoxicidad.

A Alberto Bolgiani, por su carisma, incentivo y por su forma de motivarnos a trabajar en base a su experiencia en la clínica médica que siempre transmite.

A Bea y Nacho, por escuchar los problemas del día a día y responderme siempre con experiencia y conocimiento del área.

A Juli, Meli, Cami y Tomy por estar en el laboratorio y saber que estamos todos para la misma. Un agradecimiento especial a Julieta, por su predisposición y ayuda en la realización de experimentos con los hidrogeles y la bioimpresora 3D.

A Mati por haber allanado el camino con el uso de los equipos y el trabajo con hidrogeles.

A los incondicionales Angie y Mauri, siempre desde su locura y profesionalidad dándome aliento y ánimos por ver el mundo de forma hermosamente distinta.

A Pablo, por su paciencia, tiempo y por sugerirme un excelente método de toma de imágenes.

A Silvina, Cintia y el personal, por coordinar y estar siempre en temas relacionados con la infraestructura y el acceso a instalaciones del laboratorio.

A Susana y Valeria, del departamento de relaciones internacionales que facilitaron mi intercambio con la UPC durante el trabajo en el laboratorio.

A Guillermo La Mura, por haber estado desde el lugar de dirección de la carrera dando su mejor respuesta e incentivo en cada propuesta.

A Pato, por escucharme hablar de las células de la piel y el colágeno y hacerme esas preguntas tan pertinentes como oportunas y por tantas otras cosas más!

A los incondicionales Angie y Mauri, siempre desde su locura y profesionalidad dándome aliento y ánimos por ver el mundo de forma hermosamente diferente.

A Jorge, por haberme atendido todas las veces que lo llamé, haberme dado siempre todo con palabras simples.

A Marina y Jorge, que siempre estuvieron para escucharme y aconsejarme. Y por todas esas otras pequeñas cosas que he compartido siempre con ellos, sobre todo por su hermosura y su compromiso social.

A mis abuelos, por todo lo que siempre hicieron por mí, por todos los cuidados y consejos.

A mis primos y hermanos, por hacerme la segunda en situaciones límite y por motivarme a ser su ejemplo de lo bueno y de lo malo también, para evitarlo!

A mis padres, por la diversidad y riqueza que me brindaron que contribuyó a mi forma de encarar los desafíos. Porque lo que el árbol tiene de florido, vive de lo que tiene sepultado y ustedes me nutren.

**A todos**, infinitas gracias!

Ana Carolina

# 1 Introducción

## 1.1 Motivación

La ingeniería de tejidos está emergiendo como un campo interdisciplinario en la ingeniería biomédica; tiene como objetivo generar nuevo material biológico para reemplazar tejidos u órganos enfermos o dañados. Para lograr esto, no sólo se necesita la fuente de células, sino también una matriz extracelular artificial sobre la cual sembrarlas adecuadamente.

Las terapias avanzadas empleadas para el tratamiento de heridas cutáneas, tanto agudas como crónicas, se llevan a cabo empleando el conocimiento de la medicina regenerativa junto con sustitutos de piel elaborados mediante la ingeniería de tejidos. Esta ingeniería combina ciencias de la vida, ingeniería, ciencia de materiales y medicina. Por medio de sus desarrollos, intenta dar respuesta a los desafíos planteados por la pérdida de piel por quemaduras extensas o úlceras por enfermedades crónicas como la diabetes, entre otras.

Los sustratos reabsorbibles tienen como objetivo emular la estructura tridimensional de la matriz extracelular necesaria para la adhesión y proliferación de células y permitir la consecuente regeneración de tejido. Estos dispositivos deben cumplir una serie de requisitos, entre los cuales son esenciales: biodegradabilidad, biocompatibilidad y una porosidad altamente interconectada [1].

En este sentido, la tecnología de bioimpresión 3D presenta la oportunidad de trabajar con materiales que cumplen estos requisitos, como son los precursores de un hidrogel. Permite depositarlos de manera controlada, repetible y relativamente rápida, además de poder aplicarlos con células provenientes del propio paciente a tratar [2].

## 1.2 La regeneración de piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano: cubre aproximadamente 1,8 y 2 m<sup>2</sup> en una persona promedio. Protege al cuerpo de agresiones externas, además de colaborar con mantener la homeostasis, sirviendo de barrera para la prevención de pérdida de agua y la regulación de temperatura. También, es la primera línea de defensa contra agentes externos como virus y bacterias, agentes físicos y químicos y radiación UV.

Cuando la piel se daña, estas funciones se ven afectadas y el organismo es forzado a encontrar un camino para reestablecer el tejido. Las heridas que afectan a todo el grosor de la piel y los daños por quemaduras extensas son la mayor causa de morbilidad y mortalidad por lesiones de este órgano. Muchos tratamientos y métodos han sido desarrollados para reparar la piel, sin embargo, pocos han estado exentos de efectos adversos o marcas debido a una cicatrización inapropiada como formación de queloides, cicatrices con hiper o hipo-pigmentación o retracciones.

La piel está compuesta por dos capas principales: la dermis y la epidermis, como se puede ver en la figura 1.1. La capa más interna esta soportada por tejido subcutáneo, también llamado hipodermis, que contiene grasa proveedora de aislamiento, y vasos sanguíneos para el intercambio de nutrientes que necesita la piel. La dermis está compuesta por células como: fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, plaquetas y neutrófilos; proteínas como: colágenos tipo I, II, III, IV, y V, elastina y reticulina, fibronectina, laminina, vitronectina, entactina, biglicano, lumicano, sindecano y decorin; sustancias fundamentales de la matriz

extracelular: glicosaminoglicanos como el condroitin sulfato, heparan sulfato, el dermatan sulfato, el ácido hialurónico y factores de crecimiento.

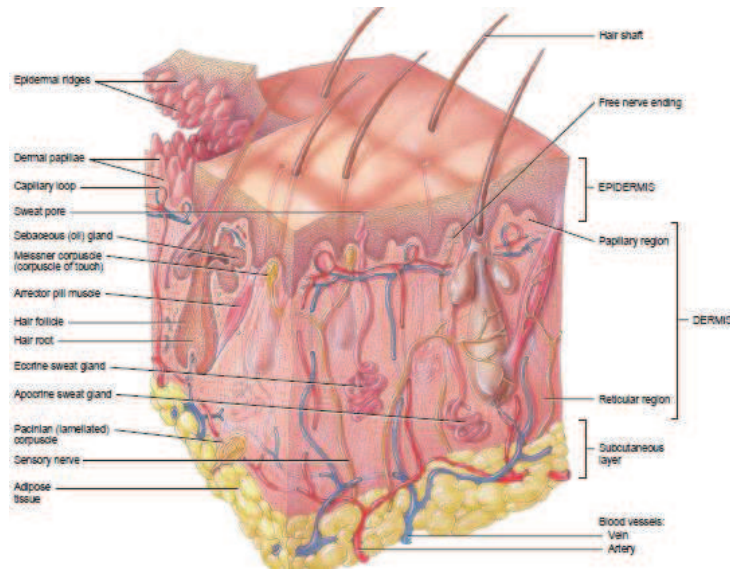


Figura 1.1: vista seccional de la piel y la capa subcutánea. [3]

La epidermis es la capa más superficial de la piel y está compuesta en un 90-95% de queratinocitos; además, posee otros tres tipos celulares con diferentes funciones: los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel, tal como se ilustra en la figura 1.2.A. Esta capa está soportada por la membrana basal que, conectada a la dermis a través de hemidesmosomas, es la responsable de la renovación de la epidermis.

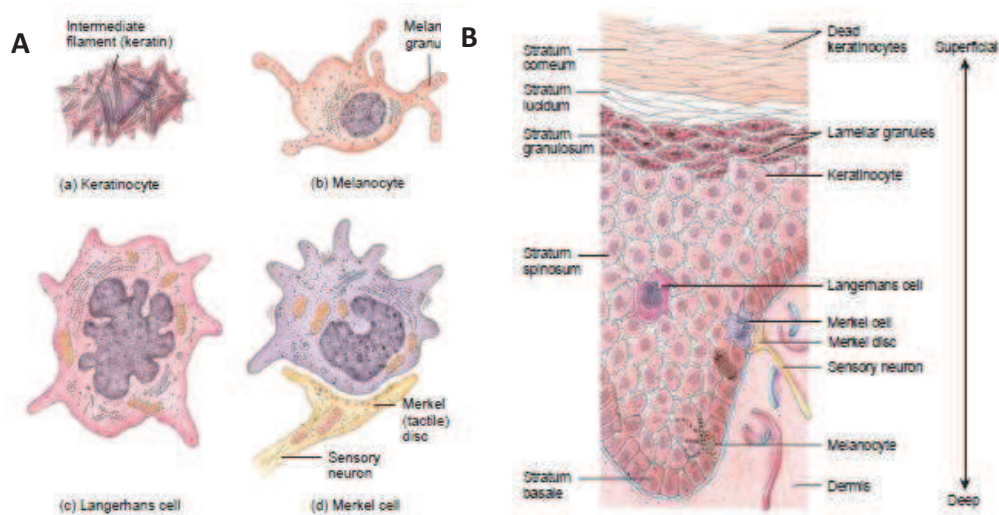


Figura 1. 1.2: A. Tipos celulares presentes en el tejido epidérmico. B. Capas presentes en la epidermis con sus cuatro tipos celulares. [3]



La epidermis es un epitelio escamoso estratificado dividido en cuatro capas: estrato basal (1), estrato espinoso (2), estrato granuloso (3), y estrato córneo (4), véase figura 1.2.B El estrato basal, donde se producen los queratinocitos, está compuesto por células basales conectadas a la dermis. El estrato espinoso es similar al estrato basal con la adición de cuerpos lamelares enriquecidos en lípidos. El estrato granuloso se caracteriza por un aumento en la síntesis de queratina, cuyos filamentos se disponen alineados. Un incremento en la diferenciación celular de los queratinocitos conduce a una diferenciación terminal de los corneocitos que se hallan en la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, responsable de proteger a la piel de sustancias extrañas y de retener agua. En efecto, los queratinocitos, producidos por la membrana basal, migran lentamente hacia las capas más externas, hasta llegar al estrato córneo donde se disponen los queratinocitos muertos.

Los melanocitos ocupan un 8% de las células epidérmicas, se encuentran en la capa basal de la epidermis y producen melanina, pigmento que estimula la proliferación de los queratinocitos, ayuda al crecimiento del vello y provee una barrera en contra de las mutaciones generadas por los rayos UV. Por otro lado, las células de Langerhans constituyen una pequeña fracción de las células epidérmicas: participan en la respuesta inmune en contra de los microbios que invaden la piel. Por último, las células de Merkel se encargan de dar la respuesta sensitiva a dicho órgano [3].

Cuando la piel sufre una lesión profunda, afectando la dermis y la capa subcutánea, el cuerpo se beneficia si la restauración de la función barrera de la piel es rápida. La reparación ocurre en tres etapas, comúnmente definidas como: (1) hemostasia e inflamación, (2) fase proliferativa, (3) remodelación tisular. La formación del coágulo de fibrina o tapón homeostático tiene dos funciones: por un lado, sirve como protección para sustancias externas, y por el otro provee una matriz a través la cual las células pueden migrar. El coágulo también contiene una variedad de factores de crecimiento que ayudan al proceso de cierre de la herida. Los factores de crecimiento reclutan neutrófilos y macrófagos que inician la fase inflamatoria, combatiendo cualquier posible bacteria contaminante en el sitio de la herida. Los neutrófilos también producen sustancias que inducen la quimiotaxis de células inflamatorias y experimentan apoptosis después de pocos días. Los macrófagos liberan factores de crecimiento que inician la proliferación y producción de la matriz extracelular por los fibroblastos. Este proceso coordinado permite a los fibroblastos migrar a la herida, iniciando la fase (2) de proliferación en la cicatrización[3], [4].

En efecto, la proliferación comienza cuando el tejido de granulación es creado por la migración de los fibroblastos y la producción de la matriz de colágeno. En esta fase, los queratinocitos comienzan a migrar hacia la zona de la herida, lo que provoca una extensión del estrato basal, la migración depende del apoyo metabólico dentro de la capa dérmica. La reepitelización por los queratinocitos es un proceso crítico porque reestablece la función de barrera: la herida está protegida contra la pérdida de agua y las infecciones. Sin embargo, un aumento en la tasa de migración celular puede producir contracción de la herida, por lo que esta última etapa es muy importante para la calidad y apariencia de la cicatriz.

Durante la fase de remodelación (3), el tejido de granulación es integrado para formar una nueva matriz extracelular organizada formada por colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos y fibronectina que sirven para la migración celular. Esta matriz es producida por los fibroblastos. El colágeno producido en las etapas previas determinará la integridad de la sanación de la herida. Además, en esta etapa puede contraerse la herida si los fibroblastos se transforman en miofibroblastos, con características de células de músculo liso. Produciendo, por distintos mecanismos involucrados, que la matriz extracelular producida por los fibroblastos se contraiga y encoja. Si el estrés es aliviado los miofibroblastos morirán y producirán menos colágeno produciendo menor cicatrización. Si el estrés no es aliviado, la cicatriz obstaculizará la función de la piel [5] [4] .

### 1.3 Prevalencia e incidencia de heridas en piel y complicaciones relacionadas

Una cantidad significativa de investigaciones han sido enfocadas en la reparación de heridas de piel y en reestablecer su función [6]. Las heridas de piel grandes son un gran problema en la población civil.

En 2004 la Organización Mundial de la Salud informó que casi 11 millones de personas en todo el mundo sufrieron quemaduras lo suficientemente graves para requerir atención médica [7]. Según *American Burn Association*, en el año 2011, el número de pacientes estadounidenses que recibió tratamiento médico para tratar lesiones causadas por quemaduras fue de 486.000. En el caso de Argentina, si bien las estadísticas son escasas, en el año 2005 se registraron alrededor de 3745 personas que sufrieron quemaduras que desembocaron en intervención quirúrgica (datos extraídos de estadística epidemiológica realizada por la fundación del quemado Dr. Fortunato Benaim, comunicación personal, marzo 2018). La figura 1.3 ilustra una herida de grosor completo debida a quemaduras.



Figura 1.3: Herida de grosor completo debido a quemaduras [8].

En cuanto a las heridas crónicas, se estima que un 1% a un 2% de la población experimentará una herida de este tipo en su vida en los países desarrollados. El aumento de la población mayor incrementará este número ya que la cura de dichas heridas está afectada negativamente por la edad. En el año 2009 en EE.UU. se reportó que las heridas crónicas afectaron 6.5 millones de pacientes, con un estimado de más de US\$25 billones por año gastados para su tratamiento. Por esta problemática, en los países escandinavos el costo asociado es de entre el 2 y el 4% del gasto total de salud, mientras que en el Reino Unido el costo estimado en el 2005 del cuidado de heridas crónicas fue de US\$3.4-4.6 billones. Por otro lado, los procedimientos quirúrgicos que requieren un posterior cuidado de la herida en el año 2000 en EE. UU. fue de 40 millones de pacientes [9].

El pie diabético es la principal úlcera del tipo metabólica, en la figura 1.4 puede verse un ejemplo. Es un problema de salud pública por su elevada frecuencia y su alto costo sanitario y social, que se pone de manifiesto en el incremento del número de internaciones prolongadas, la mayor demanda de atención médica y la incapacidad laboral del paciente. En el año 2008, la población mundial de diabéticos alcanzó un total de 194 millones de personas. Se estima que en 2025 esta población crecerá a 333 millones. En Estados Unidos más de 23 millones de personas sufren diabetes. En Europa y Escandinavia cerca del 5 al 7% de la población sufre esta enfermedad, mientras que la prevalencia de la diabetes en Argentina es del 6 a 7 % de la población (2.000.000 de personas) pero sólo un 50% conoce y trata su enfermedad. Se estima que hasta un 25% de los enfermos presentarán úlceras por presión. La diabetes es causa del 48% de las amputaciones no traumáticas de miembros inferiores y representan un 8% de la ocupación de las camas de los hospitales públicos [6], [10].



Figura 1.4: Úlcera en paciente diabético en miembro inferior [11].

En la figura 1.5 se puede ver un ejemplo de úlcera por presión, comúnmente llamadas escaras, son un problema significativo en la sociedad envejecida de hoy en día. Este tipo de heridas corresponde a una ruptura de los tejidos blandos como resultado de una compresión entre una prominencia ósea y una superficie externa. A medida que aumenta la expectativa de vida, el número de individuos debilitados por padecimientos crónicos es cada vez mayor y por lo tanto se incrementan los riesgos de padecer úlceras por presión. Además, la movilidad limitada por fracturas de caderas, enfermedades progresivas como Parkinson o Alzheimer hacen que la población de mayor edad tenga un riesgo elevado de desarrollar escaras. Se estima que hay al menos 7,4 millones de pacientes con úlceras por presión si se considera sólo el mundo desarrollado. Anualmente, 2,5 millones de personas son tratadas en los Estados Unidos solamente en centros de cuidados para agudos. El monto requerido para la completa curación de una herida de espesor completo se estima que de US\$ 70.000 y los gastos para tratar las úlceras por presión han sido estimados de \$11 billones por año [6].



Figura 1.5: Úlcera por presión en la zona lumbar [12]

En conclusión, las heridas con un diámetro mayor que 4 cm que afectan a todo el grosor de la piel - heridas profundas - así como las quemaduras profundas son causa relevante de morbilidad y mortalidad. Para el

tratamiento de estas lesiones, y como alternativa al método tradicional de injerto de piel autóloga, se han desarrollado y aplicados varios sustitutos biológicos [13]. Otro enfoque prometedor es la terapia celular que emplea un sustrato o andamio para cubrir el lecho limpio de la herida sobre el cual se disponen uniformemente las células de piel.

### 1.3.1 Características de los andamios o scaffolds

El rol principal del scaffold en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa es proveer un entorno temporal para depositar las células en un espacio tridimensional. En el cuerpo, las células se encuentran inmersas en un complejo arreglo de proteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos conocidos como matriz extracelular; dicha matriz tiene numerosas funciones, como proveer adhesión celular, arquitectura microscópica, retención de factores de crecimiento controlados temporal y espacialmente, además de detección y transducción de las señales mecánicas a la célula. Es decir, la matriz extracelular contribuye activamente en el desarrollo y morfogénesis del tejido. La ingeniería de tejidos busca proveer una matriz temporal a las células biológicamente activas y también permitir que el propio tejido se desarrolle. Con el tiempo y una vez implantado, se espera que dicho sustrato se degrade en una velocidad similar a la cual las células producen su propia matriz extracelular [14]. La tecnología de bioimpresión ha sido propuesta como método promisorio para elaboración de andamios tanto de fabricación en serie como a medida del paciente.

## 1.4 Sustitutos de piel sintéticos y biológicos

El cuidado de heridas en piel recae en la necesidad de emplear sustitutos de piel sintéticos o biológicos disponibles comercialmente para emplearlos clínicamente. Los sustitutos biológicos conservan intacta la estructura de la matriz extracelular mientras que los sustitutos de piel sintética se generan respecto a una demanda pudiendo ser modulados para requerimientos específicos. La tabla 1.1 muestra algunos ejemplos de lo que se emplea en el mundo para el cuidado de heridas[1]:

**Tabla 1.1: Productos sintéticos y biológicos disponibles comercialmente para su aplicación clínicas en el tratamiento de heridas de piel.**

	<b>Producto</b>	<b>Material de la matriz</b>	<b>Tipos celulares</b>
Dermagraft®	Cobertura permanente o temporal	Polyglactina bioreabsorbible	Fibroblastos alogénicos neonatales
MatriDerm®	Sustituto dermico	Colágeno bovino Elastina	No posee
Integra®	Matriz de cobertura temporaria	Colágeno bovino Condroitin-6-sulfato silastic	No posee
Apligraf®	Equivalente de piel bicapa	Colágeno bovino	Queratinocitos alogénicos, Fibroblastos neonatales
Heteroinjerto	Sustituto de piel – injerto temporario	Composición natural	Células irradiadas
Homoinjerto	Sustituto de piel – injerto temporario	Composición natural	Células irradiadas

## 1.5 Bioimpresión 3D

La bioimpresión ha emergido como una herramienta flexible en la medicina regenerativa con potencial en una gran variedad de aplicaciones. Esta tecnología puede ser descrita como una plataforma robótica de fabricación aditiva que tiene el potencial de construir un patrón con elementos vivos o replicar la estructura de un tejido. La impresión de los distintos tejidos o una porción de los mismos, en analogía con el prototipado rápido consta de tres pasos: la generación del archivo CAD a STL, el dispensado del material y las células, y por último el post-procesamiento que involucra la confluencia de las células para que el tejido alcance un nivel de funcionalidad determinado [15].

Una ventaja del sistema de bioimpresión es que la bioimpresora permite la localización de células, biomateriales y demás moléculas bioactivas —por ejemplo, factores de crecimiento— en posiciones específicas con geometrías predeterminadas por el archivo STL. Generalmente estos dispositivos permiten imprimir hidrogeles o fluidos viscosos con células en suspensión – biotintas - o también capas de polímeros libres de células, que generan una capa del soporte o scaffold aternadas con células impresas

junto al medio de cultivo, lo que garantiza una distribución celular específica del tejido a generar. Otra ventaja es que las estructuras pueden imprimirse a partir de imágenes médicas de porciones anatómicas del propio paciente, para generar andamios celulares personalizados.

### 1.5.1 Tipos de bioimpresión

La figura 1.6 muestra las dos grandes tecnologías de bioimpresión disponibles actualmente: extrusión e inyección. La impresión basada en inyección es una técnica sin contacto que produce gotas del orden de los picolitros. Estas gotas pueden ser generadas térmicamente, con un actuador piezoeléctrico, o bien inducidas con presión neumática. La técnica basada en inyección produce patrones de alta resolución, aunque su viabilidad celular es baja comparada con otras técnicas; además, deben usarse exclusivamente materiales de baja viscosidad. Otra desventaja es que las propiedades mecánicas de las estructuras impresas son débiles, por lo que tienden a no mantener su forma y a no soportar tensiones externas después de su implantación [16].

La tecnología basada en extrusión, en tanto, consiste en el dispensado del polímero o del hidrogel a través de una boquilla de extrusión, cuyo posicionamiento se controla por computadora. En este sistema, el polímero o el hidrogel se encuentra cargado en una jeringa plástica o metálica y el material es eyectado con presión neumática, mediante un pistón o un tornillo que funciona como actuador en la plataforma de impresión. La resolución del sustrato final alcanzable por esta tecnología depende del tamaño de la boquilla extrusora y del paso mínimo del cabezal móvil, que generalmente se encuentra en el orden de los 100  $\mu\text{m}$ . Además, la velocidad de impresión alcanzada es más alta que en la tecnología antes mencionada. Esta tecnología permite además la inclusión de células pueden ser incorporadas en el hidrogel o no y ser depositadas logrando una alta viabilidad [17].

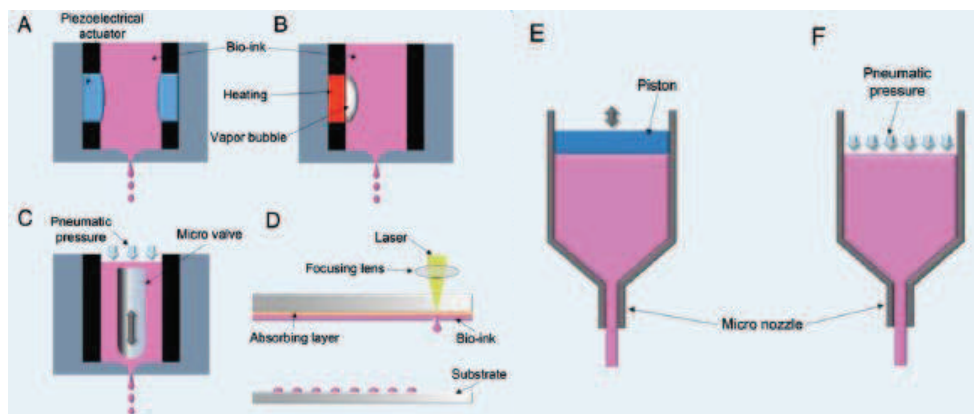


Figura 1.6: Tecnología de bioimpresión (A) (B) y (C) basada en inyección. (D) Asistida por láser. (E) y (F) basada en extrusión. [16]

Debido a sus propiedades, la bioimpresión ha sido empleada para generar diversas estructuras con distintos tipos de biomateriales, tipos celulares y moléculas bioactivas como tejido de válvulas cardíacas con ácido hialurónico y gelatina [18], tejido miocárdico y vasos sanguíneos con alginato y fibrina [19],[20],[21]; tejido muscular esquelético con fibrina [22], [23]; tejido nervioso en agar de soja, colágeno y fibrina [24], [25] y piel empleando fibrina derivada de plasma humano, fibroblastos y queratinocitos humanos [26].

La variedad de polímeros naturales empleados satisfactoriamente en bioimpresión es limitada, destacándose el colágeno, la gelatina, el alginato, el ácido hialurónico, el quitosano, el dextrano y la fibrina. Algunos de ellos han presentado dificultades para ser impresos solos, necesitando combinarlos con otros polímeros para lograr propiedades reológicas adecuadas, así como una mejor integridad mecánica de los andamios [27].

## 1.6 Hidrogeles

Los hidrogeles son una red de cadenas poliméricas hidrofílicas, en forma coloidal, dispersas en una fase acuosa. Pueden estar formados por polímeros naturales o sintéticos y contener hasta un 99,9% de agua. Aquellos polímeros biocompatibles se emplean en ingeniería de tejidos para estar en contacto con células y otras moléculas biológicas. La figura 1.7 muestra los materiales mayormente empleados para bioimpresión en publicaciones, según lo relevado en un review de 2015.

Los hidrogeles presentan un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su contenido de agua. Si no se utiliza agente entrecruzante, se obtiene una disolución del polímero que más tarde puede precipitarse y entrecruzarse. Si se emplea un agente entrecruzante, el resultado final es un gel solvatado.

Lo atractivo de estos materiales es su similitud estructural con la matriz extracelular natural, ya que, es muy rica en colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, siendo todas macromoléculas poliméricas de origen natural captadoras de grandes cantidades de agua. Además, pueden solidificar rápidamente mediante enlaces covalentes que entrecruzan las cadenas poliméricas, según el entorno pos-impresión al que se los someta. En las últimas décadas se ha develado la importancia crítica que tiene el entorno extracelular para el crecimiento, supervivencia, diferenciación y morfogénesis de las células. [28]

Debido a su alta biocompatibilidad y facilidad para obtenerlos en el laboratorio, ya sea a partir de fuentes naturales o sintéticamente, los hidrogeles se han convertido en el medio elegido para posicionar células en un espacio tridimensional mediante bioimpresión.

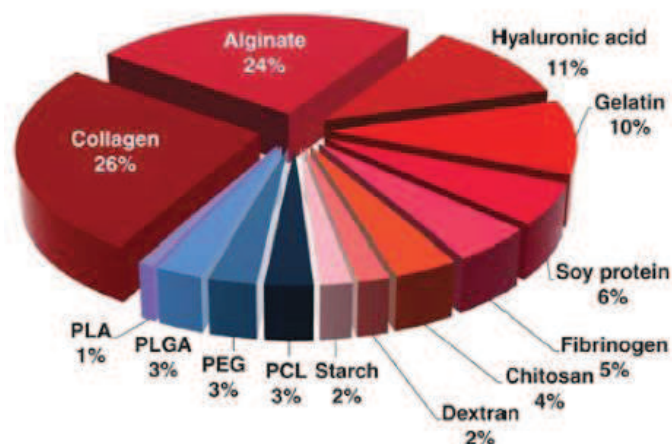


Figura 1.7: Frecuencia de uso de los hidrogeles para biotintas, según datos bibliográficos. En la gama del rojo se ven los materiales naturales y en azul los sintéticos.[27]



Además, los hidrogeles tienen buena porosidad para la difusión de oxígeno, nutrientes y metabolitos; pueden ser procesados bajo condiciones amigables para las células y producir escasa o nula irritación o inflamación. Es así que los hidrogeles son biomateriales muy requeridos para la ingeniería de tejidos, y adaptables para la tecnología de impresión 3D. [27]

En síntesis, la elección de estos materiales responde al buen desempeño en diferentes aspectos:

- relativo a su estructura: es altamente porosa, con una red interconectada que facilita el crecimiento celular, la formación de nuevo tejido y el transporte de nutrientes y desechos celulares [29], [30],[31];
- relativo a la superficie: su topografía es tal que permite la adhesión y la proliferación celular [29],[30],[31];
- relativo a las propiedades mecánicas: su resistencia mecánica es compatible con las fuerzas que aplica el citoesqueleto [29],[31],[32],[33];

Además son fáciles de obtener y relativamente económicos y se puede regular su tasa de degradación enzimática controlando las composiciones y concentraciones de los distintos componentes del gel [29],[30],[32].

A continuación, se presentan las principales características de los hidrogeles empleados en este trabajo. En el parágrafo 1.6.1 se aprecian los mecanismos de entrecruzamiento para alcanzar un impreso con propiedades adecuadas.

### 1.6.1 Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano, representando aproximadamente el 25% de la masa seca del total de proteínas. Existen muchas variedades de colágeno, según la forma en que se disponen las macromoléculas que lo conforman. El de tipo I es el predominante, ocupando alrededor del 90% del colágeno total en el cuerpo. Estructuralmente es una proteína compuesta por tres cadenas  $\alpha$  helicoidales; cada una contiene una secuencia de aminoácidos repetitiva  $(G-X-Y)_n$ , donde G es glicina y X e Y son generalmente prolina e hidroxiprolina [34]. Esas triples hélices se asocian para formar fibrillas y finalmente éstas se asocian para dar las resistentes fibras de colágeno.

Los hidrogeles de colágeno tipo I son ideales en términos de biocompatibilidad. Son capaces de soportar el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación, tienen relativamente baja inmunogenicidad en comparación con otros materiales naturales. Su proceso de gelación es sensible al pH y a la temperatura. Comúnmente se obtiene de piel bovina o tendón de cola de rata, manteniendo el preparado soluble a 4°C en solución ácida para prevenir la precipitación de proteínas. Cuando el preparado se neutraliza y se mantiene por 30 minutos a 37°C, se logra un gel debido a la interacción de las cadenas polipeptídicas [35].

Además de su empleo en el laboratorio, existen varios productos comerciales disponibles en el mercado hechos con colágeno. Sin embargo, el desempeño mecánico para soporte celular es deficiente debido a sus pobres propiedades mecánicas. Por esta razón, se lo suele emplear combinado con otros materiales que le aporten mayor rigidez, un ejemplo de ellos es el quitosano [29], [36], [37], [38].



### 1.6.2 Quitosano

El quitosano es un polisacárido aminado compuesto por unidades monoméricas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas). Es un polímero semicristalino que se obtiene de la desacetilación de la quitina, polisacárido que es un elemento estructural del exoesqueleto de los crustáceos. Se puede observar su estructura molecular en la figura 1.8.

El quitosano no puede disolverse a pH neutro, sin embargo, en un ácido diluido por debajo de un pH=5, la protonación de los grupos aminos genera una macromolécula soluble. Es decir que, para formar geles, el quitosano debe disolverse en una solución acuosa ácida, que luego se neutraliza mediante el agregado de base. Así, se obtiene un hidrogel mediante fuerzas intermoleculares (puentes de hidrógeno) [39][40].

Dado que el quitosano presenta propiedades antimicrobianas [41] y además aporta buenas propiedades reológicas y angiogénicas [29] pero no fomenta la adhesión celular [31], suele emplearse en combinación con otros hidrogeles. Incluso ha demostrado poseer propiedades hemostáticas en heridas de grosor completo en ratones [42], [43].

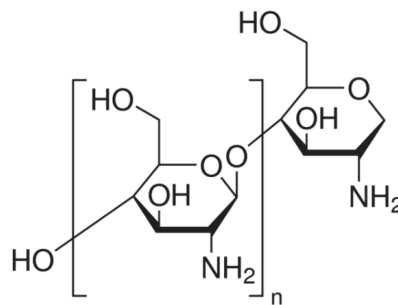


Figura 1.8: Estructura molecular del quitosano según la hoja de datos del proveedor: Sigma-Aldrich.

### 1.7 Biotintas

Comprender las características del polímero que influyen en la eficacia de la bioimpresión es clave para lograr el diseño de una biotinta de óptimo desempeño. Propiedades como la viscoelasticidad del polímero, que da origen a las características finales del sustrato impreso y al comportamiento del hidrogel en solución, pueden afectar la capacidad de impresión. Otras consideraciones como la disponibilidad, la vida media del producto almacenado, el costo del biomaterial y el hecho de que esté autorizado por agentes regulatorios, son características importantes a tener en cuenta a la hora de elegir el material [44]. Algunas de las propiedades importantes de las biotintas están ilustradas en la figura 1.9.

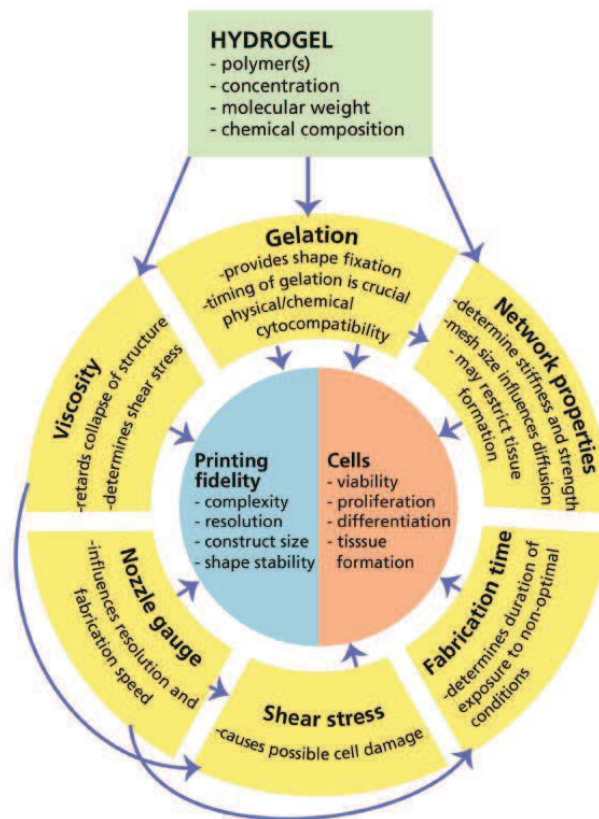


Figura 1.9: Mapa conceptual de variables y relaciones críticas para la biofabricación. Hidrogel: concentración, peso molecular, composición química determinan directamente la viscosidad, el mecanismo y la velocidad de gelación y las propiedades mecánicas finales del gel. Esto en combinación con los parámetros de procesamiento tales como el tamaño de la boquilla de extrusión y el tiempo de fabricación influyen en características como la fidelidad de impresión, la viabilidad celular y la formación del tejido. [45].

### 1.7.1 Entrecruzamiento

El pasaje de precursor de hidrogel a hidrogel está dado por la interacción entre las cadenas poliméricas. En el caso del colágeno, como ya se mencionó, su mecanismo de gelación se da por neutralización del pH y por temperatura a 37°C. En el caso del quitosano, se da por la neutralización del pH. Por otro lado, para obtener geles más rígidos se pueden entrecruzar ambos geles con la inclusión de agentes entrecruzantes tales como: genipina [37], [38], [46], glutaraldehído [30], NHS y EDC [29], [47], empleados ampliamente en distintos trabajos. El entrecruzamiento se logra por la formación de uniones covalentes entre grupos carboxilos y aminos de distintas cadenas. En particular en este trabajo se utilizarán NHS y EDC, indicándose el mecanismo de entrecruzamiento en el cuadro de la figura 1.10.

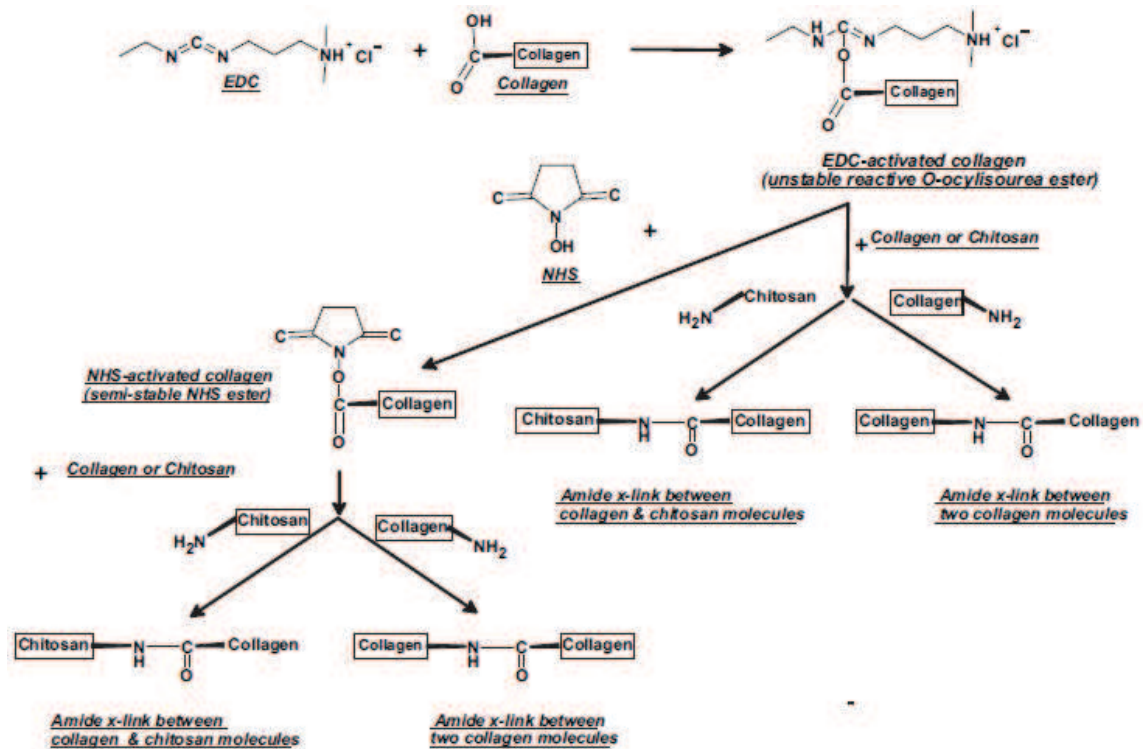


Figura 1.10: Mecanismo de reacción del entrecruzamiento del colágeno con el quitosano mediante la inclusión de NHS y EDC [47]

Los hidrogeles forman un estado semisólido mediante interacciones complejas entre las cadenas poliméricas que se solapan y la presencia del agente entrecruzante. Este entrecruzado resulta en una malla polimérica enredada que es capaz de alojar células y otros compuestos biológicos. En consecuencia, el agente entrecruzante podría ser la característica más importante que contribuye a la función del hidrogel. El agente entrecruzante tiene que ser no tóxico y mantenerse estable a la temperatura y pH del cuerpo humano [35].

A grandes rasgos los métodos de entrecruzamiento de los precursores de hidrogel pueden dividirse en físicos (que incluyen interacciones iónicas y puentes de hidrogeno) y químicos (enlaces covalentes secundarios por foto-iniciación o por catálisis enzimática). Existen cuatro tipos de entrecruzamiento: (1) térmico, (2) por inclusión de iones, (3) por inclusión de una enzima y (4) por luz.

### 1.7.2 Viscosidad

Como se observa en la figura 1.11, varias son las propiedades que hacen a la calidad de la tinta, entre ellas, como se ve en la parte c de dicha figura, la viscosidad influye, además de en el proceso de extrusión generado en la bioimpresora, en la manera en que las células estarán suspendidas en la solución.

La reología es la ciencia que estudia cómo fluye un material en respuesta a una fuerza aplicada. Existen dos conceptos que deben ser considerados cuando se trata de emplear un hidrogel para bioimpresión, estos son la viscosidad y el adelgazamiento por fuerza de corte (*shear thinning*). Este último es especialmente importante en las técnicas de impresión basadas en extrusión.

Un fluido se denomina newtoniano cuando el esfuerzo de corte aplicado aumenta proporcional con la velocidad de corte generada; la constante de proporcionalidad entre el esfuerzo y la velocidad se denomina viscosidad. Es decir que la viscosidad caracteriza la resistencia a fluir cuando se aplica una fuerza externa.

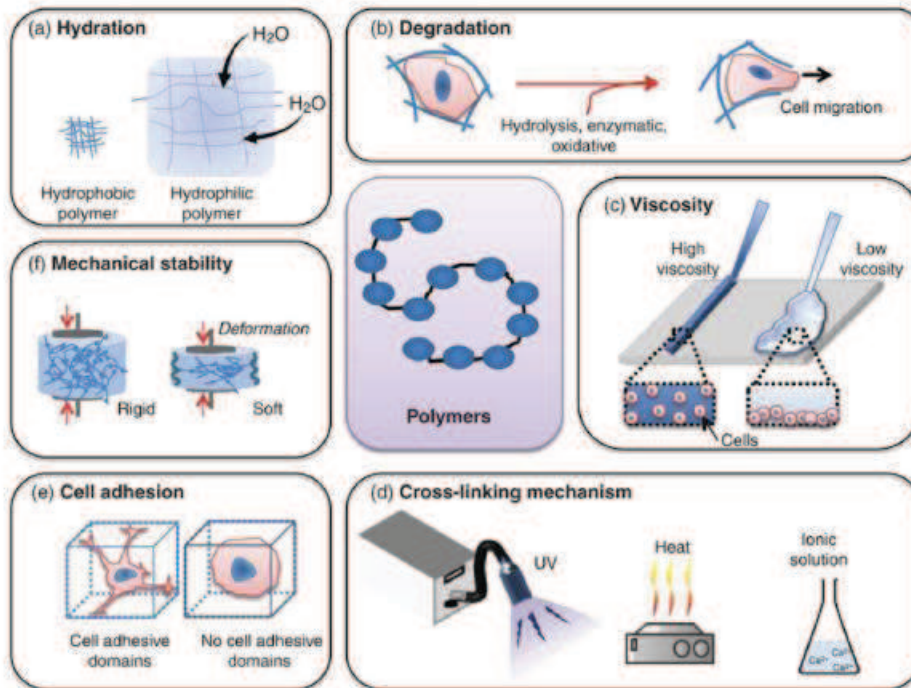


Figura 1.11: Propiedades importantes de los hidrogeles empleados en bioimpresión. (a) La hidratación del polímero permite el transporte de nutrientes y desechos a las células dentro del constructo impreso. (b) El mecanismo de degradación puede ser modificado por influencia de las células y la regeneración del tejido. (c) Las soluciones viscosas pueden suspender y a su vez proteger a las células de las fuerzas externas como las ejercidas por la boquilla de extrusión. (d) El mecanismo de entrecruzamiento es dependiente del tipo del polímero, las consideraciones de viabilidad celular y las propiedades de entrecruzamiento pueden existir permanentemente o reversiblemente. (e) La adhesión celular influye en la respuesta celular y puede ser controlada por el tipo de polímero o su procesamiento. (f) La estabilidad del material impreso es vital para el éxito del sustrato impreso, ya que debe ser similar al tejido y mantener la forma que organice el crecimiento celular. [27]

Cuando la viscosidad no es constante, como en el caso de los fluidos newtonianos, sino que es función de la tasa de deformación estamos en presencia de un fluido no newtoniano. El comportamiento pseudoplástico es aquel en el que disminuye la viscosidad cuando aumenta la velocidad de deformación; por el contrario, cuando aumenta la viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación estamos en presencia de un fluido dilatante. Estos tres comportamientos se ven reflejados en el gráfico de la figura 1.12.

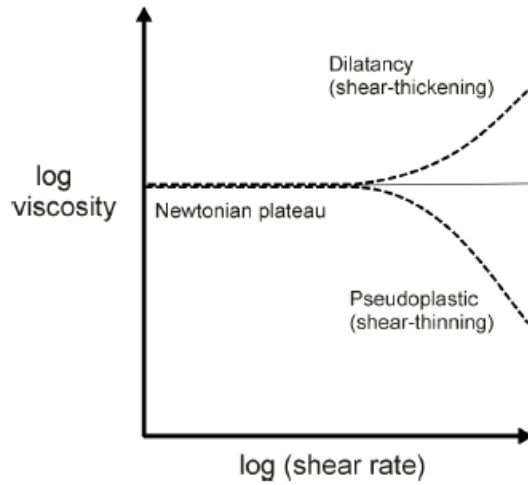


Figura 1.12: Curvas de flujo para las distintas clases de fluidos[48].

En el caso de los precursores de hidrogel que se emplean en este trabajo, se sabe que presentan un comportamiento pseudoplástico (*shear-thinning*). Se desea determinar el valor de viscosidad para ciertos valores de tasa de deformación relacionados con el esfuerzo que se le aplica cuando se los somete al proceso de extrusión para imprimirlos.

Para los fluidos, se determina el parámetro viscosidad de corte ( $\eta$ ) que es la resistencia al flujo de un material ( $\dot{\gamma}$ ) bajo la aplicación de una tensión ( $\tau$ ), según la ecuación 1.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Ec. 1}$$

Para sólidos elásticos, la deformación angular  $\gamma$  se relaciona linealmente con la tensión de corte  $\tau$  a través del módulo de corte  $G$ , como se indica en la ecuación 2.

$$G = \frac{\tau}{\tan(\gamma)} \simeq \frac{\tau}{\gamma} \quad \text{Ec. 2}$$

Cuando los materiales son viscoelásticos se define la viscosidad compleja con sus dos componentes en función de la tasa de deformación y la tensión como se describe en la ecuación 3.

$$\eta^* = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Ec. 3}$$

Para muchas soluciones poliméricas la dependencia de la viscosidad compleja  $\eta^*$  con la frecuencia y de la viscosidad  $\eta$  con la tasa de deformación puede ser superponible cuando los valores de  $\omega$  y de  $\dot{\gamma}$  son comparables. Esta relación empírica es llamada regla de Cox-Merz [48] y se expone en las ecuaciones 4 y 5.

$$\omega \Delta t = \gamma \quad \text{Ec. 4}$$

$$\dot{\gamma} \equiv \omega \quad \text{Ec. 5}$$

Los ensayos oscilatorios permiten determinar el módulo elástico  $G'$ , que es la parte correspondiente a la energía que el material devuelve cuando se quita la tensión aplicada, y el módulo complejo  $G''$ , la parte que se asocia a la disipación de energía en forma de calor, y  $\tan(\delta)$  que es el factor de pérdida. Las ecuaciones 6 y 7 indican la relación de  $G'$  y  $G''$  con  $\delta$ . Donde  $\delta$  habla del desfase entre la señal sinusoidal impuesta y la señal medida.

$$G' = G \cos(\delta) \quad \text{Ec. 6}$$

$$G'' = G \sin(\delta) \quad \text{Ec. 7}$$

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ec. 8}$$

A su vez

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{Ec. 9}$$

Y se relaciona con  $\eta^*$  a partir de la ecuación 10:

$$\eta^* = \frac{G''}{\omega} \quad \text{Ec. 10}$$

Dependiendo de la concentración del biopolímero precursor del hidrogel, se observan distintos comportamientos. Según el grado de enredo de las redes que se forman por simple interacción de las cadenas poliméricas o el grado de entrecruzamiento los geles pueden clasificarse en geles débiles o fuertes. Muchos sistemas biopoliméricos parecen dar un espectro mecánico donde  $G' > G''$ , es decir que  $\tan(\delta)$  es menor que 1, independientemente de la frecuencia como se observa en el gráfico de la figura 1.12. Cuando el  $G'' > G'$  ( $\tan(\delta) > 1$ ) predomina el comportamiento líquido del material, hasta que ocurre el proceso de gelificación, a partir del cual  $G' > G''$ . Para este proceso se define el  $t_{gel}$ , que es el momento en que se cruzan las curvas durante un barrido de tiempo o de frecuencia.

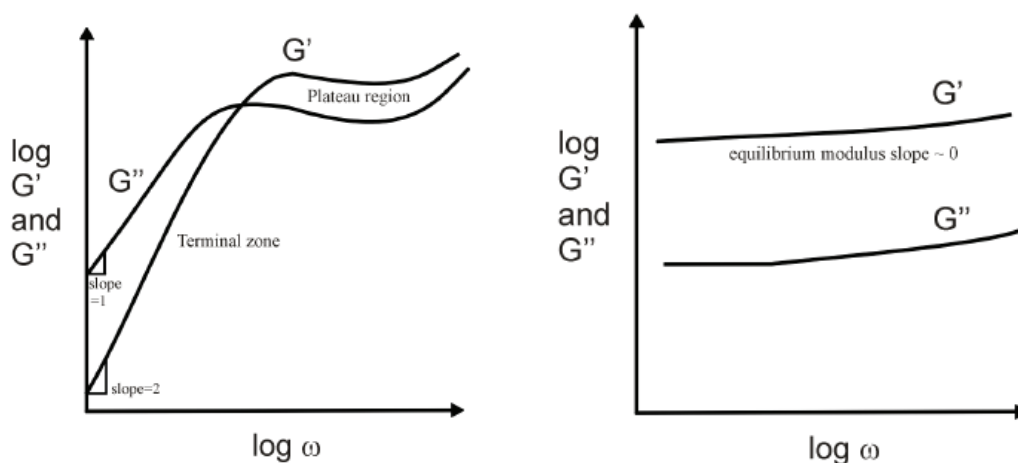


Figura 1.13: Espectro mecánico para redes entrecruzadas a la izquierda y sistema de gel a la derecha [48].

### 1.7.3 Fidelidad de impresión

En el proceso de bioimpresión la fidelidad de impresión óptima se obtiene empleando hidrogeles más rígidos, es decir, mayor concentración del biopolímero precursor o mayor concentración del agente entrecruzante. Sin embargo, si las redes del gel son demasiado densas, se limita la migración celular, el crecimiento y la diferenciación. En el otro lado del espectro, la mejor viabilidad celular se da en geles poco concentrados, que son poco rígidos como para mantener la estructura. Dicho fenómeno puede verse representado en la figura 1.14.

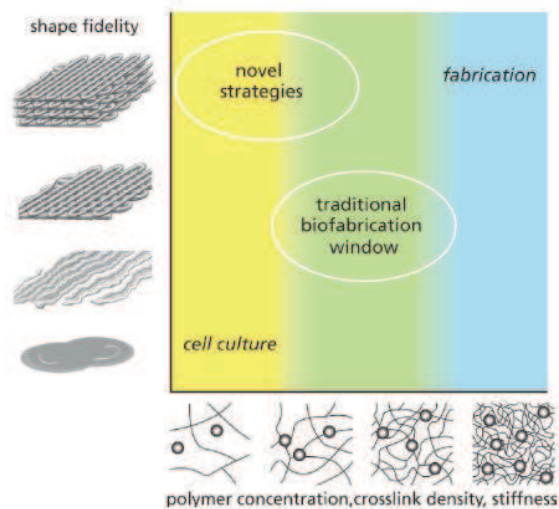


Figura 1.14: Gráfico que representa las regiones de trabajo según la concentración del polímero y la fidelidad de impresión [45].

Los parámetros de impresión como la cantidad de material y tiempo de eyección entre pasos, pueden afectar la exactitud y la resolución a lo largo del proceso de bioimpresión [49]. Otro factor que afecta la calidad de impresión son los alcances a nivel hardware. Sobre todo, en relación a la escala de los movimientos en los distintos ejes para alcanzar el modelo digital impuesto desde el software.

El proceso de bioimpresión enfocado a las aplicaciones biomédicas requiere cierto grado de regularidad y exactitud. Existen distintos estudios que relacionan los parámetros de fabricación con los resultados del proceso [49],[50],[51]. La impresión de los hidrogeles viscosos a través de una aguja en el rango de los 100 a 300  $\mu m$  de diámetro interno y la generación de filamentos finos deben alcanzar determinados parámetros geométricos impuestos por el modelo digital. Se puede deducir que los parámetros como la velocidad del paso del cabezal, la cantidad de material eyectado y el tamaño de la boquilla de extrusión juegan un rol importante en la resolución de la geometría impresa.

Existen diversas formas de medir la capacidad de impresión de un precursor de hidrogel para evaluar cómo afectan los parámetros del proceso y la composición de la tinta [51]. Una de ellas es imprimiendo mallas/rejillas y calculando una variable donde se relaciona el área interna ( $A_{Ri}$ ) de los huecos de la rejilla (ver figura 1.15) con el área real del experimento obtenida por impresión [51]. Otra forma alternativa de medir la imprimibilidad en el plano de impresión es definir un índice que relaciona el grosor de la línea



impresa con el diámetro de la aguja y la altura de separación entre el extrusor y la cama de deposición del material; se establece así un índice de altura que relaciona la separación del paso de la impresora con el grosor promedio obtenido en dicha impresión [49]. En otros casos cuantifican la imprimibilidad midiendo la circularidad del área cerrada estimando el área encerrada y el perímetro del hueco de la impresión [52].

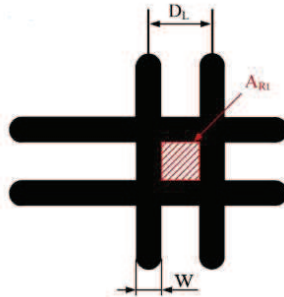


Figura 1.15: Esquema teórico de la red impresa, donde  $A_{Rt}$  es el área de la red en teoría [51].

#### 1.7.4 Hacia una biotinta para piel.

Como antecedentes relevantes, en el año 2003 se empleó la técnica de liofilización para generar sustratos de colágeno 0,45%*m/v* con quitosano 0,05%, tratados con glutaraldehído como entrecruzante para mejorar su estabilidad en un medio fisiológicamente activo [30]. En el año 2009, Lee y colaboradores evaluaron el cultivo tanto de fibroblastos como de queratinocitos en un sustrato de colágeno 0,2%*m/v* gelado por pH mediante la nebulización de la base ( $\text{NaHCO}_3$ ); sin embargo no se ha avanzado sobre la degradación de la matriz de cultivo empleada en un medio fisiológico o *in vivo* [53]. En el caso del trabajo realizado por Skardal et al, se empleó un hidrogel de colágeno y fibrinógeno bioimpreso 3D sobre heridas de ratón, con el fin de evaluar si la inclusión de distintos tipos de células madre influenciaban la velocidad del proceso de reparación de la piel [54]. En el año 2016, Hongbo Zhang y colaboradores publicaron un resumen de un congreso en el cual se consigna el diseño de una tinta con quitosano 8%, ácido hialurónico 0,5% y colágeno 10% probando distintos mecanismos de entrecruzamiento [55]. Por último, en ese mismo año, a partir de un hidrogel hecho con plasma humano, fibrina y células de piel humana, se desarrolló piel artificial que fue probada con éxito en heridas de ratones inmunodeficientes [25].

### 1.8 Objetivos del trabajo

**Objetivo General:** Desarrollar una tinta apta para su empleo en una bioimpresora 3D, con vistas a imprimir sustratos que propicien la regeneración de piel en heridas derivadas de quemaduras profundas, úlceras venosas o arteriales y escaras.

**Objetivos específicos:**

1) A partir de colágeno y quitosano, formular y caracterizar precursores de hidrogeles citocompatibles, con propiedades reológicas adecuadas para emplear en la bioimpresora 3-Donor.



2) Evaluar metodologías para generar sustratos gelados, con adecuada fidelidad de impresión, y caracterizarlos en su comportamiento mecánico, en solución fisiológica y de degradación en medio con concentración fisiológica de colagenasa.

3) Ponderar los desempeños de prototipos de bioimpresoras 3D para la generación de sustratos de regeneración de piel.

## 1.9 Referencias

- [1] A. S. Halim and T. L. Khoo, "Biologic and synthetic skin substitutes: An overview," vol. 43, 2010.
- [2] S. P. Tarassoli *et al.*, "Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field Authors:," *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, 2017.
- [3] G. J. Tortora *et al.*, *PRINCIPLES OF ANATOMY AND PHYSIOLOGY*. 2010.
- [4] L. I. Villalba *et al.*, "Consenso sobre cicatrización de heridas," *Soc. Argentina Dermatología*, pp. 1–41, 2008.
- [5] J. Marco, A. Atala, and J. J. Yoo, *Bioprinting of Skin*. Elsevier Inc., 2015.
- [6] C. K. Sen *et al.*, "Human Skin Wounds: A Major Snoballing Threat to Public Health and Economy," *Wound Repair Regen.* 2009, vol. 17, no. 6, pp. 763–771, 2010.
- [7] OMS, "Quemaduras," WHO, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/es/>. [Accessed: 05-Sep-2017].
- [8] M. Spear, *SKIN GRAFTS – INDICATIONS , APPLICATIONS AND Edited by Marcia Spear. .*
- [9] K. Järbrink *et al.*, "Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review," *Syst. Rev.*, vol. 5, no. 1, p. 152, 2016.
- [10] I. Ruiz, "Desarrollo de sustratos bioabsorbibles para la ingeniería de tejido dermo-epidérmico," 2013.
- [11] "Wound bed preparation." [Online]. Available: <http://www.worldwidewounds.com/2002/april/Vowden/Wound-Bed-Preparation.html>. [Accessed: 11-Sep-2017].
- [12] "Pressure ulcer." [Online]. Available: <http://www.clinicaladvisor.com/pressure-ulcer/slideshow/188/>. [Accessed: 11-Sep-2017].
- [13] I. Jones, L. Currie, and R. Martin, "REVIEW A guide to biological skin substitutes," pp. 185–193, 2002.
- [14] J. K. Carrow, P. Kerativitayanan, M. K. Jaiswal, G. Lokhande, and A. K. Gaharwar, "Polymers for bioprinting," *Essentials 3D Biofabrication Transl.*, pp. 229–248, 2015.
- [15] R. P. Visconti, V. Kasyanov, C. Gentile, J. Zhang, R. R. Markwald, and V. Mironov, "Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, no. 3, pp. 409–420, 2010.
- [16] Y. J. Seol, H. W. Kang, S. J. Lee, A. Atala, and J. J. Yoo, "Bioprinting technology and its applications," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 46, no. 3, pp. 342–348, 2014.
- [17] F. Pati, J. Jang, J. W. Lee, and D. W. Cho, *Extrusion bioprinting*, no. November. 2015.
- [18] B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang, and J. T. Butcher, "3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate / gelatin hydrogels," no. August, pp. 1–10, 2012.
- [19] R. Gaetani *et al.*, "Biomaterials Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells," *Biomaterials*, vol. 33, no. 6, pp. 1782–1790, 2012.

- [20] R. Gaebel *et al.*, "Biomaterials Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration," *Biomaterials*, vol. 32, no. 35, pp. 9218–9230, 2011.
- [21] P. K. Wu and B. R. Ringeisen, "Development of human umbilical vein endothelial cell ( HUVEC ) and human umbilical vein smooth muscle cell ( HUVMC ) branch / stem structures on hydrogel layers via biological laser printing ( BioLP )," vol. 14111.
- [22] E. D. F. Ker *et al.*, "Biomaterials Bioprinting of growth factors onto aligned sub-micron fibrous scaffolds for simultaneous control of cell differentiation and alignment," *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8097–8107, 2011.
- [23] P. C. Julie A. Phillippi, Eric Miller, Lee Weiss, Johnny Huard, Alan Waggoner, "Microenvironments Engineered by Inkjet Bioprinting Spatially Direct Adult Stem Cells Toward Muscle- and Bone-Like AND," pp. 127–134, 2008.
- [24] S. Ilkhanizadeh, A. I. Teixeira, and O. H. Å, "Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation," vol. 28, pp. 3936–3943, 2007.
- [25] T. Xu *et al.*, "Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method," vol. 27, pp. 3580–3588, 2006.
- [26] A. A. Bulysheva, N. Burcus, and C. Lundberg, "3D bioprinting of functional human skin : production and in vivo analysis," *Biofabrication*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12.
- [27] J. K. Carrow, P. Keratitayanan, M. K. Jaiswal, G. Lokhande, and A. K. Gaharwar, "Polymers for Bioprinting," pp. 229–248, 2015.
- [28] T. Rozario and D. W. DeSimone, "The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view," *Dev. Biol.*, vol. 341, no. 1, pp. 126–140, 2010.
- [29] C. Deng *et al.*, "A Collagen–Chitosan Hydrogel for Endothelial Differentiation and Angiogenesis," *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 10, pp. 3099–3109, 2010.
- [30] L. Ma *et al.*, "Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 26, pp. 4833–4841, 2003.
- [31] L. Wang and J. P. Stegeman, "Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with  $\beta$ -glycerophosphate for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 31, no. 14, pp. 3976–3985, 2010.
- [32] J. E. McBane, B. Vulesevic, D. T. Padavan, K. A. McEwan, G. S. Korbitt, and E. J. Suuronen, "Evaluation of a Collagen-Chitosan Hydrogel for Potential Use as a Pro-Angiogenic Site for Islet Transplantation," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–15, 2013.
- [33] B. E. Pollot, C. R. Rathbone, J. C. Wenke, and T. Guda, "Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 75, pp. 672–679, 2017.
- [34] D. Lyon and C. Bernard, "Collagen The presence," *FASEB J.*, vol. 5, no. 60, pp. 2814–2823, 1991.
- [35] T. K. Merceron and S. V. Murphy, *Hydrogels for 3D bioprinting applications*. Elsevier Inc., 2015.
- [36] J. Yan, X. Li, L. Liu, F. Wang, W. Z. Tai, and Q. Zhang, "Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering," *Artif. Cells, Blood Substitutes*,

- Biotechnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 27–39, 2006.
- [37] L. P. Yan *et al.*, “Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 95 A, no. 2, pp. 465–475, 2010.
- [38] L. Bi *et al.*, “Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 51–62, 2011.
- [39] L. Geng, W. Feng, D. W. Hutmacher, Y. S. Wong, H. T. Loh, and J. Y. H. Fuh, “Direct writing of chitosan scaffolds using a robotic system,” *Rapid Prototyp. J.*, vol. 11, no. September 2004, pp. 90–97, 2005.
- [40] T. H. Ang *et al.*, “Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 35–42, 2002.
- [41] I. T. Ozbolat and M. Hospodiuk, “Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting,” *Biomaterials*, vol. 76, pp. 321–343, 2016.
- [42] M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, and M. Sato, “Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process,” vol. 23, pp. 833–840, 2002.
- [43] K. Murakami, H. Aoki, S. Nakamura, S. Nakamura, and M. Takikawa, “Biomaterials Hydrogel blends of chitin / chitosan , fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 1, pp. 83–90, 2010.
- [44] S. V. Murphy, A. Skardal, and A. Atala, “Evaluation of hydrogels for bio-printing applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 272–284, 2013.
- [45] J. Malda *et al.*, “25th Anniversary Article : Engineering Hydrogels for Biofabrication,” pp. 5011–5028, 2013.
- [46] E. Suesca, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga, H. C. de Sousa, and M. R. Fontanilla, “Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 333–341, 2017.
- [47] M. Rafat *et al.*, “PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 29, pp. 3960–3972, 2008.
- [48] D. R. Picout and S. B. Ross-Murphy, “Rheology of Biopolymer Solutions and Gels,” *Sci. World J.*, vol. 3, pp. 105–121, 2003.
- [49] K. H. Kang, L. A. Hockaday, and J. T. Butcher, “Quantitative optimization of solid freeform deposition of aqueous hydrogels,” *Biofabrication*, vol. 5, no. 3, 2013.
- [50] A. Telea and A. Jalba, “Voxel-based assessment of printability of 3D shapes,” *Lect. Notes Comput. Sci. (including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics)*, vol. 6671 LNCS, pp. 393–404, 2011.
- [51] Y. He, F. Yang, H. Zhao, Q. Gao, B. Xia, and J. Fu, “Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. July, 2016.

- [52] L. Ouyang, R. Yao, Y. Zhao, and W. Sun, "Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells," *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, pp. 1–12, 2016.
- [53] W. Lee *et al.*, "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication," *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1587–1595, 2009.
- [54] S. S. Aleksander Skardal, David Mack, Edi Kapetanovic, Anthony Atala, John D. Jackson, James Yoo, "Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds," *StemCells Transl. Merdicine*, vol. 1, pp. 792–802, 2012.
- [55] H. Zhang, K. Yang, G. Liu, S. Zhu, R. Yin, and W. Zhang, "3D bioprinting of multi - biomaterial / crosslinked bioink for skin tissue engineering," pp. 2–3, 2016.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Materiales precursores de hidrogeles

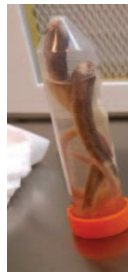
Los precursores de hidrogeles empleados para el desarrollo fueron dos: colágeno y quitosano. Se seleccionaron estos materiales por varios motivos, entre ellos: los antecedentes bibliográficos para su empleo en ingeniería de tejidos y también en bioimpresión, la relativa facilidad de su obtención a bajo costo. Adicionalmente, dado su uso son materiales de probada citocompatibilidad; en particular, a ambos se les han realizado ensayos de citotoxicidad para otras aplicaciones en el laboratorio donde se desarrolla este trabajo (comunicación personal [1\*]).

Para preparar las soluciones de quitosano, se empleó polvo de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich: grado de desacetilación del 92% y una viscosidad de 46 cps para la solución de 1%); se pesaron las masas correspondientes y se utilizó como solvente ácido acético 0,1M en volumen suficiente para la concentración de trabajo: 1%*m/v*, 2% *m/v* y 3%*m/v*. En cada caso se aplicó agitación con buzo magnético sometido a un campo alterno: entre 1 h, para el caso menos concentrado, y 14 h para el caso del quitosano 3%*m/v*.

El colágeno, en tanto, se obtuvo en el laboratorio a partir de colas de rata, siguiendo el protocolo adaptado de Rajan y colaboradores, que se describe a continuación.

#### 2.1.1 Protocolo de extracción de colágeno [1]

1. Se utilizaron colas de ratas de descarte, facilitadas por el bioterio del laboratorio de Biología del Comportamiento Animal, IBYME - instituto de Biología y Medicina Experimental.



**Figura 2. 1: Colas de rata de descarte inmersas en alcohol 96% para su conservación en esterilidad y traslado.**

2. Se colocaron las colas en alcohol 96% y se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 24hs.
3. Se removió la piel de las colas, dejando expuestas las fibras blancas de colágeno de los tendones.



Figura 2. 2: Disección de cola de rata: a la izquierda se encuentra la capa de piel y a la derecha el resto de la cola, donde se destacan los tendones.

4. Se desprendieron los tendones, en los cuales se apreciaba su composición de 80-90% colágeno aproximadamente [2], con una pinza y se los colocó en PBS 1X estéril.



Figura 2. 3: A la izquierda la piel de la cola y las vértebras, a la derecha los tendones, ricos en fibras de colágeno.

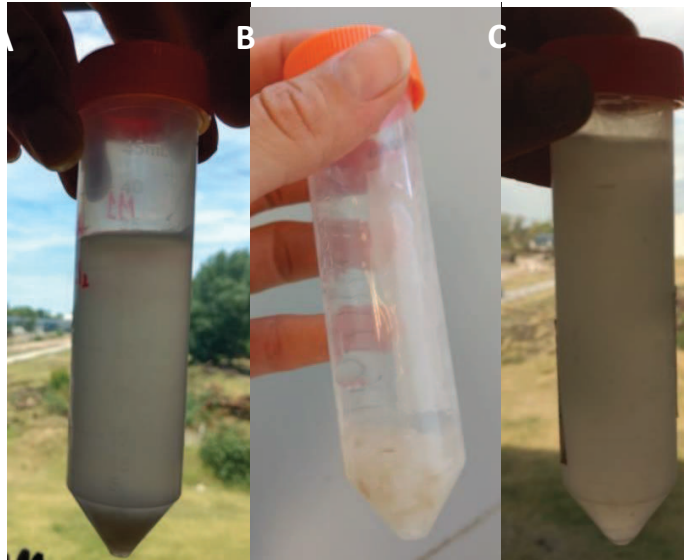
5. Se trozaron las fibras extraídas en porciones de aproximadamente 1 cm de largo.
6. Se colocaron las fibras cortadas en ácido acético glacial 1:1000, a un volumen de 50ml por cola.



Figura 2. 4: A la izquierda las fibras de colágeno enteras sumergidas en ácido acético 1:1000 y a la derecha las mismas fibras en secciones de aproximadamente 1 cm.

7. Se dejaron en agitación por una noche a 4°C.
8. Se hizo una primera centrifugación a 3000 rpm por 20 minutos a 4 °C.
9. Se efectuó una segunda centrifugación de 15 min a 15000xg a 4°C. De esta última, se obtuvo el colágeno del sobrenadante, descartando el precipitado.





**Figura 2. 5: A. El resultado de la centrifugación. B. Se observa el pellet que quedó después de separar el sobrenadante de colágeno. C. Solución de colágeno final.**

Para la cantidad de material requerida en este trabajo se obtuvieron tres lotes de colágeno, a partir de distinto número de colas de rata diferentes. Para estimar la concentración de colágeno se colocaron en cápsulas de Petri volúmenes conocidos de las soluciones, generalmente 2 ó 3 mL, y se freezaron por al menos 2hs, para luego liofilizar la muestra. Se determinó entonces el peso seco del polímero - que tiene la apariencia mostrada en la figura 2.6 - y, realizando el cociente con el volumen inicial, se calculó la concentración en porcentaje masa/volumen. Resultaron:  $0,73 \pm 0,099\%$ ,  $0,68 \pm 0,012\%$  m/v y  $0,861 \pm 0,006\%$ , para cada uno de los tres lotes producidos. El protocolo seguido asume que la masa liofilizada corresponde toda a colágeno, dada la composición de los tendones. Todos los ensayos presentados en Resultados suponen el uso del primer y segundo lote de extracción usándose el tercero solo en alguna ocasión especificada.



**Figura 2. 6: Aspecto del colágeno después del proceso de liofilización empleado para estimar su concentración en solución ácida.**

#### 2.1.1.1 Mezclas de precursores de hidrogeles:

Posteriormente, se procedió a mezclar las soluciones de colágeno y quitosano mediante agitación mecánica con hélice y/o magnética. En la tabla 2.1 se detallan las mezclas preparadas para realizar las evaluaciones.



**Tabla 2.2: Enumeración de las mezclas realizadas para ensayar distintas tintas**

Mezcla	Colágeno (%m/v)	Quitosa (%m/v)	pH
1	0,36	0,5	4,5
2	0,36	1	4,5
3	0,36	1,5	4,5
4	0,54	0,5	4,5
5	0,18	1,5	4,5
6	0,34	1	4,5
7	0,43	1,5	4,5
8	0,235	1	4,5

## 2.2 Caracterización de los precursores de hidrogel

Las mediciones reológicas ayudan a caracterizar el material y a analizar el flujo de los fluidos no newtonianos. Las determinaciones consisten en el estudio del flujo de la materia bajo la acción de una fuerza externa, razón por la cual son de significativa importancia para la biofabricación. Se establece entonces una correlación entre los resultados de parámetros reológicos y el proceso de deposición del precursor de hidrogel (“inyectabilidad”) mediante la jeringa extrusora de la bioimpresora. En la figura 2.7 puede observarse una representación de la distribución de tensiones impuesta a la tinta en el proceso de bioimpresión.

Se relaciona, entonces, la deformación  $\gamma$  impuesta por el reómetro con el desplazamiento del émbolo de la jeringa durante la extrusión. Dicha deformación se define como la relación entre el desplazamiento longitudinal  $\Delta z$ , respecto al radio del émbolo  $R$ , tal como se establece en la ecuación 1.

$$\gamma = \frac{\Delta z}{R} \quad Ec. 1$$

Luego, la velocidad de deformación  $\dot{\gamma}$  asociada a la velocidad de desplazamiento del émbolo de la jeringa se calcula como la derivada respecto del tiempo de la ecuación 1, resultando lo que establece la ecuación 2.

$$\dot{\gamma} = \frac{1}{R} \frac{\Delta z}{\Delta t} \quad Ec. 2$$

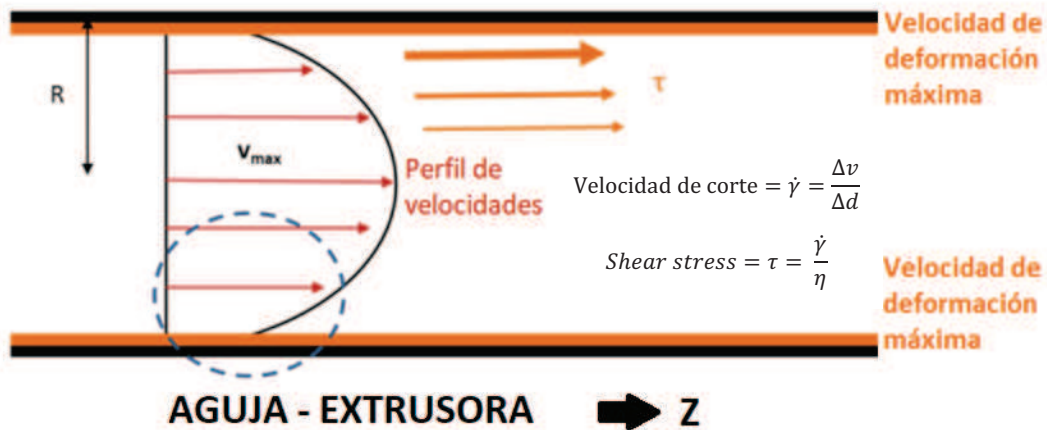


Figura 2. 7: Esquema de la sección del lumen de una aguja de radio R. El perfil de velocidades es parabólico, la tensión de corte es cero en el centro e incrementa linealmente hasta su máximo valor en la pared. Los fluidos pseudoplásticos presentan este comportamiento cuando fluyen a través de un capilar en el estado estable. [3]

Dada la geometría cilíndrica de la jeringa, se define la relación entre el volumen desplazado  $\Delta V$  con la variación de la posición en el eje longitudinal  $\Delta z$ , según la ecuación 3

$$\Delta V = \pi R^2 \Delta z \quad Ec. 3$$

Combinando las ecuaciones 2 y 3 se obtiene la relación entre la velocidad de corte y el caudal  $\frac{\Delta V}{\Delta t}$

$$\dot{\gamma} = \frac{1}{\pi R^3} \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad Ec. 4$$

El caudal es uno de los parámetros que definen el proceso de impresión, de modo que variando el caudal se controlará la velocidad de corte aplicada a la tinta.

### 2.3 Reómetro

El reómetro es el equipo de laboratorio que permite estudiar la relación entre el esfuerzo de corte requerido para que un material fluya y la velocidad con que este flujo se produce. La figura 2.8 muestra el equipo empleado en este trabajo. Además, el reómetro describe la respuesta del material ante una deformación: su viscosidad para una determinada velocidad de deformación y en estado estacionario. Para medir estas propiedades pueden hacerse ensayos de fluencia (figura 2.9), donde se aplican distintas velocidades de corte al fluido para obtener la resistencia que aporta el precursor de hidrogel y calcular viscosidad en el estado estacionario.



Figura 2. 8: Reómetro TA Discovery III empleado en el trabajo. La superficie de apoyo es una celda Peltier que permite conservar la temperatura en un rango entre -40 °C a 200 °C; en el soporte superior pueden colocarse diversas geometrías según el tipo de muestra y el ensayo que desee realizarse.

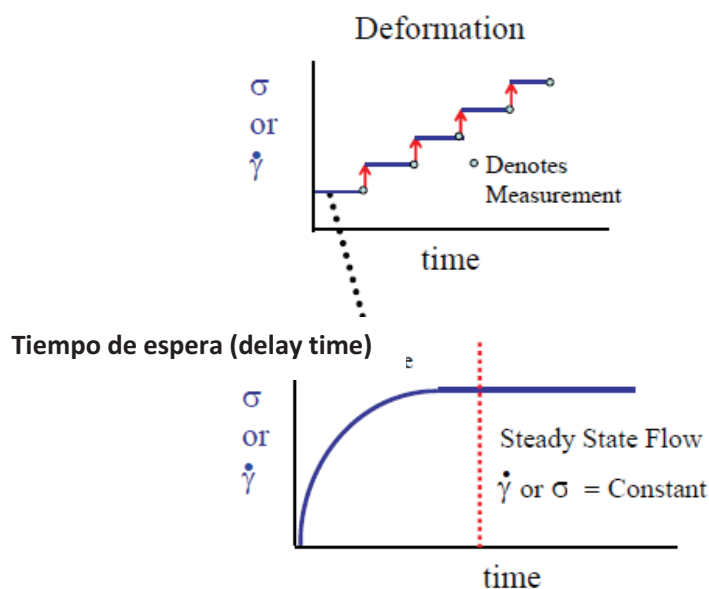


Figura 2. 9: Solicitación mecánica (tensión o velocidad de corte) para ensayo de fluencia de un material viscoelástico; mientras la tensión (velocidad) de corte se mantiene constante —durante el tiempo de espera—, la velocidad (tensión) de corte varía en el tiempo hasta alcanzar el valor de equilibrio.

Este equipo también permite realizar ensayos oscilatorios, que se emplean para obtener información sobre el fluido a tiempos cortos. Se impone una pequeña deformación en la región de comportamiento viscoelástico lineal (LVE), para independizarse de la magnitud de deformación o tensión impuesta, sensándose únicamente la resistencia que impone el material a esa deformación impuesta. Se aplica una deformación sinusoidal a una frecuencia constante de la forma  $\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t)$  y se sensa la tensión que ejerce el fluido  $\tau = \tau_0 \text{sen}(\omega t + \delta)$ ,  $\omega$  indica la frecuencia angular del ensayo y  $\delta$  el desfase entre ambas señales. En caso de que sea un sólido ideal el desfase  $\delta$  entre las señales del gráfico de la

imagen 2.5 sería de  $0^\circ$ , en caso de un líquido ideal  $\delta$  tomaría un valor de  $90^\circ$  y algún valor intermedio para un material viscoelástico [4].

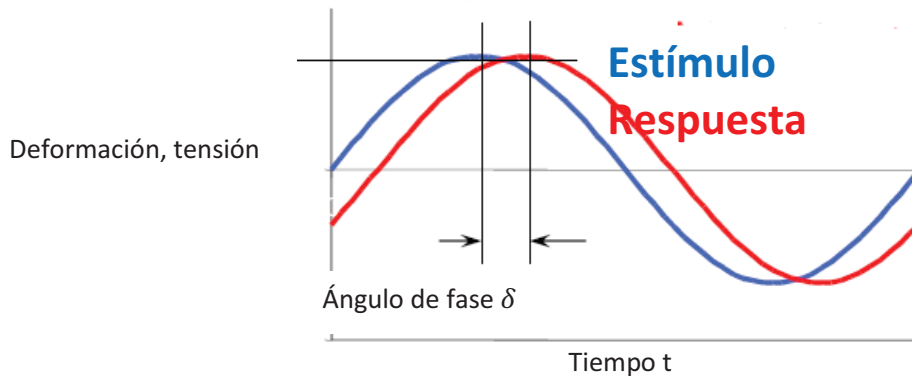


Figura 2. 10: Deformación impuesta al material (en azul), tensión de corte medida (en rojo)

El reómetro mide las señales de deformación ( $\gamma$ ) estímulo y de tensión ( $\tau$ ) respuesta y el desfase ( $\delta$ ) entre ambas, figura 2.10. Este valor indicará el grado de comportamiento sólido-líquido de material ensayado.

La mayoría de los materiales sólidos viscoelásticos se comportarán como líquidos a tiempos largos y la mayoría de los líquidos viscoelásticos responden como sólidos a tiempos cortos. Para ello, como se calculó en la sección 2.2, se emplean valores del rango de frecuencia acorde a la velocidad de deformación empleada en el proceso de bioimpresión.

Las magnitudes que el equipo mide son:

- el desplazamiento angular en radianes,  $\theta(t)$ ,
- la velocidad angular en rad/seg,  $\frac{d\theta}{dt} = \Omega(t)$
- el torque en Nm,  $M(t)$ .

A partir de estos parámetros, mediante el software del reómetro se calculan la tensión  $\tau(t) = K_\tau M$ , la deformación  $\gamma(t) = K_\gamma \theta$ , la velocidad de deformación  $\dot{\gamma}(t) = K_\gamma \frac{d\theta}{dt}$ , la viscosidad  $\eta(t) = \frac{\tau(t)}{\dot{\gamma}_o}$  y módulo  $G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma_o}$ .  $K_\tau$ ,  $K_\gamma$  son parámetros dependientes de la geometría empleada para la medición.

#### Protocolo de medición

La principal técnica reológica para caracterizar hidrogeles es la deformación oscilatoria de pequeña amplitud (conocida por su nombre en inglés: SAOS, Small Amplitude Oscillatory Shear). En este protocolo, una pequeña cantidad de muestra (figura 2.11) -aproximadamente de 0,5 mL- se dispone entre los discos paralelos o entre el plato y el cono donde una pequeña oscilación genera un flujo de corte en la muestra [5].

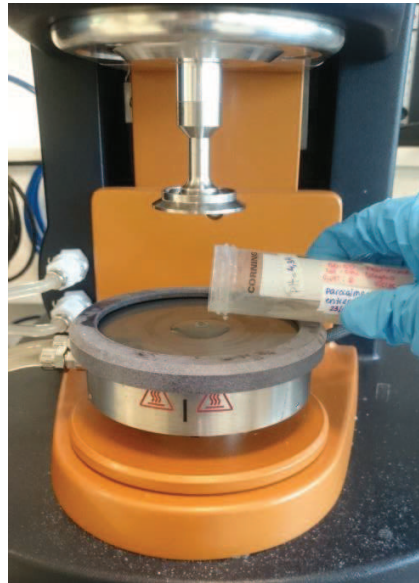


Figura 2. 11: Colocación de la muestra en la geometría cono plato.

El protocolo de medición que se siguió en todos los casos constó de tres ensayos consecutivos: a amplitud de deformación constante *un barrido de frecuencia*, como se observa en el gráfico de la figura 2.12 A (modo oscilatorio); luego, un *ensayo de fluencia* en el cual se midió la viscosidad en función de la velocidad de deformación  $\dot{\gamma}$  (modo fluencia); por último, un *barrido de deformación* a frecuencia constante, tal como se ve en la figura 2.12 B (modo oscilatorio). En la tabla 2.2 se especifican los valores empleados para cada ensayo realizado.

Tabla 3.2: Parámetros que se emplearon en los ensayos reológicos

Parámetro	Barrido de frecuencia	Ensayo de fluencia	Barrido de deformación
Temperatura	25°C	25°C	25°C
Frecuencia	[0,15-10]rad/seg	-	1rad/seg
Deformación	1%	-	[0,25-300]%
Velocidad de deformación	-	[0,015-100]s <sup>-1</sup>	-

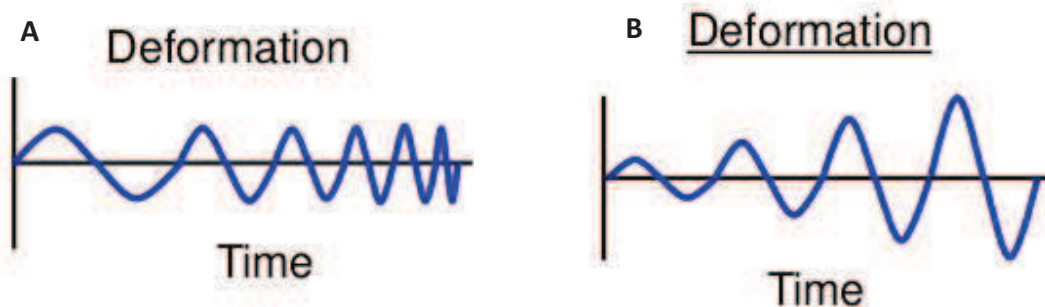
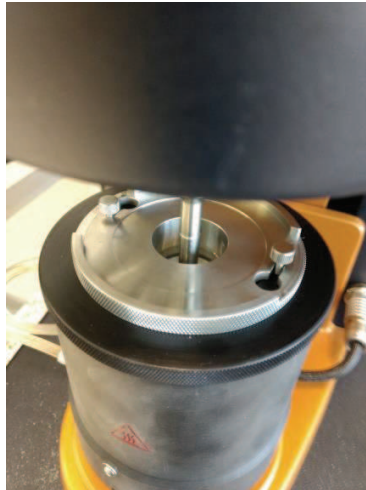


Figura 2. 12: Diagrama del movimiento impuesto a la muestra en los modos oscilatorios: a la izquierda en un barrido de frecuencia, a la derecha, en un barrido de deformación.

Las geometrías empleadas en el protocolo de medición fueron, según la viscosidad y la disponibilidad de cantidad de material para ensayar: Cono-Plato o Cilindros concéntricos. Esta última es más indicada para las tintas menos viscosas, debido a que la superficie de contacto entre la geometría de sensado (el cilindro) y el precursor de hidrogel es mayor, produciendo así mayor resistencia al movimiento. De esta manera se evita rozar el límite inferior de la sensibilidad del reómetro.



**Figura 2. 13: Geometría de cilindros concéntricos, con celda Peltier en el exterior. Se disponen aproximadamente 23ml de solución entre el cilindro y el recipiente cilíndrico.**

#### 2.4 Bioimpresora 3D

La bioimpresora empleada en este trabajo se presenta en la figura 2.14; es el modelo 3Donor de *Life SI* de desarrollo y fabricación íntegramente nacional. El avance del hardware y de la interfaz de control tuvieron mejoras significativas a lo largo de este trabajo por la constante realimentación hacia el desarrollador para mejorar y optimizar sus prestaciones.

La bioimpresora involucra una plataforma con movimientos XYZ con una mesa de apoyo donde se coloca la cápsula de Petri que va a alojar el sustrato impreso. Tiene dos recintos donde se pueden colocar las

jeringas (en este caso de 1ml) con el material a imprimir; además, uno de los recintos posee una camisa para termostatar la jeringa.

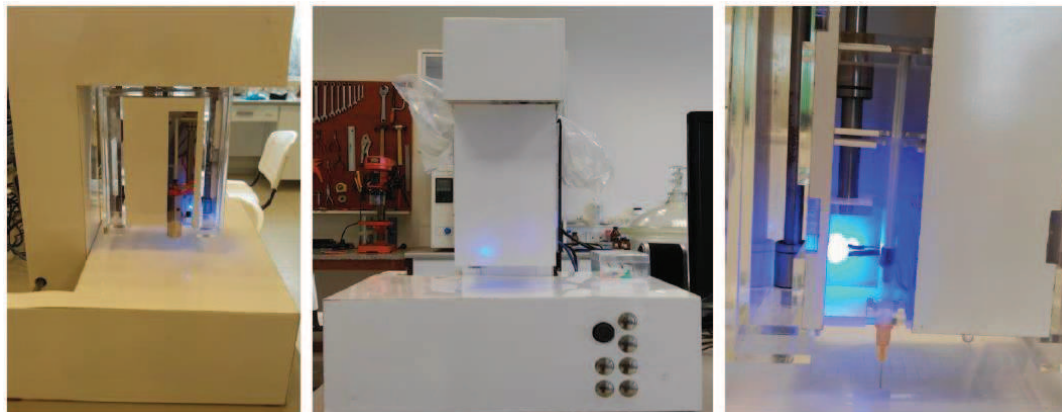


Figura 2. 14: Impresora 3Donor en distintas vistas.

A partir de los parámetros del software se puede controlar el tiempo empleado en la eyección del material, además de la cantidad de material depositado entre punto y punto y la distancia entre puntos que se dejó en un valor constante estandarizado por el fabricante. Se evaluaron tres condiciones de impresión resumidas en la tabla 2.3. Para esto se empleó una aguja punta roma de 25G, es decir, un diámetro interno de  $260 \mu m$ .

Tabla 2.4: Parámetros establecidos desde el software para cada condición de impresión evaluada.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3
Cantidad de material (U.A.)	1	2	1
Tiempo entre puntos de impresión consecutivos (ms)	1000	1000	500

## 2.5 Imprimibilidad (Pr)

El diseño escogido en este trabajo para medir la Imprimibilidad, Pr (por la denominación en inglés, Printability) es el que se muestra en la figura 2.15. Es una malla de nueve huecos cuadrados de 4 mm de lado, cuyo espesor es de 0,3mm; se elige este grosor para que el software que comanda la impresora, slic3r, genere en el GCODE un solo camino del cabezal de extrusión por lado (una sola pasada de la boquilla de impresión). El diseño se hizo con el programa Solid Works.

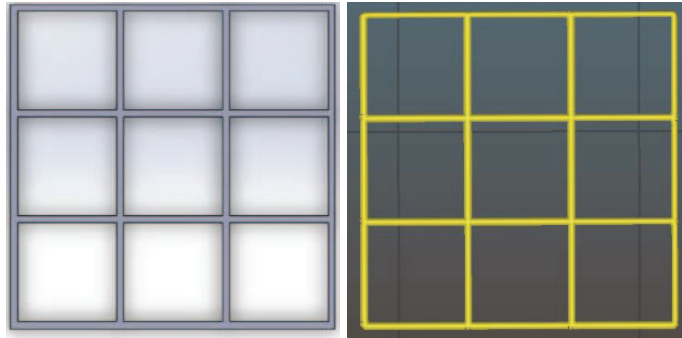


Figura 2. 15: A la izquierda, diseño de la malla implementada para medir la capacidad de impresión de los distintos hidrogeles, a la derecha el camino que va a realizar el cabezal establecido por el slic3r para la generación del GCODE.

El índice  $Pr$  que describe la capacidad de impresión de los geles es el descrito, como convención en nuestro trabajo, en la ecuación 11; apunta a la fidelidad de tamaño del área impresa versus el área del diseño digital [6], [7]. Adicionalmente se empleó la ecuación 12 para calcular  $Pr$ : si la geometría impresa es un cuadrado vale 1 y se reduce el valor a medida que se redondean los ángulos de la grilla impresa.

$$Pr_{Area} = \frac{A_{eff}}{A_{Teorica}} \quad Ec. 11$$

$$Pr_{Morfología} = \frac{p^2}{16A} \quad Ec. 12$$

donde  $A_{eff}$  es el área impresa medida por técnicas de imágenes implementando el software Image-J®,  $A_{Teorica}$  es el área de la grilla según diseño,  $P$  indica el perímetro del hueco impreso y  $A$  el área de dicho hueco.

Para construir las mallas se cargaron los distintos precursores de hidrogel en una jeringa de 1ml de capacidad, colocándola en el cabezal móvil de la impresora. Como soporte de la malla se utilizó un portaobjetos de vidrio de 25,4 X 76,2 mm y de un grosor de entre 1 y 2 mm.

Las imágenes de los diseños se adquirieron apenas impresos. El sistema de toma de imágenes, tal como se ve en la figura 2.16 consta de una cámara digital con aumento, un recinto opaco cilíndrico que impide el paso de luz dispersa desde el ambiente, y una fuente de luz led con un difusor de papel manteca. Esta fuente queda debajo del impreso a fotografiar, lo cual permite un óptimo contraste del filamento impreso con el fondo.





Figura 2. 16: Esquema del sistema de adquisición de imágenes para el análisis de imprimibilidad.

## 2.6 Entrecruzamiento del precursor de hidrogel

Para la construcción de los sustratos, el precursor del hidrogel debe ser entrecruzado. Entre las opciones, se puede pensar en un entrecruzamiento capa por capa, que permita luego intercalar la siembra de células durante un futuro proceso de bioimpresión.

Dado que no existían antecedentes bibliográficos de la gelificación de la mezcla colágeno-qitosano empleados para bioimpresión, se probaron distintos métodos para llevar la mezcla a pH neutro; se los describe a continuación.

### 2.7.1 Mezclado con NaOH 1M

Se incorporó a la mezcla NaOH 1M y PBS 10X en distintas proporciones para llevar a un pH de entre 7 y 7,4. Dichas soluciones se mezclaron empleando un vortex y se llevaron a temperatura en un baño a 37°C, por al menos 30 min.

También se intentó imprimir el precursor de hidrogel y con la segunda jeringa depositar las gotas de hidróxido de sodio 1M. Sin embargo, la localización de la gota sobre el impreso generó una estructura no homogénea. En la figura 2.17 se observa, la rapidez de la cinética de entrecruzamiento del qitosano dando lugar a marcas donde cayeron las gotas donde se depositó el NaOH 0,5M.



**Figura 2. 17: Impresión de la grilla empleando quitosano 3,44% entrecruzado en la primera jeringa con hidróxido de sodio 0,5M en la segunda jeringa**

### 2.7.2 Nebulización $\text{NaHCO}_3$ 0,8M

Para sobrellevar la limitación presentada por la deposición de gotas del agente entrecruzante sobre el precursor de hidrogel se optó por la técnica de nebulización con una base débil. Se empleó un nebulizador ultrasónico marca San-Up Modelo 3042/3059, que provee partículas entre 1,5 y 5,7  $\mu\text{m}$  con una frecuencia de oscilación de 2.5 MHz y un flujo de al menos 0.5ml/min. Se efectuaron en promedio 3 ciclos de 5 minutos, controlando el pH periódicamente hasta un rango de 7-8,5.

### 2.7.3 Agregado de agentes entrecruzantes NHS y EDC con nebulización de $\text{NaHCO}_3$ 0,8 M

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de los sustratos elaborados con la tinta Colágeno 0,36% y Quitosano 1%, se agregaron los agentes entrecruzantes: EDC (1-ethyl-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida) en concentración 15 mM y NHS (N-hidroxisuccinimida) 4mM [8], ambos adquiridos a Termofisher. La mezcla se realizó y se mantuvo a 0°C hasta que se cargó en la jeringa para realizar la impresión del sustrato como de rutina. Posteriormente, para lograr el hidrogel al igual que en el apartado anterior, se realizó un ciclo de nebulización de 10 minutos y una estabilización de 5 minutos. Por último, se incubaron los sustratos nebulizados en el baño a 37°C.

Del punto 2.8 en adelante, salvo que se aclare lo contrario, se prosiguió con el método de generación de sustratos postulado en la sección 2.7.3.

## 2.7 Analizador mecánico dinámico

Para cuantificar la rigidez de los sustratos se imprimieron probetas de aproximadamente 1mm de espesor y se cortaron muestras de 12mm de diámetro con un sacabocados circular.

Para determinar la respuesta mecánica de los sustratos gelificados y entrecruzados se utilizó un analizador mecánico dinámico (DMA) modelo Q800 (TA Instruments, DE, EE.UU). Se realizaron ensayos de compresión sobre los sustratos utilizando la geometría de 15 mm de diámetro con el modo fuerza controlada, empleando los parámetros especificados en la tabla 2.4

Tabla 2.5: Parámetros empleados en el DMA para el ensayo de compresión a fuerza controlada.

Parámetro	Valor
Temperatura	37°C
Precarga	0,01N
Rampa de fuerza	0,02 N/min
Límite de fuerza	1 N

Se calculó el módulo de compresión (E) como el valor de la pendiente en la región lineal de la curva “tensión vs deformación” entre los valores de 5% a 10% de deformación. Se realizaron tres réplicas para los hidrogeles entrecruzados con NHS y EDC, pero para aquellos que no incluían NHS y EDC se realizó un único ensayo, ya que no eran suficientemente íntegros como para ensayar varias réplicas: cuando se intentó colocar la segunda muestra en el DMA se desarmó.

## 2.8 Estabilidad en PBS

Se imprimieron cinco probetas de aproximadamente 250uL de tinta dispuesta en una geometría cuadrada de 15mmx15mm de superficie y 1mm de alto aproximadamente. Se seleccionó a esta altura del trabajo la composición de tinta colágeno 0,36% y quitosano 1% (entrecruzada con el método expuesto en la sección 2.7.3) debido a que presentó adecuadas propiedades reológicas para los fines de bioimpresión y una rigidez mecánica adecuada para el manipuleo.

Se pesaron las probetas para determinar su peso inicial,  $W_0$ , y se las sumergió en PBS 1X a 37°C durante 72 hs. Se controló la masa de los sustratos, en intervalos de tiempo determinados, extrayendo el sustrato y secándolos por escurrido por gravedad y apoyándolo en un trozo de papel secante. Los ensayos se hicieron por duplicado. Se calculó la masa residual (M.R.) como el cociente entre el peso del sustrato seco en un momento t determinado ( $W_t$ ) y la masa de la probeta inicial ( $W_0$ ), tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$M. R. (\%) = \frac{W_t}{W_0} * 100\%$$

## 2.9 Degradación

Se preparó una solución de PBS (pH 7,4) con 60uL de 1mg/ml de la solución de colagenasa (de *Clostridium histolyticum*, Sigma) cada 5 ml de PBS. Se imprimieron probetas cuadradas con aproximadamente 250uL de tinta 0.36% de colágeno y 1% de quitosano (n=5), y dos probetas como control positivo, hechas de colágeno 0,72%*m/v*. Todas las probetas se entrecruzaron siguiendo la sección 2.7.3 para lograr la formación del sustrato y se sumergieron en 4 ml de la solución colagenasa/PBS. Se incubaron a 37°C por un periodo de 44hs o hasta su completa desintegración en el caso de los sustratos hechos de colágeno como único polímero. Se tomó el peso de cada muestra a distintas horas después de escurrirlas por gravedad y apoyando en papel secante. El porcentaje de masa residual fue calculado como:

$$M. R. (\%) = \frac{W_t}{W_0} * 100\%$$

Donde  $W_0$  es la masa inicial del sustrato y  $W_t$  es la masa de la probeta sumergida en cada momento.

## 2.10 Caracterización morfológica

Para analizar la estructura microscópica de los sustratos obtenidos con la tinta colágeno 0,36%, quitosano 1%, con las distintas técnicas de entrecruzamiento postuladas en las secciones 2.7.1-2 y 3, a partir del sustrato 2 las dimensiones de impresión fueron de 16x16x1mm:

1. Sustrato "NaOH" generado con el protocolo 2.7.1.
2. Sustrato impreso "NaHCO<sub>3</sub>" con el protocolo 2.7.2.
3. Sustrato impreso "NaHCO<sub>3</sub>/NHS-EDC" con el protocolo 2.7.3.
4. Sustrato impreso "NaHCO<sub>3</sub>/NHS-EDC" con el protocolo 2.7.3 sumergido por 5hs en PBS 1X según el protocolo presentado en la sección 2.9.
5. Sustrato impreso "NaHCO<sub>3</sub>/NHS-EDC" con el protocolo 2.7.3 sumergido por 5hs en colagenasa según el protocolo presentado en la sección 2.10.
6. Sustrato impreso "NaHCO<sub>3</sub>/NHS-EDC" con el protocolo 2.7.3 sumergido por 14hs en colagenasa según el protocolo presentado en la sección 2.10.

Todas las muestras se sometieron a -20°C por al menos 2 horas. Luego se liofilizaron, se las sumergió en nitrógeno líquido y se realizaron cortes con bisturí para obtener las secciones transversales. Las secciones se metalizaron con un Mini Sputter Coater modelo SC7620 con 60% paladio y 40% oro. Para la visualización y toma de imágenes, se empleó un microscópico electrónico de barrido de alto vacío Philips XL30.

## 2.11 Citotoxicidad

Se realizaron los ensayos indicados en la norma ISO 10993-5, midiendo citotoxicidad directa e indirecta en fibroblastos NH-3T3 para los sustratos impresos con la tinta colágeno 0,36% quitosano 1%, con inclusión de NHS y EDC entrecruzados por nebulización de NaHCO<sub>3</sub> 0,8M. Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dr. Ana González Sánchez, del Grupo Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (CONICET-UNSAM).

Se imprimieron y entrecruzaron 5 probetas cilíndricas de 5 mm de diámetro y 1 mm de alto, y se esterilizaron sumergiéndolas en etanol 70% y sometiéndolas a luz UV por 15 minutos en cabina de bioseguridad.

### 2.12.1 Citotoxicidad directa

Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células por pocillo en un multiwell-24, se incubaron por 24 horas a 37°C y atmosfera 5% CO<sub>2</sub>. En cada uno de los pocillos se colocó la muestra en estudio, de tal manera que ocupara un 10% de la superficie. Se utilizó medio como control nulo, látex como control positivo, y teflón como control negativo.

Las células se cultivaron con los materiales por 24 horas a 37°C y atmosfera 5% CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo, se removió el medio de cultivo y el material a evaluar de cada uno de los pocillos. Se fijaron las células utilizando paraformaldehído 4% m/v durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó cada uno de los pocillos con PBS 2 veces y el material se conservó a 4°C.

### *2.12.2 Citotoxicidad indirecta*

Se colocó el sustrato a analizar en medio de cultivo celular en una relación 6:1 área del material (cm<sup>2</sup>): medio (ml) por 72 hs a 37°C en una atmosfera húmeda que contiene 5% de CO<sub>2</sub>. El extracto del material fue comparado con un medio nulo (puramente medio), con un control positivo (goma de latex) y con un control negativo (Teflon, DuPont, DE). Las células se incubaron en un plato multi-well de 24 pocillos (Corning Costar, MA) a 37°C con una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Después de una incubación de 24hs, el medio de cultivo fue reemplazado por el extracto puro y el mismo extracto pero diluido 1/16 en medio celular. Las células fueron incubadas con estos cinco extractos por 24hs.

Tanto la evaluación de citotoxicidad directa como indirecta fueron analizadas cualitativamente a través de un microscopio de óptica invertida NIKON TE2000-U, equipado con cámara CCD (Orca-AG, Hamamatsu) acoplada al microscopio y controlada por el programa Metamorph (Molecular Devices), utilizando un objetivo 10X.

## 2.12 Referencias

- [1\*] Ana Gonzales Wusener, Ignacion E. Ruiz, Alberto N. Bolgiani, Carlos O. Arregui, Elida B. Hermida. "In vitro assessment of chitosan membranes as wound dressing for skin regeneration," IIB UNSAM CONICET.
- [1] C. J. Doillon, D. Mantovani, N. Rajan, J. Habermehl, and M. Cote, "Preparation of ready-to-use , storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications," vol. 1, no. 6, pp. 2753–2758, 2007.
- [2] D. A. D. Parry and A. S. Craig, "Collagen fibrils and elastic fibers in rat-tail tendon: An electron microscopic investigation," *Biopolymers*, vol. 17, no. 4, pp. 843–855, 1978.
- [3] M. H. Amer, F. R. A. J. Rose, K. M. Shakesheff, M. Modo, and L. J. White, "Translational considerations in injectable cell-based therapeutics for neurological applications: concepts, progress and challenges," *npj Regen. Med.*, vol. 2, no. 1, p. 23, 2017.
- [4] D. R. Picout and S. B. Ross-Murphy, "Rheology of Biopolymer Solutions and Gels," *Sci. World J.*, vol. 3, pp. 105–121, 2003.
- [5] J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert, and F. A. Morrison, "A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies," pp. 1063–1073, 2013.
- [6] Y. He, F. Yang, H. Zhao, Q. Gao, B. Xia, and J. Fu, "Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. July, 2016.
- [7] L. Ouyang, R. Yao, Y. Zhao, and W. Sun, "Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells," *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, pp. 1–12, 2016.
- [8] M. Laronda *et al.*, "A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May, pp. 1–10, 2017.

## 3 Resultados y Discusión

### 3.1 Polímeros

#### 3.1.1 Obtención de colágeno a escala laboratorio.

El colágeno pudo extraerse según un protocolo adaptado del original [1], tal como se detalla en la sección 2.1. de Materiales y Métodos. De la observación realizada con un microscopio de fuerza atómica, se obtuvo la imagen que se muestra en la figura 3.1 a partir del colágeno depositado en una superficie de silicona. Se constató la presencia de fibras de colágeno, ya que además de su observación morfológica, al tomar sus dimensiones de diámetro en la imagen microscópica – 300 a 400 nm – se pudieron comparar con las dimensiones reportadas en bibliografía para fibras de colágeno, detalladas en Fig. 3.2[2].

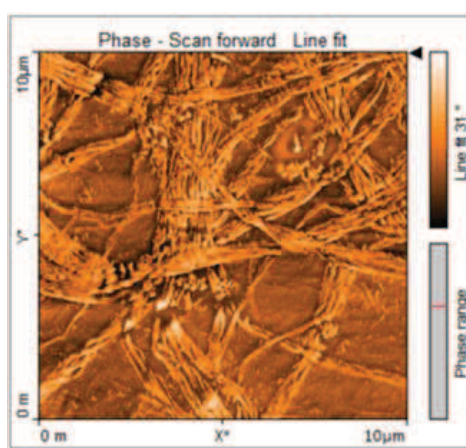


Figura 3. 1: Imagen obtenida de las fibras de una solución de colágeno 0,2% m/v por microscopía de fuerza atómica, cortesía de la Fundación Argentina de Nanotecnología.

Si bien en las membranas comerciales que asisten la regeneración de piel se emplea colágeno de origen bovino—*Apligraf* de Organogenesis Inc, Canton, MA, USA and Novartis Pharmaceuticals Corporation East Hanover, NJ, USA o *Integra* de Integra Life Science Corporation, Planisboro, NJ, USA— o porcino — *Biobrane* de Dow Hickam/Bertek Pharmaceuticals, Sugar Land, TX, USA— [3], en este trabajo, así como en muchos trabajos de investigación [4][5][6], se empleó colágeno proveniente de cola de rata. Esto se debió a la facilidad y similitud del proceso de extracción con las demás fuentes de colágeno tipo I [1], disponibilidad en el lugar de trabajo, semejanza en propiedades mecánicas [2] y en el tratamiento con los distintos colágenos antes mencionados [7].

#### 3.1.2 Mezclas de colágeno y quitosano

La generación de las tintas compuestas por ambos biopolímeros resultó exitosa desde la perspectiva morfológica de la mezcla de ambos precursores de hidrogeles. En todos los casos, presentados en la Tabla 2.1 del capítulo Materiales y Métodos, no se observó separación de fases por precipitación o falta de solubilidad de algunos de los componentes. Todas las tintas resultaron en un pH final de aproximadamente 4,5.

Cabe destacar que durante el desarrollo del trabajo se almacenaron los precursores de hidrogel en tubos falcon a 4°C, aproximadamente 6 meses. Algunos de los tubos que contenían colágeno mostraron

crecimiento bacteriano; es por esto que para futuros trabajos se recomienda almacenar dicho polímero liofilizado y fraccionarlo para disolverlo logrando la concentración deseada, o bien esterilizarlo por radiación o filtrado. Por otro lado, también se registró una disminución de la viscosidad de las muestras que contenían quitosano con el paso del tiempo, debido probablemente a una auto-hidrólisis en el medio ácido.

## 3.2 Motivación estudio reológico

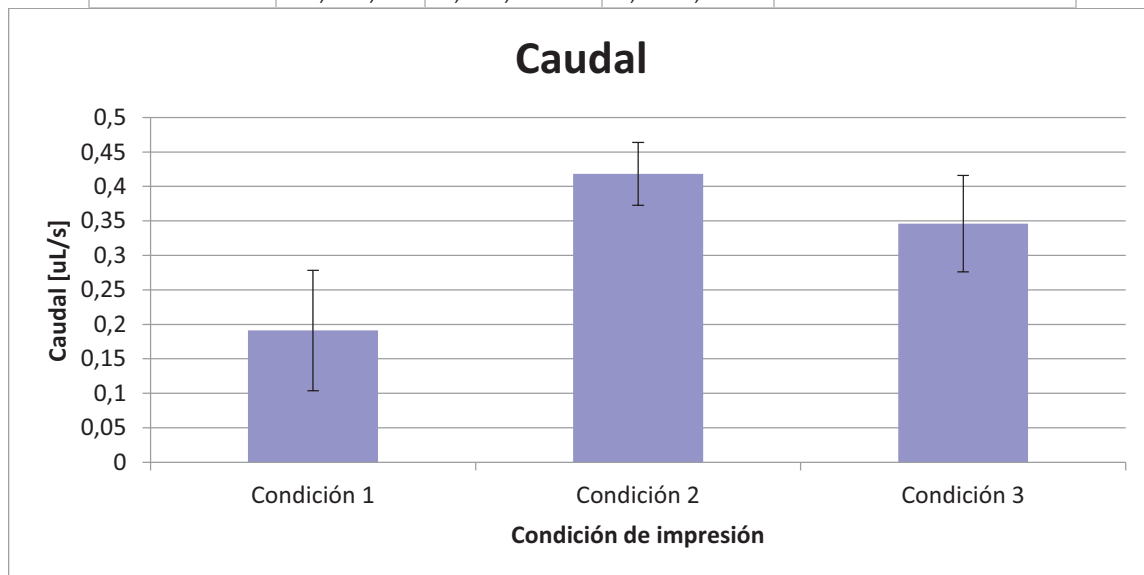
### 3.2.1 Caudal y análisis de inyectabilidad

Dado que la bioimpresión implica un proceso de extrusión de la tinta -(o biotinta, en un futuro-) se asocia el efecto de inyección a través de la jeringa con una velocidad de deformación específica. Como motivación del estudio reológico de las tintas, se hizo primero una analogía entre el caudal de las diferentes condiciones de impresión y la velocidad de deformación aplicada al precursor de hidrogel.

Trabajando con la bioimpresora, se estimó el **caudal** del proceso de impresión mediante la medición de tiempo de eyección de un volumen conocido de tinta. Este dato permitió estimar la velocidad de deformación aplicada a la tinta en cada condición de impresión (1, 2 y 3) y conocer entonces el valor de viscosidad asociado a cada tinta en la impresión, a partir de los datos de análisis reológicos. Dichos resultados se presentan en la tabla 3.1 y se muestran en el gráfico de la figura 3.2.

**Tabla 3.1:** Resultados obtenidos a partir de la evaluación de la masa eyectada y el tiempo que llevo realizar un patrón diseñado para controlar el flujo o caudal de material implicado en cada configuración.

Configuración	Tiempo [s]	Volumen [ul]	Caudal [ul/s]	Velocidad de corte [1/s]
1	22,6±0,1	4 ±1	0,19±0,09	28±12
2	22,8±0,3	10±1	0,42±0,04	60±7
3	12,7±0,2	4,4±0,8	0,35±0,07	50±10



**Figura 3. 2:** Estimación del caudal resultante de cada condición de impresión.



### 3.2.2 Velocidad de deformación

Mediante el cálculo del caudal se estimó, empleando la ecuación 3 presentada en Materiales y Métodos, la velocidad de deformación que se le impone al precursor de hidrogel en la jeringa en el momento de impresión.

La velocidad de corte calculada para una aguja de 25 G (260um de diámetro interno) a partir de los valores de caudal impuestos por las configuraciones 1, 2 y 3 presentados en el gráfico de la figura 3.3.

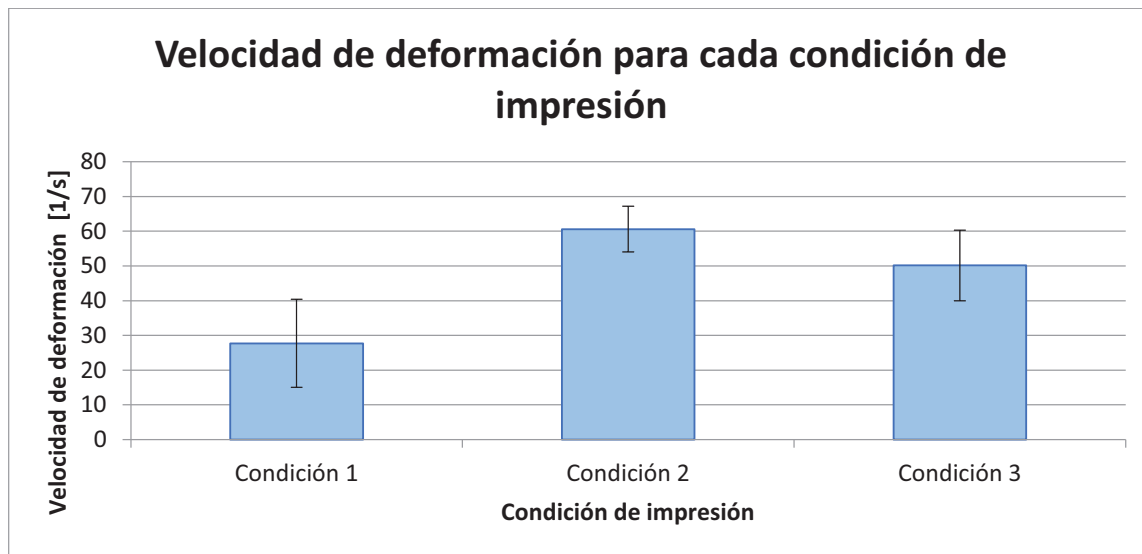


Figura 3. 3: Velocidad de deformación aplicada a la jeringa de la impresora para cada condición de impresión.

### 3.3 Caracterización reológica

Para el análisis de la viscosidad aparente ( $\eta$ ) de los precursores de hidrogel se compararon los componentes en función de su concentración, en el rango de concentraciones presentes en las mezclas. Para todos los casos, se efectuaron al menos dos ensayos sobre sendas muestras de precursor de hidrogel.

En primer lugar, se presentan las características reológicas de cada componente de las tintas.

#### 3.3.1 Colágeno

La Figura 3.4 muestra las curvas de viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para el colágeno. Las curvas de color azul pertenecen a un primer lote de colágeno, mientras que las curvas de color verde corresponden a un segundo lote, correspondiente a otro proceso de extracción. Si bien se siguió el mismo protocolo, las diferencias dan cuenta de los cambios en las características de las fibras de colágeno entre muestras tomadas de conjuntos de animales diferentes, donde cada lote incluía diferentes ratas.

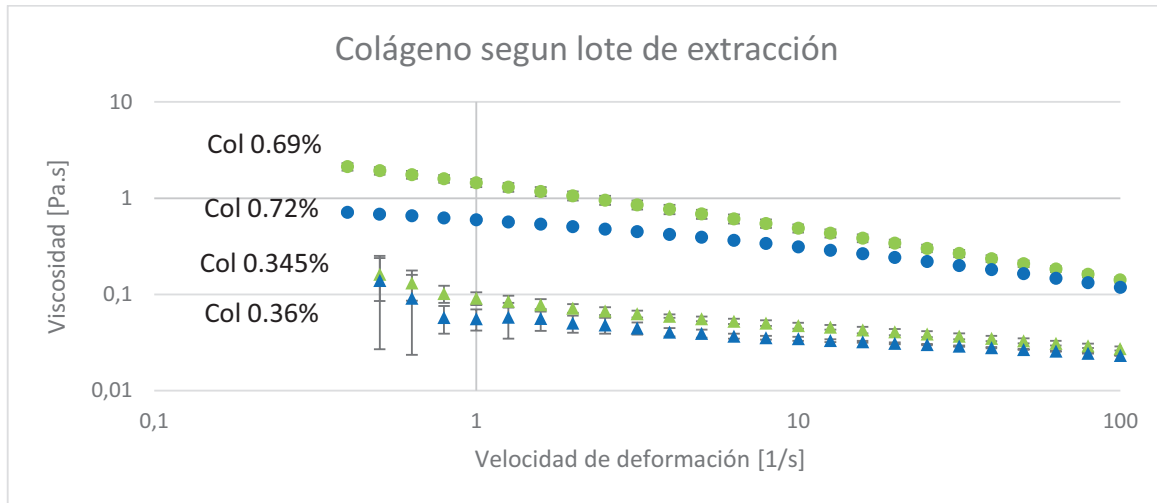


Figura 3. 4: Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para el colágeno, uno de los componentes de las tintas. El colágeno proviene de dos lotes de extracción, indicados según el color, y se midió a dos concentraciones diferentes cada lote.

Se pudo observar el comportamiento tixotrópico de este precursor de hidrogel, es decir, la disminución de la viscosidad aparente a medida que aumentaba la velocidad de deformación. Además, se advirtió el efecto de la reducción de la viscosidad al disminuir la concentración del polímero, en cada solución para un mismo proceso de extracción. Finalmente, la mayor diferencia entre soluciones de colágeno extraídos de diferentes muestras se aprecia a bajas velocidades de deformación.

### 3.3.2 Quitosano

En comparación con el comportamiento del colágeno, la Figura 3.5 mostró que la viscosidad del quitosano 1% resulta prácticamente independiente de la velocidad de deformación en el mismo intervalo de velocidades, dando una idea de un comportamiento newtoniano del fluido.

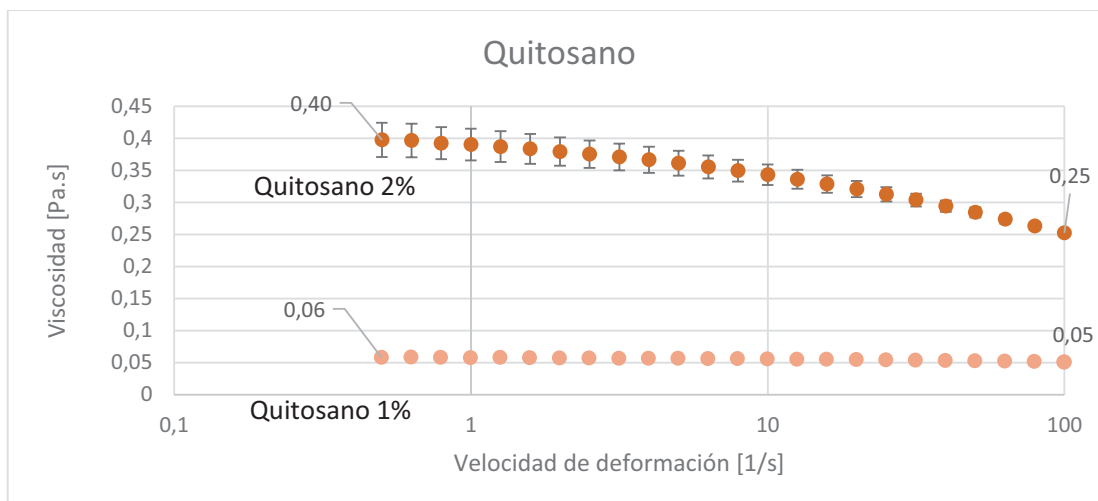


Figura 3. 5: Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para dos concentraciones diferentes de quitosano en ácido acético 0,1M . Se incluyen el primer y el último valor de viscosidad, para cuantificar la máxima variación.

A continuación, se presenta el estudio reológico de las mezclas indicadas en la tabla 2.1 también en estado de fluencia, dado que es a lo que están sometidas en el proceso de extrusión (para una condición estacionaria, es decir, que cada punto está tomado a una única velocidad de deformación).

### 3.3.3 Efecto del colágeno en solución de quitosano 1%

En la Figura 3.6, se presentan las viscosidades de mezclas de soluciones ácidas de diferentes concentraciones de colágeno con 1% m/v de quitosano. Con el objetivo de ampliar la comparación, en este caso se incluyó la curva en color gris perteneciente a un tercer lote de extracción de colágeno, no utilizado en el resto del trabajo. Como excepción de lo que se aclaró en cuanto al número de ensayos, la curva verde presenta una única replica, debido a la disponibilidad del material en el momento a ensayar. En las demás curvas, no llega a observarse la barra de error porque es menor que el tamaño del punto. Se incluyen en el gráfico las velocidades de deformación calculadas en la sección 3.2.2. asociadas a las tres condiciones de impresión.

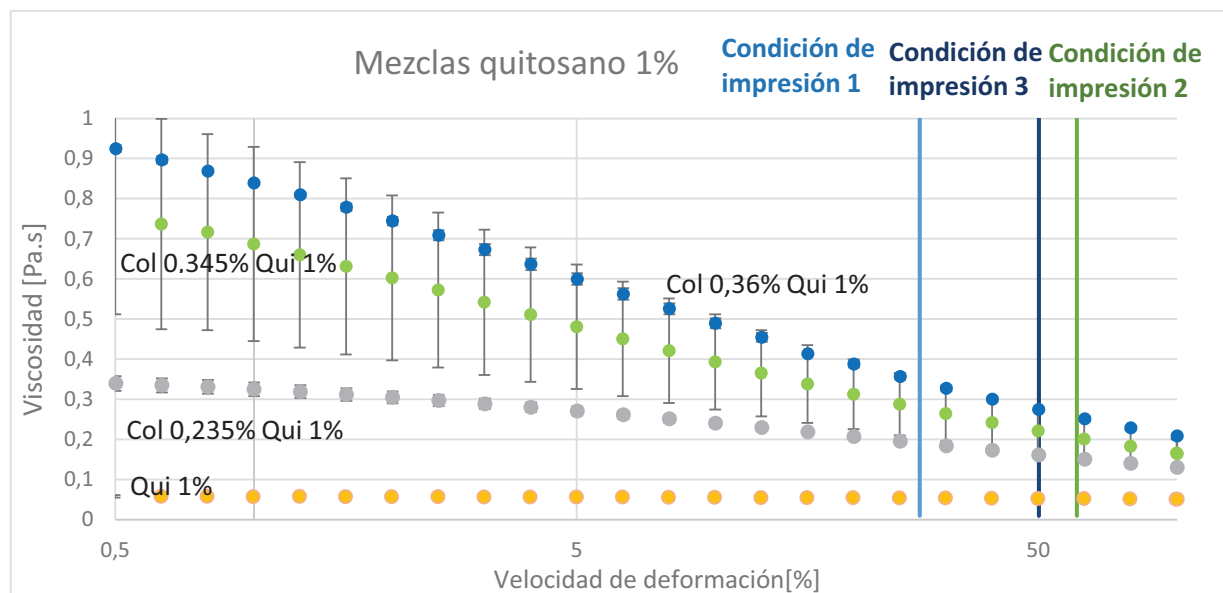


Figura 3. 6: Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para distintas mezclas, comparadas con el componente común a todas: quitosano 1%. Los colores de las curvas indican distintas partidas de extracción de colágeno. En vertical se encuentran marcadas las velocidades de deformación impuestas en cada condición de impresión.

A partir del análisis de estas curvas, pudo observarse que la viscosidad aparente aumentaba al incorporar colágeno; además, no sólo dependía de la concentración final de colágeno sino también del lote en que fue extraído el mismo, tal como se había observado para el colágeno solo. Por otro lado, se apreció de los resultados que el agregado de colágeno a la solución aportaba el comportamiento tixotrópico a la mezcla final.

### 3.3.4 Efecto del quitosano en solución de colágeno 0,36%

Se presenta a continuación la influencia sobre la viscosidad del agregado de diferentes cantidades de quitosano a una misma solución de colágeno, de concentración final 0,36% m/v. Nuevamente, se

presenta en color azul indicando colágeno correspondiente al primer lote de extracción; utilizándose sólo éste a fin de observar variaciones únicamente por concentraciones de quitosano.

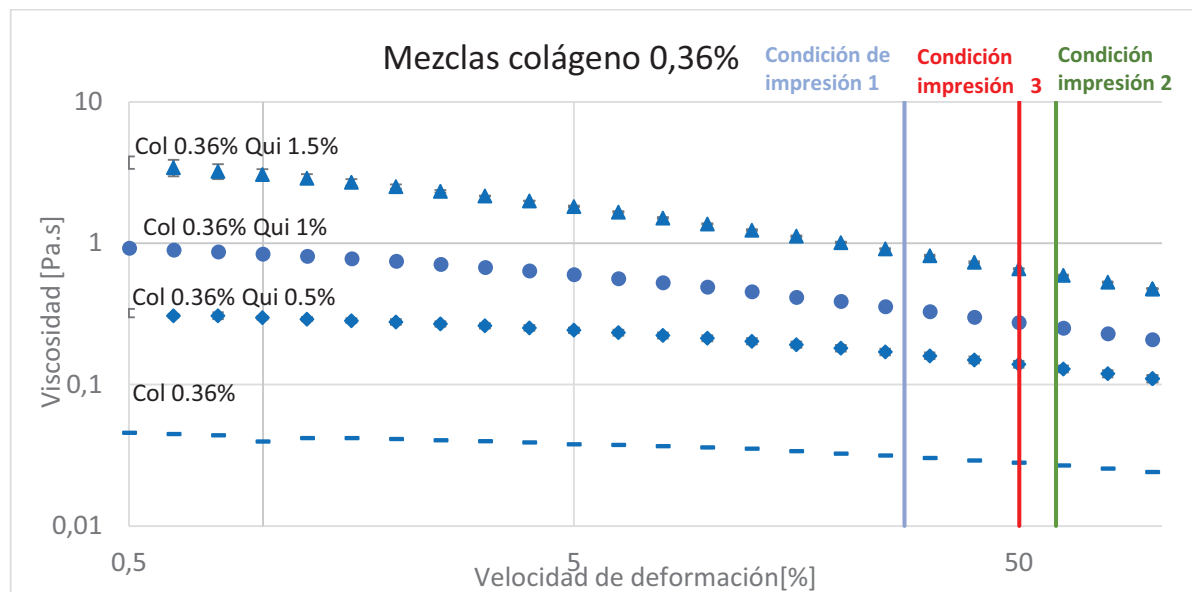


Figura 3. 7: Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para distintas mezclas, comparadas con su componente común: colágeno 0,36%, de un único lote de extracción. En vertical se encuentran marcadas las velocidades de deformación impuestas en cada condición de impresión.

Se observa en la Figura 3.7 que, al aumentar la concentración de quitosano, aumenta la viscosidad de la mezcla en todos los casos. Adicionalmente, en todas las mezclas se conserva la tixotropía presente en la solución de sólo colágeno.

### 3.3.5 Pre-entrecruzamiento

Dado que la gelación de ambos polímeros se da en neutralidad de pH, para medir el efecto del incremento del pH en la viscosidad de las mezclas, se agregó NaOH 1M a las mezclas. De esta forma, se incrementó el pH original de 4,50 a aproximadamente 6, para las mezclas Col 0,345%-Qui 1% y Col 1,36%-Qui 1%, antes de los barridos reológicos.

### 3.3.5.1 Mezcla Col 0,345% - Qui 1%

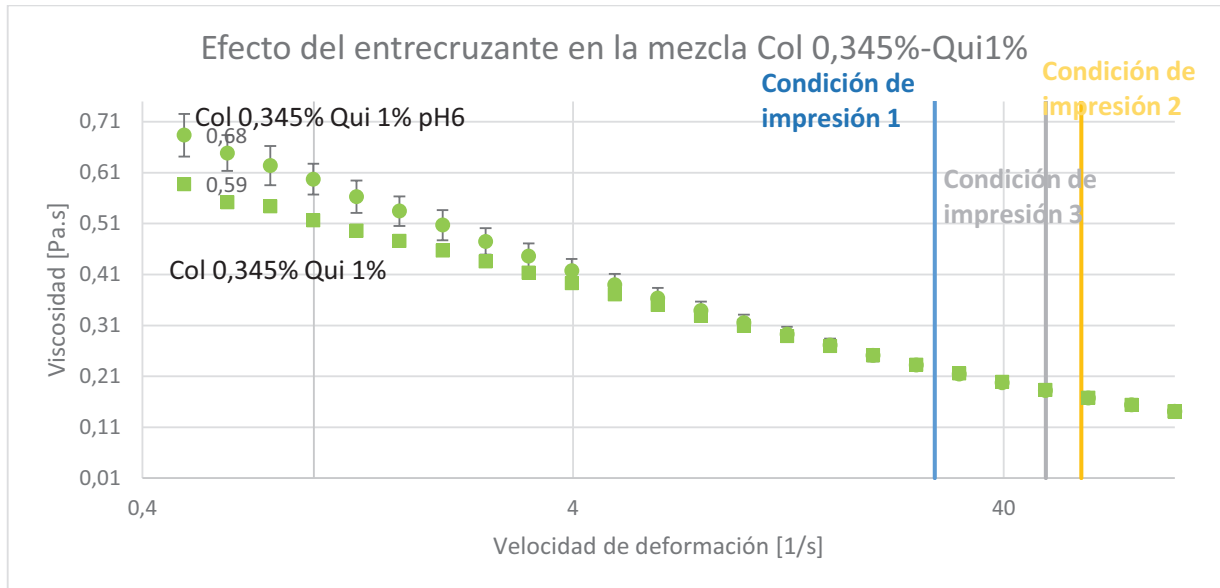


Figura 3. 8: Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para la mezcla 0,34% de colágeno y 1% de quitosano en comparación con la misma tinta parcialmente entrecruzada a pH=6,00 y con sus dos componentes por separado.

Tal como puede observarse en el gráfico de la figura 3.8, el incremento en viscosidad que produce el incremento de pH fue leve; para bajas velocidades de deformación (entre 0,5 y 5 1/s) la diferencia de viscosidad aparente alcanzó hasta un 15% aproximadamente; sin embargo, para las velocidades de deformación impuestas por el proceso de extrusión en la boquilla de la bioimpresora, no se evidenció diferencia de viscosidad entre ambos preparados, el pre-entrecruzado y el gel a pH original de 4,50.

### 3.3.5.2 Mezcla Col 0,36% - Qui 1%

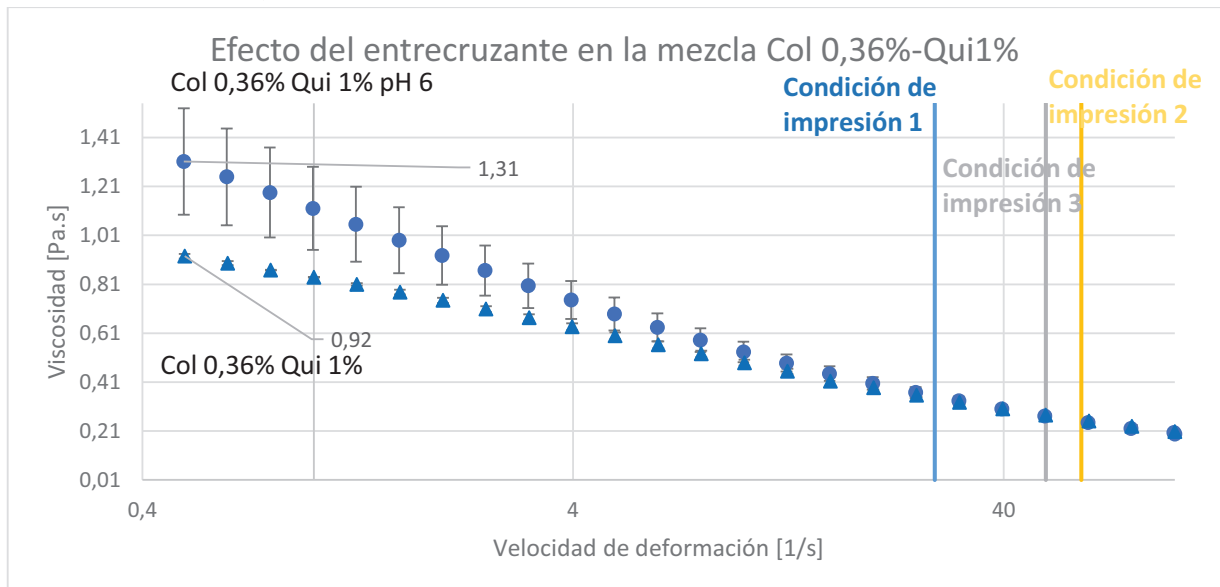


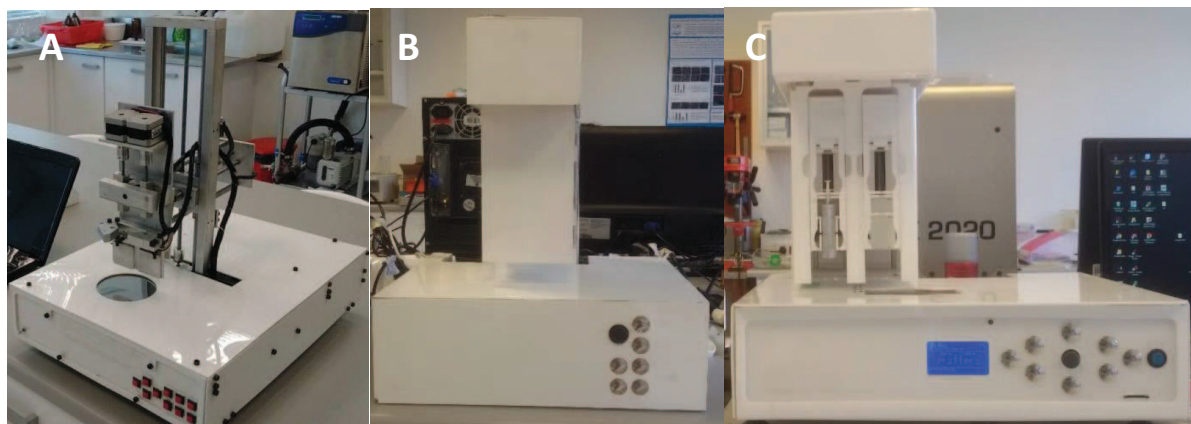
Figura 3. 9: Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para la mezcla 0,36% de colágeno y 1% de quitosano en comparación con la misma tinta parcialmente entrecruzada a pH 6,00 y con sus dos componentes por separado.

En esta mezcla también se observa un cambio de la viscosidad con la tinta parcialmente entrecruzada, llegando a un 30% de aumento aproximadamente para bajas velocidades de deformación, sin embargo, a partir de una velocidad de deformación de 25 1/s las curvas de viscosidad de ambas tintas empieza a superponerse (gráfico de la figura 3.9), por tanto, no habría diferencia en el proceso de extrusión en la boquilla de la bioimpresora.

A partir de los resultados reológicos presentados en las figuras 3.8 y 3.9, se evidencia un proceso de entrecruzamiento parcial de las mezclas poliméricas, que muy probablemente se deba a la interacción entre las cadenas de quitosano, debido a que no llega a neutralidad ni se incuba a 37°C, condición para gelar el colágeno. Este resultado nos indicó que la suba de pH a 6 no afectaría el proceso de extrusión; aun así, como se mostrará en la sección 3.7.2, la integridad estructural de los sustratos impresos no fue exitosa.

### 3.4 Análisis de la bioimpresora

Para la evaluación del desempeño de las tintas utilizadas en este trabajo, se estuvo trabajando con un prototipo inicial de la primera bioimpresora fabricada íntegramente en Argentina. A lo largo del trabajo se fueron incorporando mejoras, llevando a un segundo prototipo en el año 2017, que es el que mayormente se usó e los resultados aquí presentados. Finalmente, se obtuvo un tercer prototipo mejorado en 2018. En la figura 3.10 pueden observarse los tres modelos, producto de la realimentación entre la empresa y el laboratorio durante el trabajo realizado.



**Figura 3. 10: Evolución en el diseño de la bio-impresora 3D marca Life-Si en orden ascendente de la A a la C.**

Debido al permanente uso que se le daba en laboratorio con las tintas, en la interacción constante con su desarrollador, se pudieron establecer requisitos y características fundamentales a incluirse en el diseño, para lograr un proceso eficiente y con capacidad de producir un resultado óptimo y repetible.

A continuación, y como corolario del trabajo con los prototipos mencionados, se presenta en la tabla 3.2, las prestaciones que se consideraron necesarias para una bioimpresoras 3D a usar en un laboratorio de desarrollo de tintas.

Tabla 3.2: Sugerencias de modificaciones que contribuyen al desempeño de una impresora de geles para el uso en un laboratorio de desarrollo de biomateriales.

<b>Software</b>	
Posición de inicio de impresión	Incluir una posición cero, para poder referenciar puntos en el espacio de impresión
Rutina antes de comenzar la impresión	Incluir rutina que permita rellenar el espacio de aire que puede haber quedado en la aguja, antes de comenzar la impresión. Podría ser un patrón externo, alejado del área de impresión.
Botón de pausa	Incluir un botón que permita poner pausa a la impresión y poder reanudarla en el punto donde se pausó
Impresión de varias capas alternando materiales	Incluir rutina que permita imprimir N capas de material A y M capas de material B a ordenar por el usuario.
Geometrías varias	Incluir posibilidad de imprimir distintas geometrías combinadas de distintas maneras entre ambos materiales.
<b>Sistema de extrusión</b>	
Espacio para colocar las jeringas	Deben estar estandarizadas para no incurrir en compras en vano, de jeringas que no sirven.
Soporte de ambas jeringas	Debe estar alineado en y y z, además debe ser estable. Por otro lado, la distancia entre las boquillas (en x) debe ser constante a lo largo de toda la impresión.
Sistema de expulsión de material	Podría permitir el movimiento del émbolo de la jeringa en ambas direcciones mediante la implementación de abrazaderas.
Boquillas	Deben tener largo estandarizado.
<b>Soporte</b>	
Base	La región que soporta la placa de Petri debe tener el mismo nivel que el resto de la cama. Diseño que permita colocar la placa de Petri o el portaobjetos, evitando que el mismo rote o se deslice, por ejemplo, mediante abrazaderas.
Referencia de movimiento	Incluir en el plano de impresión y en el eje vertical alguna referencia que permita estimar la altura de cada capa y la magnitud de los movimientos realizados.

### Estructura

<b>Transmisión de movimiento de los ejes</b>	Incluir un sistema robusto para mejorar la precisión en los sucesivos pasos.
<b>Acople del motor al tornillo sin fin (en los ejes donde se emplee esta técnica)</b>	Cuando se afloja, gira en falso y por tanto no sea repetible cada experimento
<b>Material de la estructura</b>	Con el objetivo de disminuir la vibración y el ruido de la impresora en el movimiento, se puede incluir materiales que absorban la energía, como ser goma o silicona
<b>Estructura de los cassettes porta jeringas</b>	Debe poseer una única altura, sin irregularidades, donde sobresalga la aguja.

Todas las observaciones de la Tabla 3. 2 tuvieron como objetivo no sólo agilizar los procesos de impresión del sustrato, sino que dichos experimentos sean repetibles, estableciendo referencias en el hardware que permitan controlar la fidelidad de reproducción del diseño digital versus modelo impreso.

### 3.5 Imprimibilidad (Printability=Pr)

Se analizaron los valores de fidelidad de impresión de distintas tintas<sup>1</sup> en relación con la viscosidad aparente, presentadas en la sección precedente *Caracterización reológica*, asociada a cada condición de impresión. Como se introdujo en *Caudal y análisis de inyectabilidad*, cada condición de impresión está asociada a una velocidad de deformación dada. Para todos los casos, se analizaron al menos 8 mediciones de área, definida por el modelo elegido para la impresión 3D.

Para la toma de imágenes de las mallas a instantes de ser impresas, se probaron distintas condiciones en búsqueda de un mejor contraste. Se probó con la inclusión de colorante azul de Nilo 3% en las tintas colágeno:quitosano en un 1%v/v, sin embargo, no se apreciaron mejoras significativas en la obtención de las fotos. Por lo tanto, como involucra un aditivo externo se decidió proceder a la prueba de imprimibilidad empleando las tintas sin agregados, tal como se observa en la figura 3.11.

La figura 3.11 exhibe la forma del impreso para cada configuración de impresión. En la parte A, se observa que la condición 1 presenta buena geometría debido a la velocidad de eyección lenta de una pequeña cantidad de material. En la condición 2 (figura B), se observa el efecto del desborde debido a la que la cantidad de material era excesiva. Por último, en la figura C, se observa lo obtenido bajo la condición 3 de impresión: debido a la baja cantidad de material se obtuvo un filamento fino, y debido a la rapidez una ligera ondulación y a la vez mayor área en el trazo. A partir de estas observaciones se pudo establecer que, para una tinta dada, la capacidad de impresión puede optimizarse estableciendo desde el software de la impresora: velocidad, cantidad de material en cada eyección, distancia entre gotas consecutivas, principalmente.

---

<sup>1</sup> Se efectuó una selección de tintas que representaran el rango de concentraciones de polímeros.



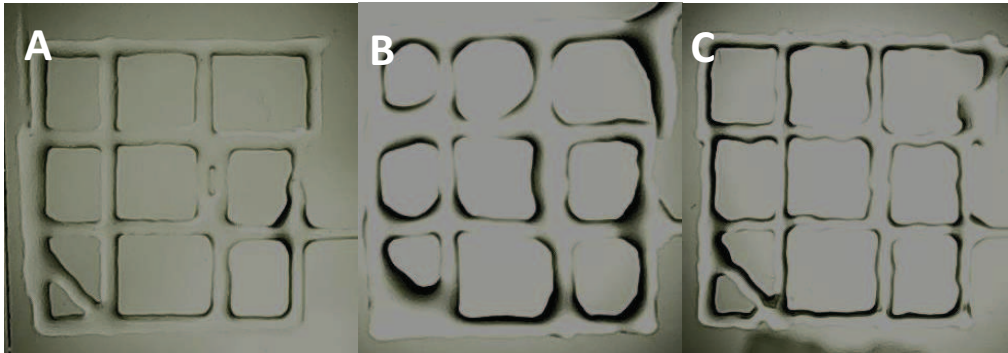


Figura 3. 11: Se observa un ejemplo de impresión de la tinta 0.36% colágeno y 1% de quitosano para cada una de las condiciones de impresión, A. Condición 1, B. Condición 2, C. Condición 3.

La figura 3.11 exhibe la forma del impreso para cada configuración de impresión. En la parte A, se observa que la condición 1 presenta buena geometría debido a la velocidad de eyección lenta de una pequeña cantidad de material. En la condición 2 (figura B), se observa el efecto del desborde debido a la que la cantidad de material era excesiva. Por último, en la figura C, se observa lo obtenido bajo la condición 3 de impresión: debido a la baja cantidad de material se obtuvo un filamento fino, y debido a la rapidez una ligera ondulación y a la vez mayor área en el trazo. A partir de estas observaciones se pudo establecer que, para una tinta dada, la capacidad de impresión puede optimizarse estableciendo desde el software de la impresora: velocidad, cantidad de material en cada eyección, distancia entre gotas consecutivas, principalmente.

A partir del análisis de las imágenes de las grillas y, utilizando las ecuaciones 3 y 4 de la sección 2.6, se obtuvo el valor numérico  $P_r$  según área y según morfología. En la figura 3.12 se muestran los valores calculados según el área donde se establece la “dilatación” o el “flujo” del material una vez depositado en forma de matriz. Se observan tres puntos para cada tinta (marcados como C1, C2 y C3) donde, para un dado color, el punto de menor viscosidad, corresponde a la condición de impresión 2, que como se vio en el gráfico de la figura 3.2 es aquella donde la tinta sufre mayor velocidad de deformación. Esta condición para la mayoría de las tintas es la que da un valor de  $P_r$  más bajo.

En la figura 3.13 se observa el valor de capacidad de impresión según la morfología, donde se relaciona el perímetro del cuadrado de cada grilla con su área según la ecuación 12. De acuerdo a esa relación, los valores de  $P_r$  más cercanos a 1, implican una geometría más conservadoramente cuadrada; en ellas, el perímetro es relativamente más alto que en geometrías redondeadas, con un perímetro menor en relación con su área.

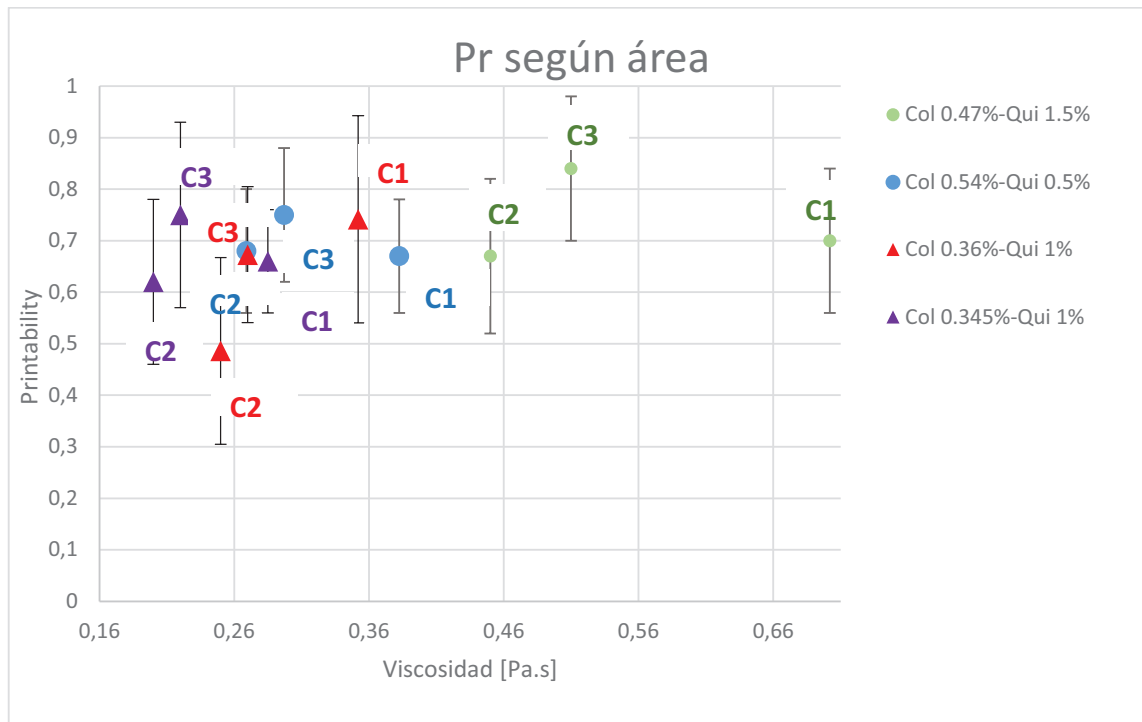


Figura 3. 12: Valor de capacidad de impresión (Pr) según área en función de la viscosidad aparente -dada por cada una de las tres condiciones de impresión- para tintas con distintos valores de viscosidad. En mismo color para cada tinta evaluada.

Se puede observar que los valores obtenidos de capacidad de impresión son regulares a lo largo de todas las tintas, mostrándose una ligera tendencia en detrimento de C2. Cabe recordar que tanto C1 como C3 imponen a la impresión la misma cantidad de material aun cuando sus caudales y viscosidades son diferentes. Si bien el desvío estándar es considerable, los valores bajos de Pr en C2 fueron coherentes con lo observado a simple vista. Entonces, en las condiciones del equipo utilizado, una menor cantidad de material conlleva a una disminución del volumen eyectado, que implica menor grosor del filamento depositado y por ende una mayor Pr.

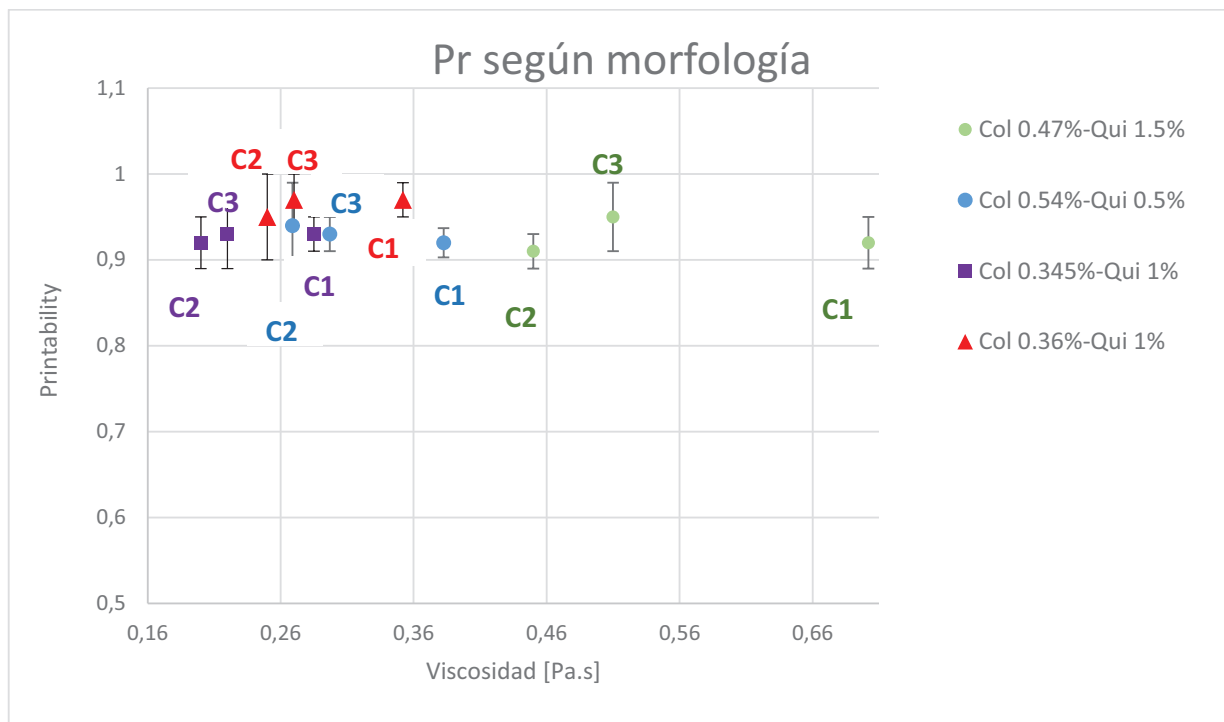


Figura 3. 13: Valor de capacidad de impresión (Pr) según la morfología de los cuadraditos de las mallas en función de la viscosidad aparente -(dada por cada una de las tres condiciones de impresión - para tintas con distintos valores de viscosidad. En mismo color para cada tinta evaluada.

En el gráfico 3.13, se observa que los valores alcanzados son más cercanos a 1, indicando que las geometrías son mayormente cuadradas, resultando fieles al diseño original.

Por otro lado, la condición de impresión 2, es la que mayor velocidad de deformación implica (ver gráfico en 3.4). Por ende, conlleva el menor valor de viscosidad en todos los casos, dado el comportamiento de adelgazamiento que presentan las tintas; en esta condición, en la mayoría de los casos, tiende a presentar valores más bajos de Pr.

Como corolario de este análisis, se aprecia que la ventana de viscosidad en la que se trabaja, de 0,16 a 0,66 Pa.s, corresponde a lo que en la literatura se denomina precursores de hidrogel de baja viscosidad [13]. Para lograr la extrusión de este tipo de materiales, las tensiones no necesitan superar valores que podrían llegar a dañar células que se introdujeran en la jeringa extrusora [14], dado que cómo valor medio de tensión aplicado en la jeringa fue de 25 Pa.

### 3.6 Otras características reológicas del precursor de hidrogel.

Además de lo analizado en cuanto a los valores de viscosidad aparente, el análisis reológico oscilatorio permite inferir la predominancia del comportamiento viscoso ante el elástico, observar la región de linealidad viscoelástica y establecer el comportamiento del gel como sistema o como redes entrecruzadas según el comportamiento de las curvas en el barrido de frecuencia, entre otros aspectos, y tal como se mencionó en la Introducción. Se muestran, a continuación, los resultados derivados de los barridos de frecuencia y amplitud de deformación, en ensayos oscilatorios, para muestras Col0,36%-Qui1%.

La caracterización de esta tinta fue motivada porque su concentración polimérica se encontraba en los rangos de concentración encontrados en bibliografía [15],[16],[17]. Además de que presentó valores de  $Pr_{area} > 0,6$  y  $Pr_{morfología} > 0,95$ , lo cual indica capacidad de ser impresa de manera aceptable.

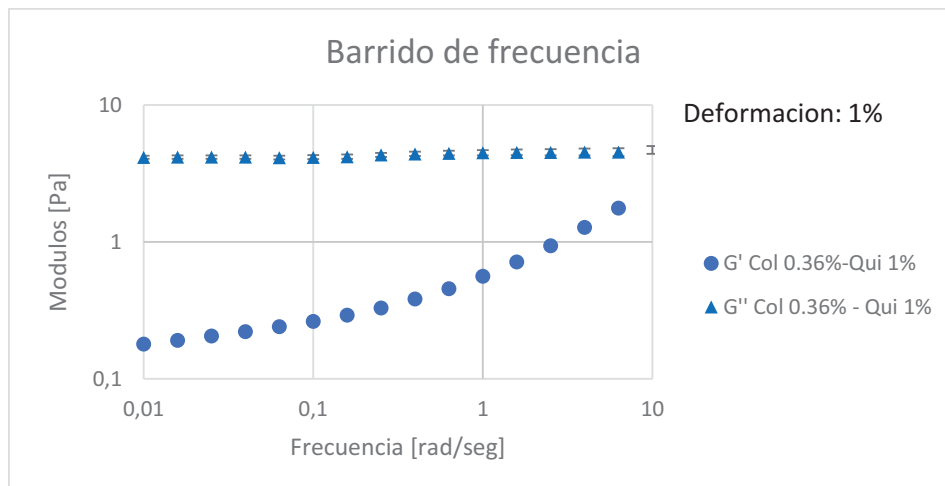


Figura 3. 14: Módulo elástico ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en función de la frecuencia para un ensayo oscilatorio

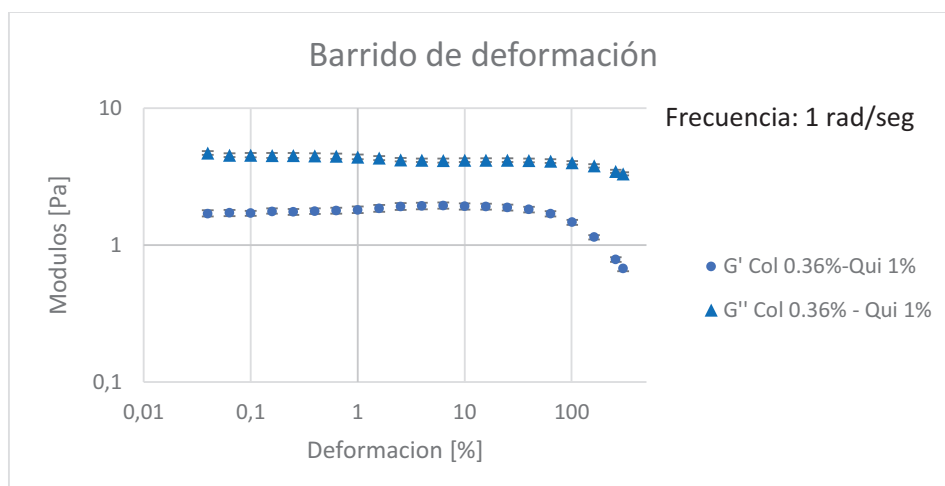


Figura 3. 15: Módulo elástico ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en función de la velocidad de deformación para un ensayo oscilatorio

Se observan en las figuras 3.14 y 15 los resultados de un barrido de frecuencia y uno de deformación, respectivamente, para la mezcla colágeno 0,36% y quitosano 1% ensayada a temperatura ambiente. En ambos barridos, se puede contemplar la predominancia del comportamiento líquido sobre el comportamiento sólido que presentan los precursores de hidrogel pensados para el proceso de impresión. Además, en el barrido de deformación, también se puede observar el rango lineal viscoelástico para las bajas frecuencias del mismo precursor de hidrogel, inferible de la curva de datos de  $G'$ , de la figura 3.15.

Además, en el barrido de frecuencia, al no haber cruce entre las curvas  $G'$  y  $G''$ , nos confirma que la solución no gelifica a temperatura ambiente. Dicha afirmación podía predecirse observando los resultados de los ensayos para los precursores de hidrogel por separado, sin embargo, consideramos

pertinente evaluarlo ya que no encontramos resultados de este tipo para mezclas colágeno-quitosano en la bibliografía analizada, donde se presentan exclusivamente ensayos de fluencia.

### 3.7 Generación de sustratos

Con el objetivo de lograr llegar al estado de hidrogel deseado para generar el sustrato, se comenzó por la neutralización del pH ácido de las tintas, con una posterior incubación a 37°C, particularmente para el colágeno. La metodología ya había sido empleada, tanto para el colágeno [7], como para la mezcla colágeno-quitosano [8][9], con el objetivo de analizar el crecimiento, diferenciación celular y angiogénesis, entre otros.

En un primer estadio, se buscó replicar la receta del protocolo desarrollado por Jean y sus colaboradores en un trabajo del 2013 [7], trabajando sólo con colágeno (véase Anexo I) para evaluar cualitativamente su apariencia final llevado a pH neutro, lo cual dio los resultados de gelación esperados.

#### 3.7.1 Gelación simultánea de colágeno y quitosano.

Para evaluar la compatibilidad de la mezcla de colágeno y quitosano, se incorporó una cantidad de quitosano tal que su concentración final en la solución mezcla fuera de un 1%. Se siguió la receta presentada en el anexo, utilizando 600  $\mu\text{L}$  de tinta, 80  $\mu\text{L}$  de PBS 10X, 110  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. Se produjo el resultado observado en el recipiente a la izquierda en la figura 3.17.

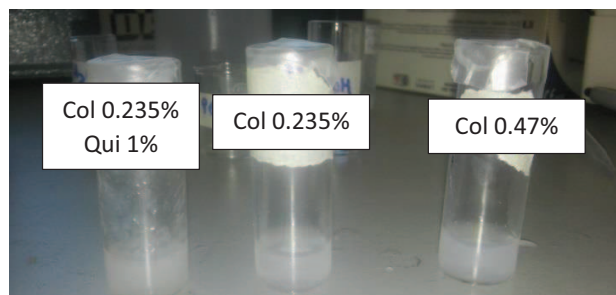
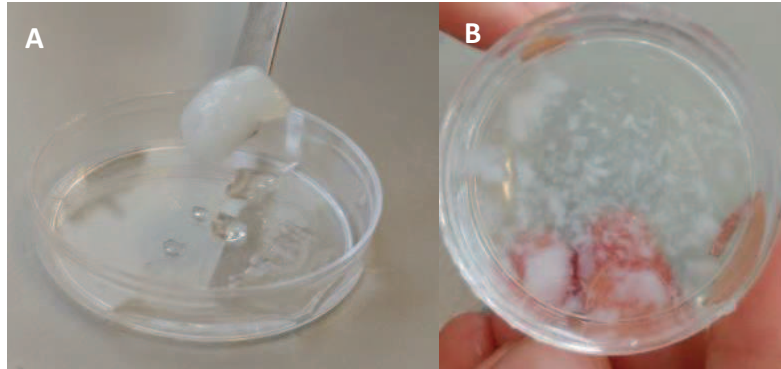


Figura 3. 16: Comparación del aspecto del colágeno gelado con la mezcla que contiene además quitosano.

El gel de colágeno + quitosano poseía buenas propiedades para ser manipulable, como también puede observarse en la figura 3.18.A. Se repitió el protocolo para distintas mezclas, por ejemplo, para la de colágeno 0,49% y quitosano 1,5%, obteniendo resultados similares, tal como se observa en fig. 3.17. Sin embargo, su pH final resultó de entre 8,5 y 10, más elevado que lo requerido para el crecimiento celular. Se procedió entonces a lavados en PBS 1X, pero al cabo de dos lavados de cinco minutos, todos los casos analizados sufrieron desintegración de su estructura, tal como puede observarse en la figura 3.18.B.



**Figura 3. 17:** A. Gelación de la tinta colágeno 0,49%, quitosano 1,5% mediante el agregado de NaOH 1M con vortexeado, B. Misma mezcla posterior a un lavado de 5 minutos en PBS1X y agitación

Estos resultados hicieron suponer una gelación inhomogénea de la mezcla, dando lugar a una estructura heterogénea. En observaciones en el laboratorio se había registrado que la velocidad de gelación de quitosano por neutralización del pH es mayor que la de colágeno, además de que no requiere llegar a 37°C para lograrlo. En otras palabras, el agregado por pipeta de la base que provoca la neutralización generaba heterogeneidades en la estructura, observables cuando se somete la mezcla a esfuerzos o en solución como se ve en la figura 3.18.B.

### 3.7.2 Gelación por nebulización de NaHCO<sub>3</sub>

Para superar las limitaciones presentes en el método expuesto en la sección anterior, se buscó neutralizar por nebulizado de una base débil como bicarbonato de sodio 0,8M, empleado previamente por Lee y colaboradores, para una muestra bioimpresa de colágeno 0,2% alternado con capas de fibroblastos y queratinocitos [10]. Esta nebulización de base débil fue propuesta como estrategia de incorporación más suave de la base y evitar gelaciones localizadas.

En la figura 3.19 se muestra el sustrato logrado para una mezcla colágeno 0,34% y quitosano 1%. Cualitativamente, se observa que la impresión no posee suficiente integridad estructural para ser manipulada. Además, las figuras 3.19 a 3.21 muestran una significativa pérdida de masa y reducción del volumen de los sustratos, derivada de los lavados empleados para llegar a un pH de 7,4.

Con el tratamiento por nebulización de esta base débil, se lograron sustratos manipulables que llegaron a tener un pH de alrededor de 8,5 y la posibilidad de equilibrar el pH mediante lavados sucesivos. Contrariamente al resultado presentado en la sección anterior, se observó que la estructura no se desintegraba, pero que, sin embargo, presentaba una significativa pérdida de masa entre lavado y lavado de 8 minutos de duración bajo la acción de agitación.

También se probó el efecto de acortar el proceso de nebulizado partiendo de una mezcla a pH 6. Sin embargo, mostraron aun mayor debilidad estructural, lo que se interpretó como una inhomogeneidad en la tinta producto de la gelación no simultánea entre el colágeno y el quitosano.

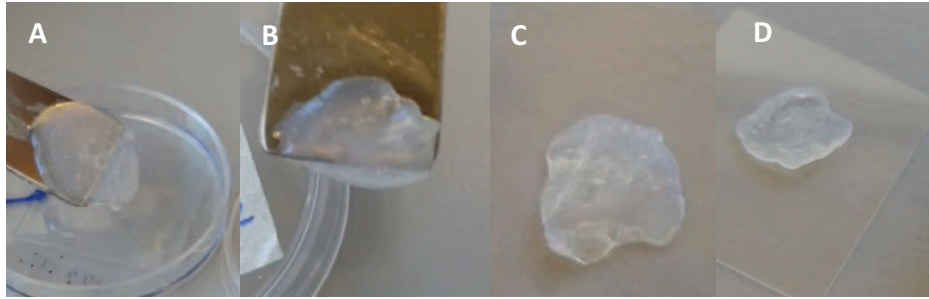


Figura 3. 18: A. Colágeno 0,34%, Quitosano 1% neutralizado por nebulización; B, C, D. después del primer, segundo y tercer lavado.

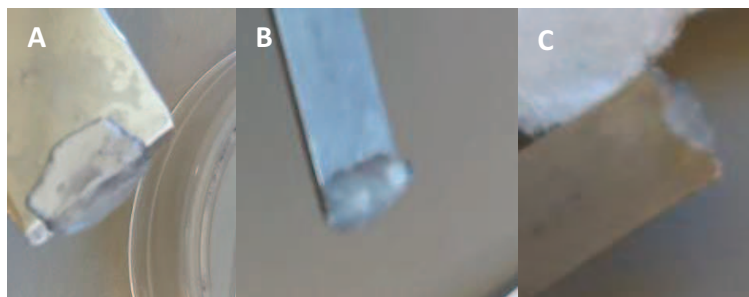


Figura 3. 19: Colágeno 0,36%, Quitosano 1% pH 6 y neutralizado por nebulización; ; B, C, D. después del primer, segundo y tercer lavado.;

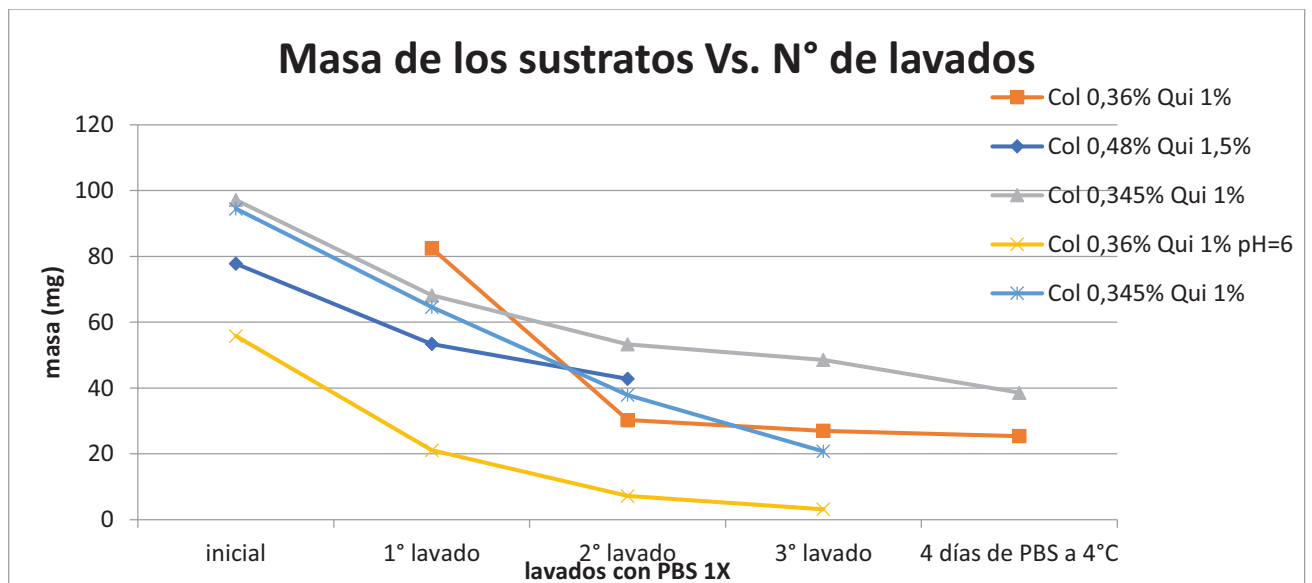


Figura 3. 20: Evolución de la masa del sustrato en función de la cantidad de lavados, para las distintas tintas. A partir del tercer lavado se dejó sumergido en PBS 1X en heladera por 96hs (4 días).

Como se mencionó anteriormente la pérdida de masa mostrada en la figura 3.21 iba acompañada en todos los casos de una debilidad estructural de manera más pronunciada en la tinta pre-gelada, a pH=6



con lo cual se descartó esta posibilidad para el resto del trabajo experimental. Por otra parte, la pérdida de masa por incubación en PBS se observó también en geles más rígidos como se verá en la sección 3.9.

### 3.7.3 Incorporación de los agentes entrecruzantes NHS y EDC

Dado lo obtenido en sección anterior, se decidió seguir trabajando con nebulización con bicarbonato, y agregar NHS y EDC, dos agentes entrecruzantes empleados para unir covalentemente grupos carboxilo o fosfato a aminas primarias [11], [9],[4], dando uniones amida. Ambos presentaron buena solubilidad en la mezcla ácida de colágeno y quitosano.

Empleando el mismo protocolo con bicarbonato que en la sección anterior, se agregó al inicio a la solución cantidades de NHS y EDC de manera que quedaran 6mM y 15mM de concentración final, respectivamente [11]. La incorporación de estos dos activadores aumentó la viscosidad aparente de la tinta, evidenciando una reacción aun a pH ácido y previo a la gelación por pH y temperatura. El estudio reológico dio como resultado valores de viscosidad asociados a la velocidad de deformación de cada una de las condiciones de impresión de 0,52 Pa.s, 0,34 Pa.s y 0,37 Pa.s, respectivamente versus 0,35 Pa.s, 0,25 Pa.s, 0,27 Pa.s para la tinta sin los activadores NHS y EDC.

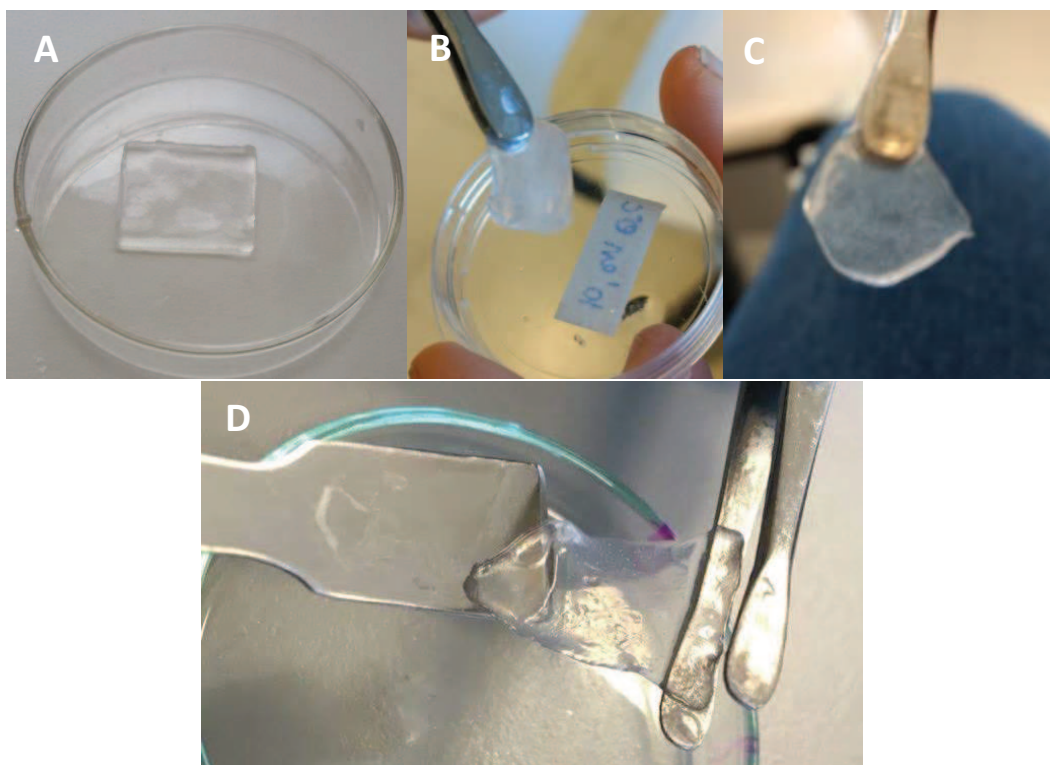


Figura 3. 21: A; Aspecto del sustrato impreso con la tinta colágeno 0,36% y quitosano 1%, 6mM de NHS y 15mM de EDC sin entrecruzar. B,C,D: entrecruzados por nebulización de  $\text{NaHCO}_3$  y posteriormente incubadas a 37°C.

La condición 2 de impresión fue la óptima para imprimir los sustratos; en este caso de 2x2cm (ver figura 3.22.A). Después del entrecruzamiento y la gelación por pH y temperatura, quedaron sustratos con el aspecto de las fotos de las figuras 3.22 B, C y D. A simple vista, y tal como se observa en dichas figuras, se visualizó una mejora en la integridad estructural evidencia de un entrecruzamiento más fuerte, y con la



posibilidad de llegar a pH neutro con un solo lavado, sin pérdida significativa de masa. En este caso un solo lavado fue suficiente y no hubo necesidad de hacer un control de masa. Llegando a un pH final entre 7,5 y 8.

### 3.8 Rigidez del sustrato

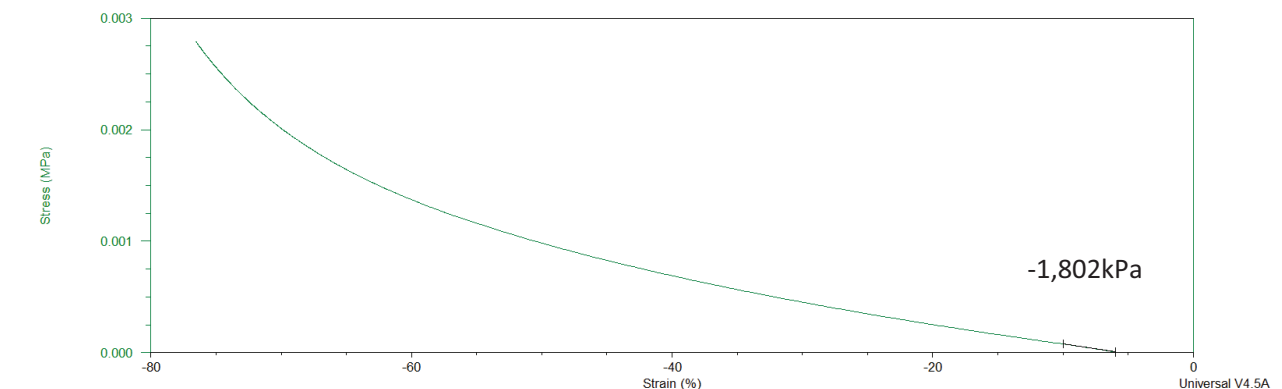
Para cuantificar la capacidad de manipular los sustratos obtenidos con el método mencionado en la sección 3.7.3 se sometieron 3 réplicas a ensayos de compresión (especificados en la sección 2.8), el sustrato fue realizado con:

- Mezcla de colágeno 0,36% y quitosano 1% entrecruzado con NHS y EDC + nebulización de  $\text{NaHCO}_3$  0,8M.

El valor E especificado en la Tabla 3.2, tomados del valor de la pendiente de la primera región lineal de la curva, fueron extraídos de gráficos análogos al gráfico arrojado por el software TA asociado al DMA mostrado en la figura 3.23.

**Tabla 3. 1: Resultados de módulo de compresión de dos sustratos de dos composiciones diferentes.**

Sustrato	E [kPa]
Técnica 3.7.3	1,95±0,14



**Figura 3. 22: Curva de compresión para uno de los sustratos de colágeno 0,36% y quitosano 1% con inclusión de NHS y EDC entrecruzado por nebulización de  $\text{NaHCO}_3$  0,8M).**

Según se observa en el valor de módulo de compresión presente en la tabla 3.2, se obtuvo un valor comparable con el valor informado por McBane y sus colaboradores, donde para un sustrato con colágeno 0,5% y quitosano 0,75% llegaron a un E de compresión de 0,7kPa [16]. Este resultado constata la observación cualitativa donde se experimentó mayor capacidad de manipulación con respecto a otras formas de producir los sustratos. En efecto, estos activadores del entrecruzamiento provocan la interacción por uniones covalentes entre cadenas, formando geles más rígidos.

### 3.9 Estabilidad en PBS

El ensayo mediante el cual se sumergieron 3 sustratos diferentes de la misma composición de tinta en PBS1X a 37°C arrojó una evolución de la masa según se muestra en la figura 3.24.

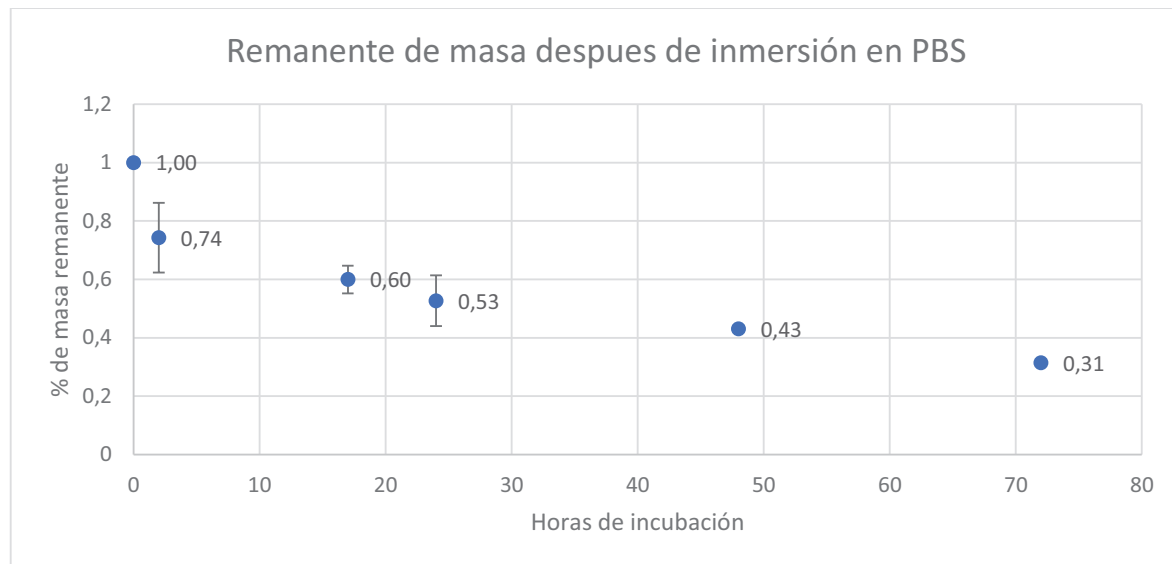


Figura 3. 23: Evolución de la masa (representado por M.R) de 3 sustratos de la misma composición sumergidos en PBS.

Se observa una pérdida de masa de casi el 70% transcurridos tres días de incubación, lo cual podría indicar que se está perdiendo una cantidad significativa de agua del sustrato. Esta tendencia “contractiva” del hidrogel ya había sido notada por Murphy y sus colaboradores para hidrogeles de colágeno y de fibrina con colágeno. Esta tendencia, sin embargo, no está reportada para el quitosano, y deberá revertirse a futuro para nuestra aplicación dado que podría dar lugar a malas cicatrizaciones [12].

Para verificar si se estaba perdiendo masa polimérica en la inmersión del sustrato en PBS 1X, se comparó la masa del polímero de un sustrato liofilizado después de haber sido lavado 3 veces en procesos de 8 minutos cada uno, donde se había perdido un 42% de la masa húmeda del sustrato contra un sustrato liofilizado pero que no había sido lavado. Se corroboró que la masa liofilizada de ambos sustratos era igual. Por tanto, se pudo concluir que en la inmersión de los sustratos en PBS 1X no implican una pérdida de masa polimérica, sino evidentemente de agua.

### 3.10 Comportamiento en un entorno de biodegradación in vitro

La figura 3.25 muestra tres series de datos, la primera corresponde a la masa de los sustratos (generados según sección 3.7.3) inmersos en PBS; la segunda (degradación) representa la masa de los sustratos que fueron sometidos a un medio igual, pero con colagenasa que simuló el medio extracelular con la presencia de esta enzima; por último, como control positivo, se presenta la evolución de la masa de un sustrato hecho puramente de colágeno.

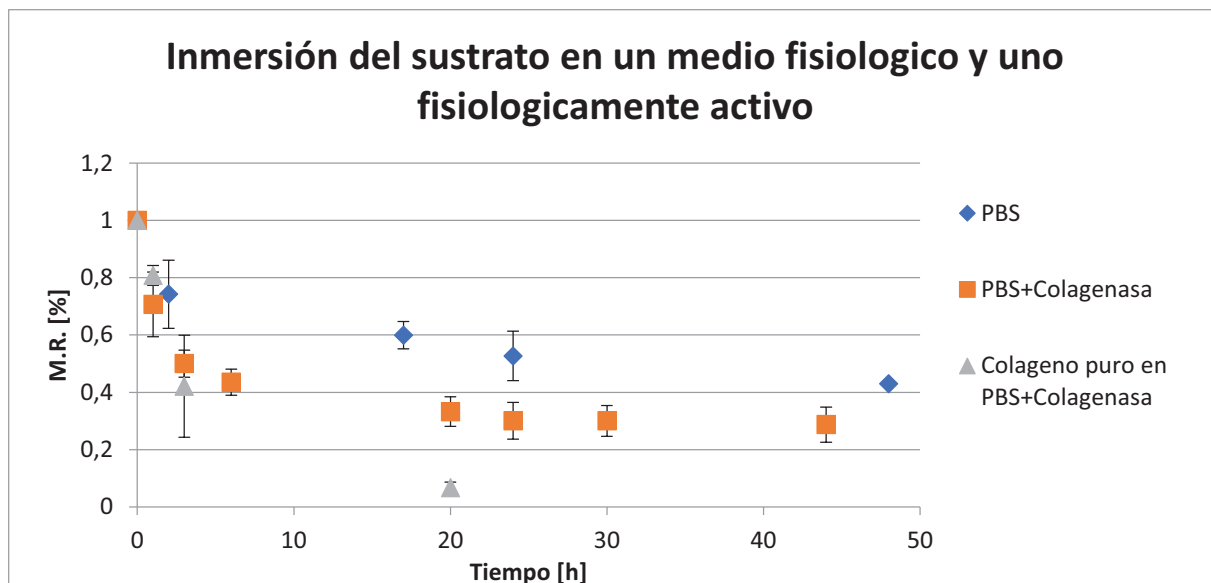


Figura 3. 24: Gráfico que representa la evolución de la masa (representado por M.R) de los distintos sustratos de la misma composición de tinta (colágeno 0,36% y quitosano 1%) en dos entornos diferentes versus el control de colágeno sumergido en la solución de colagenasa.

Cabe destacar la curva gris del gráfico de la figura 3.25 que indica el control del medio enzimático de degradación, donde se observa que a las 20 hs el sustrato de colágeno puro se había degradado completamente. En la serie de datos titulados “PBS+Colagenasa” se observa que existe una masa remanente del sustrato capaz de ser manipulado y pesable después de las 44 hs. Este fenómeno se debe a la incorporación de quitosano a la mezcla con la que se generaron los sustratos impresos.

### 3.11 Microestructura

Se observaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) cortes de distintos sustratos generados liofilizados. Como se observa en la figura 3.26, la estructura microscópica de los sustratos entrecruzados por inclusión de NaOH 1M y vortexeado de la mezcla colágeno 0,36%, quitosano 1% exhibe una porosidad de entre 90 y 180  $\mu\text{m}$  de diámetro máximo.

A continuación, a partir de la figura 3.27 se observa la forma de la microestructura interna y la superficie externa de las membranas producidas con Col:Qui 0,36:1 a partir de la impresión 3D de dicho precursor y con una posterior nebulización de  $\text{NaHCO}_3$  e incubación a 37°C. Se observa que las superficies no son lisas, poseen irregularidades que favorecerá la adherencia de las células de la piel.

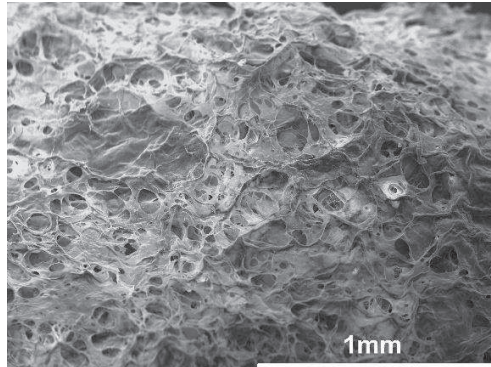


Figura 3. 25: Microestructura de los poros del sustrato colágeno 0,36%, quitosano 1% entrecruzados por inclusión de NaOH 1M, liofilizados y crio-cortados con un bisturí. Donde los poros tienen un diámetro medio de 150 $\mu$ m.

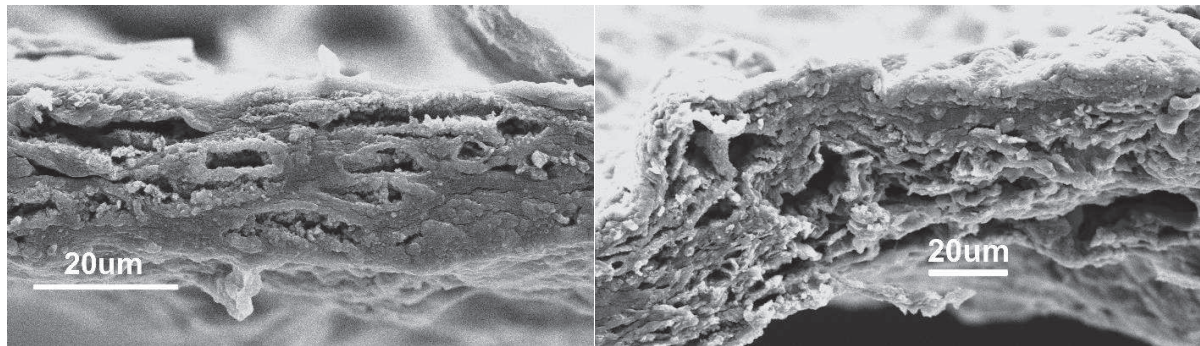


Figura 3. 27: Microestructura interna del sustrato colágeno 0,36%, quitosano 1% entrecruzados por técnica de nebulización de NaCOH<sub>3</sub> 0,8M, liofilizados y crio-cortados con un bisturí.

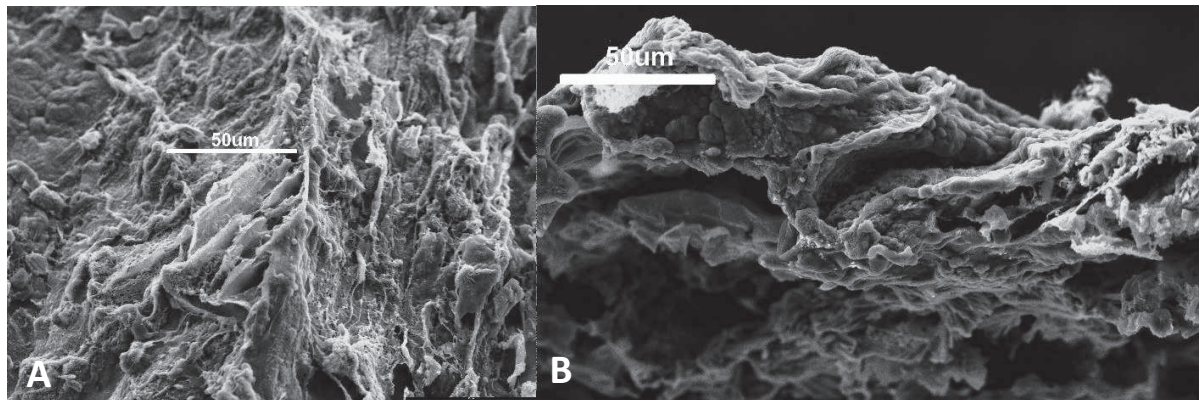


Figura 3. 28: A. Microestructura de la superficie del sustrato colágeno 0,36%, quitosano 1% con la inclusión de NHS y EDC entrecruzados por técnica de nebulización de NaCOH<sub>3</sub> 0,8M, liofilizados y crio-cortados con un bisturí. B. Ídem A pero la microestructura interna

Como se desprende de las figuras mostradas arriba, las estructuras generadas por impresión 3D con el método presentado en la sección 3.6.3 con la tinta seleccionada son altamente rugosas, apreciándose también la presencia de poros irregulares (figuras 3.27 y 3.28). Se espera que esta porosidad y rugosidad presentada en la estructura de los polímeros secos sea favorable para crecimiento de células y generación de tejido.



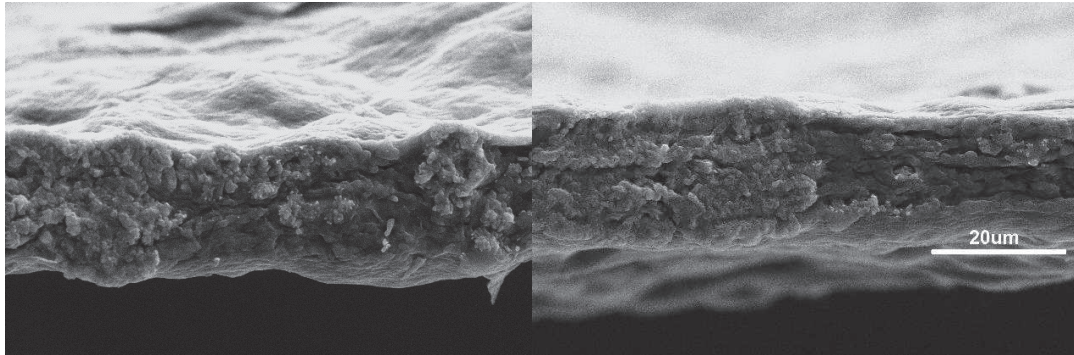


Figura 3. 29: Microestructura interna y de superficie del sustrato colágeno 0,36%, quitosano 1% con la inclusión de NHS y EDC entrecruzados por técnica de nebulización de  $\text{NaCOH}_3$  0,8M, habiendo sido sumergido por 5 horas en PBS1X (ensayo tipo swelling) liofilizados y crio-cortados con un bisturí. Donde los poros marcados tienen un diámetro promedio entre 3-4um.

En el caso de la estructura de los sustratos luego de las 5 horas de incubación en PBS (figura 3.29) debido a la pérdida de agua mostraron una reducción del tamaño de los poros internos.

Por último, en las figuras 3.30 A y B se observan las superficies de los sustratos que fueron afectados por la colagenasa. Se corrobora mediante la observación de la topografía el fenómeno observado en el gráfico de la figura 3.25 de pérdida de masa por degradación del colágeno.

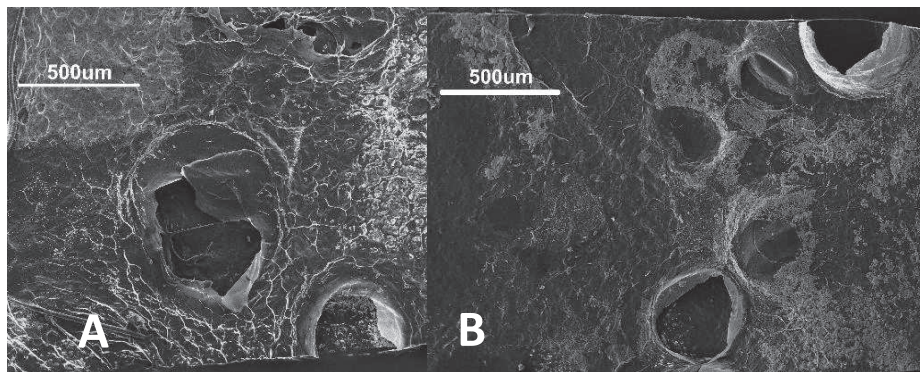


Figura 3. 30: Microestructura de la superficie del sustrato colágeno 0,36%, quitosano 1% con la inclusión de NHS y EDC entrecruzados por técnica de nebulización de  $\text{NaCOH}_3$  0,8M, A. Luego de 5 horas en colagenasa, liofilizados y crio-cortados con un bisturí. B. Luego de 14 horas en colagenasa, liofilizados y crio-cortados con un bisturí.

### 3.12 Citotoxicidad

De acuerdo a las propiedades mecánicas analizadas, su disponibilidad, su buen desempeño en el proceso de bioimpresión, y su estabilidad en las mediciones, se decidió en esta instancia del trabajo y como candidato a avanzar con la biotinta, analizar la citotoxicidad al sustrato realizado por bioimpresión con colágeno 0,36% y quitosano 1% con NHS y EDC, entrecruzado por nebulización de  $\text{NaHCO}_3$ .

A partir la norma ISO 10993-5, se evaluó en primera instancia la citotoxicidad directa<sup>2</sup>. Los resultados mostraron que el material formulado presentó efecto citotóxico nulo; es decir, no hubo alteraciones en la morfología, tampoco muerte celular ni levantamiento de la monocapa de fibroblastos. Se muestran en la Figura 3.31 las monocapas luego de 24 horas de incubación con el sustrato.

Además, se realizó el ensayo de citotoxicidad indirecta, dando la misma un resultado negativo, es decir, el exudado de la inmersión del sustrato generado con la composición colágeno 0,36% quitosano 1% no liberó sustancias tóxicas para la célula.

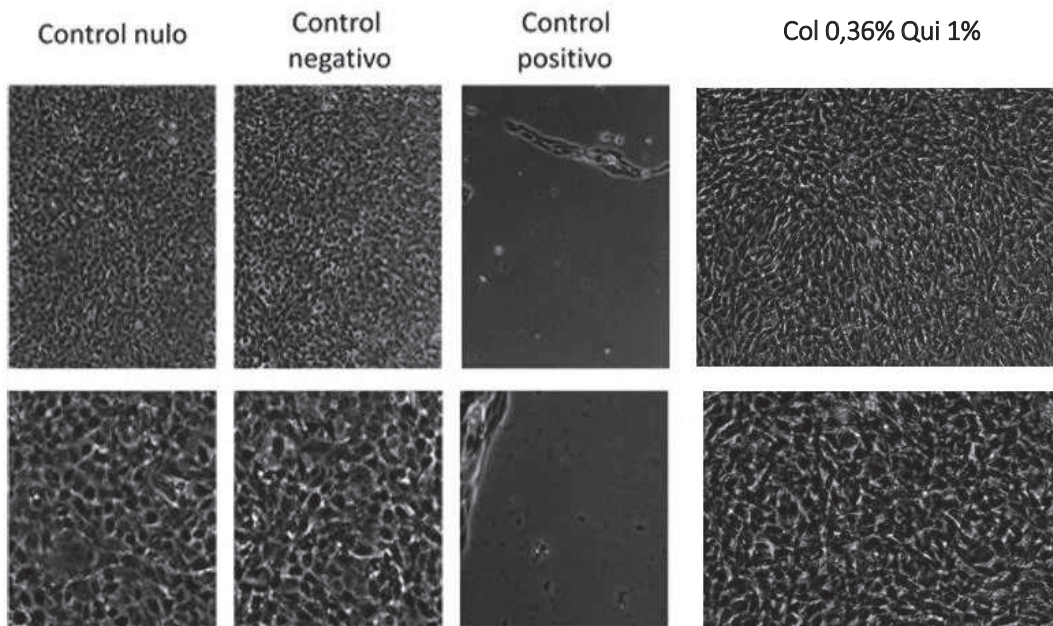


Figura 3. 31: Resultados ensayos citotoxicidad directa efectuados en el IIB (UNSAM)

<sup>2</sup> Realizado en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas por la Dra. Ana E. González Wusener

### 3.13 Referencias

- [1] C. J. Doillon, D. Mantovani, N. Rajan, J. Habermehl, and M. Cote, "Preparation of ready-to-use , storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications," vol. 1, no. 6, pp. 2753–2758, 2007.
- [2] Matthew D. Shoulders and Ronald T. Raines, "Collagen Structure and stability," *Natl. Inst. Heal.*, pp. 929–958, 2010.
- [3] I. Jones, L. Currie, and R. Martin, "REVIEW A guide to biological skin substitutes," pp. 185–193, 2002.
- [4] J. E. McBane, B. Vulesevic, D. T. Padavan, K. A. McEwan, G. S. Korbitt, and E. J. Suuronen, "Evaluation of a Collagen-Chitosan Hydrogel for Potential Use as a Pro-Angiogenic Site for Islet Transplantation," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–15, 2013.
- [5] W. Lee *et al.*, "Three-dimensional bioprinting of rat embryonic neural cells," pp. 798–803.
- [6] B. Kaczmarek, A. Sionkowska, J. Kozłowska, and A. M. Osyczka, "New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan / collagen / hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC / NHS," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, pp. 247–253, 2018.
- [7] L. Jean *et al.*, "Activation of Rac by Asef2 promotes myosin II-dependent contractility to inhibit cell migration on type I collagen," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 24, pp. 5585–5597, 2013.
- [8] B. E. Pollot, C. R. Rathbone, J. C. Wenke, and T. Guda, "Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 75, pp. 672–679, 2017.
- [9] C. Deng *et al.*, "A Collagen–Chitosan Hydrogel for Endothelial Differentiation and Angiogenesis," *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 10, pp. 3099–3109, 2010.
- [10] W. Lee *et al.*, "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication," *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1587–1595, 2009.
- [11] M. Laronda *et al.*, "A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May, pp. 1–10, 2017.
- [12] S. V. Murphy, A. Skardal, and A. Atala, "Evaluation of hydrogels for bio-printing applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 272–284, 2013.
- [13] T. K. Merceron and S. V. Murphy, *Hydrogels for 3D bioprinting applications*. Elsevier Inc., 2015.
- [14] F. Pati, J. Jang, J. W. Lee, and D. W. Cho, *Extrusion bioprinting*, no. November. 2015.
- [15] L. Wang and J. P. Stegemann, "Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2410–2417, 2011.
- [16] J. E. McBane, B. Vulesevic, D. T. Padavan, K. A. McEwan, G. S. Korbitt, and E. J. Suuronen, "Evaluation of a Collagen-Chitosan Hydrogel for Potential Use as a Pro-Angiogenic Site for Islet Transplantation," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–15, 2013.
- [17] C. Deng *et al.*, "A Collagen–Chitosan Hydrogel for Endothelial Differentiation and Angiogenesis," *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 10, pp. 3099–3109, 2010.

## 4 Conclusiones

A partir del trabajo realizado durante los meses de desarrollo del proyecto, se pudieron concluir distintos aspectos relacionados con la tinta y los sustratos, los que se resumen a continuación.

### 4.1 La tinta

Se realizó exitosamente la mezcla del colágeno (extraído en el laboratorio, de tendones de cola de rata) con el quitosano comercial disponible.

Se determinó su comportamiento reológico:

- En el estado no perturbado del precursor de hidrogel - ensayos oscilatorios -, se observó la predominancia del comportamiento líquido por sobre el sólido de las mezclas.
- En analogía con el proceso de extrusión en la jeringa - ensayos de flujo-, se comprobó el comportamiento tixotrópico del precursor del hidrogel; este comportamiento corresponde al colágeno —no se aprecia en el quitosano. Por otro lado, se corroboró que, a mayor concentración de cualquiera de los dos polímeros en la mezcla, la viscosidad aumenta.

Se evaluó su capacidad de impresión:

- No pudo establecerse una relación directa entre viscosidad y el parámetro Pr. Sin embargo, se puede afirmar que el rango de los parámetros elegidos de tiempo de eyección y cantidad de material fueron adecuados, ya que en todos los casos se logró que la tinta saliera de la boquilla de extrusión en un tiempo adecuado formando un filamento continuo.
- Adicionalmente, durante el trabajo se comprobó que puede establecerse para cada una de las tintas formuladas una combinación de parámetros de impresión (Condiciones 1,2 ó 3 de impresión) que optimice el proceso en cuanto a conservación de la forma (parámetro Pr más cercano a 1), tiempo del proceso y volumen del sustrato final.

### 4.2 Sustratos

Se lograron mediante el método que incluye la nebulización del agente que neutraliza la tinta 3D-impresa, y que incorpora NHS y EDC; preservaron su forma y pudieron ser manipulados. Optimizando el entrecruzamiento y gelación del precursor de hidrogel 3D-impreso se logró un sustrato de  $\text{pH} \cong 7,40$ , manipulable, flexible y ligero, de tal manera que toma la forma de la superficie sobre la que se dispone. Poseen mayor rigidez respecto de los otros mecanismos de gelación propuestos, determinada por la medición de su módulo de compresión.

Citotoxicidad

- Si bien se conocían las propiedades no citotóxicas del colágeno y el quitosano individualmente, el sustrato en su totalidad no presentó citotoxicidad evaluada por fibroblastos de línea celular. Esto nos alienta a probar la supervivencia y proliferación de queratinocitos que serán depositadas en el sustrato por bioimpresión 3D en un futuro.

Estabilidad en PBS



- La inmersión de los sustratos en PBS por 72 horas evidenció un comportamiento contractivo, es decir, una pérdida de masa acuosa. Esto muestra un desequilibrio entre la cantidad de agua y la proporción de cadenas poliméricas. Mediante la comparación de la masa polimérica seca por liofilización de un sustrato no tratado frente a otro del mismo volumen que había sido lavado con PBS y perdido una masa húmeda del 42%, se observó que la masa de polímero no se había alterado.

#### Degradación en medio con colagenasa

- Los ensayos de degradación realizados en un entorno fisiológico (solución fisiológica con una concentración de  $12 \frac{\mu g}{ml}$  de colagenasa) presentaron una mayor pérdida de masa que aquellos inmersos en PBS. Esto se debe a la acción enzimática sobre las cadenas de colágeno. Aun así, el sustrato presentó integridad en ese medio hasta las 44 horas de haber estado sumergido debido a la presencia del quitosano en la composición de la tinta.

#### Microscopía electrónica de barrido

- Respecto de la morfología de superficie y microestructura interna, se observó que los sustratos poseen una superficie rugosa y porosa. Además, en los sustratos sumergidos por 5 hs en PBS, se observó una estructura más compacta del hidrogel, acorde con la pérdida de agua mencionada.

### 4.3 Tecnología para la bioimpresión 3D

La realimentación continua con el fabricante de la bioimpresora permitió especificar todas las características que debe reunir una bioimpresora 3D para la producción de resultados repetibles y eficientes en cuanto a tiempo y materiales, consignadas en el capítulo *Resultados y Discusión*. En efecto, la adición de tecnología para realizar la nebulización en la cama de impresión al tiempo que se le da a la tinta impresa la temperatura de 37°C necesaria para que el colágeno gelifique, son dos modificaciones factibles para llevar a cabo próximamente. Del mismo modo, optimizar el uso de la segunda jeringa para poder imprimir capas intercaladas del precursor de hidrogel y de suspensión celular, permitiendo lograr además un sustrato multicapa de un grosor similar al de la piel, de hasta 5 mm.

## 5 Trabajo a futuro y perspectivas

Con el objetivo final de realizar un injerto de piel temporario se debe trabajar:

### *A corto plazo:*

1. Bajar la tendencia contractiva del sustrato al menos en las primeras 24 hs de inmersión.
2. Evaluar y comparar la viabilidad y proliferación celular (queratinocitos in vitro) al incorporar el ácido hialurónico como tercer componente de la tinta.
3. Realizar sobre el sustrato final ensayos de tracción, donde se pueda determinar el límite elástico y la tensión de rotura de los sustratos.

### *A largo plazo:*

1. Incluir células y factores de crecimiento (que estimulen la multiplicación celular) en los cabezales de extrusión de la impresora 3D.
2. Evaluar la acción antimicrobiana del quitosano y sus beneficios en la cicatrización de heridas de piel. Por otro lado, analizar sus propiedades hemostáticas y angiogénicas y los efectos que producen en la reparación del tejido.

## 6 Anexo

Pruebas gelificación tintas de colágeno obtenido en el laboratorio.

Se buscó incorporar las cantidades enumeradas en la tabla 5.1, vortexeando toda la mezcla. Se partió de tintas que contenían un 0,96% m/v y 0,72% m/v de colágeno. Posteriormente, se incubó en un baño a 37°C por 30 minutos, resultando lo presentado en la figura 3.18 para las dos concentraciones de colágeno empleadas.

Tabla 5. 1: Composiciones de las distintas preparaciones del gel de colágeno 0,96% m/v y 0,72% m/v.

Componentes de la mezcla	A/1	B/2	C/3
Colágeno [uL]	600	600	670
PBS 10X [uL]	100	80	80
H <sub>2</sub> O[uL]	288	110	40
NaOH 1M [uL]	12	10	10

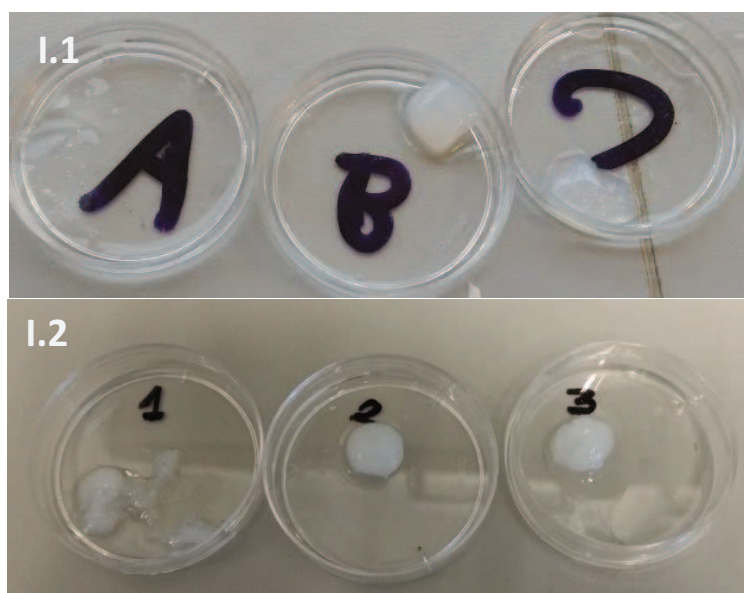


Figura 6.1: Aspecto del gel de colágeno entrecruzado mediante la inclusión de NaOH, PBS y agua (ver tabla 3.1). En la imagen I.1 Concentración del colágeno es de 0,96% y en la I.2. la concentración del colágeno es de 0,72%

Se observó una buena consistencia en la preparación B/2 para ambas concentraciones de gel, entendiéndose como buena consistencia: una sola fase, con suficiente integridad estructural como para ser manipulado. Entonces, partiendo de dicha preparación exitosa en bibliografía y para nuestro colágeno, se procedió a replicarla para mezclas con quitosano, con el objetivo de evaluar si formaban un gel de apariencia homogénea.