

**DISEÑO DE UNA TINTA DE BIOMATERIAL A BASE DE PEGDA Y PLASMA RICO  
EN PLAQUETAS PARA POTENCIALES APLICACIONES EN EL DESARROLLO DE  
APÓSITOS PERSONALIZADOS PARA ÚLCERAS CRÓNICAS DE PIE DIABÉTICO**

**Presentado por:**

Sofia Valentina Mateus Suárez

Michelle María Torres Pinzón

**Códigos:**

U00114502

U00113116

**Director:**

Ph.D. Silvia Milena Becerra Bayona

**Co-Director:**

Ph.D. Víctor Alfonso Solarte David

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa De Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2021

## **Agradecimientos**

*Agradecemos a Dios, por guiarnos en la realización de nuestro proyecto de grado, por brindarnos la fortaleza cuando más decaídas nos sentimos y por permitirnos finalizar esta etapa de aprendizaje.*

*Agradecemos a nuestras familias, en especial padres y abuelos, por ofrecernos su apoyo incondicional, amor y bienestar durante el proceso académico de los últimos años. Gracias por creer en nosotras y en nuestras metas, por confiar en nuestras capacidades, por ser comprensivos y guiarnos en los momentos donde tuvimos el juicio nublado.*

*Agradecemos a nuestros directores de proyecto de grado, PhD. Silvia Milena Becerra y PhD. Víctor Alfonso Solarte, por orientarnos con paciencia en la planeación y ejecución del proyecto, brindándonos los conocimientos necesarios para el desarrollo del mismo. Gracias por ser profesores dedicados y ser parte de nuestro crecimiento profesional y personal. Sus enseñanzas nos acompañarán y sus trayectorias serán un ejemplo para nosotras.*

*Finalmente, queremos agradecer a todas las personas que nos brindaron una palabra de ánimo que nos motivó a continuar este proceso con una actitud positiva.*

## **Resumen**

Las úlceras crónicas de pie diabético (UCPD) son una problemática que afecta la integridad de la piel, la cual necesita de una matriz extracelular (andamio) y biomoléculas para lograr el proceso cicatrización. Las biomoléculas inmersas en el plasma rico en plaquetas (PRP), incluyen factores de crecimiento que contribuyen a la regeneración de tejidos, por lo que se propuso el diseño de una tinta de biomaterial de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) y PRP para potenciales aplicaciones en el desarrollo de apósitos personalizados, como tratamiento alternativo para promover la cicatrización de UCPD.

El estudio planteo la búsqueda de un material viscoso (ThA) para aumentar la imprimibilidad del polímero, la inmovilización del PRP en la tinta de PEGDA al 10, 20 y 30% p/v, y ThA, y la evaluación de la imprimibilidad al variar los parámetros de flujo (150, 250 y 350%) y velocidad de extrusión (2 y 5 mm/s). Por lo anterior, se empleó gelatina para permitir la impresión de la mezcla, y utilizarla como una matriz de sacrificio que fuera liberada de la estructura. Así mismo se obtuvieron tintas de biomaterial con una óptima imprimibilidad según la fidelidad en la morfología y dimensiones diseñadas, con una formación de filamentos continuos. Posteriormente, se determinó que el PRP no es apto para la extrusión de un filamento y no permite la obtención de una solución homogénea al ser mezclado con la tinta de biomaterial, por lo que, basado en nuestro criterio, no puede ser utilizado para impresión.

Con base en lo anterior, se establece que la tinta tiene potencial de ser usada para la inmovilización de biomoléculas y mejorar el tratamiento de las UCPD, al permitir la fabricación de andamios personalizados.

**Palabras claves:** PEGDA, bioimpresión 3D, tinta de biomaterial, PRP, UCPD

## **Abstract**

Chronic diabetic foot ulcers (CDFU) are a problem that affects the integrity of the skin, which needs an extracellular matrix (scaffold) and biomolecules to achieve the healing process. Biomolecules immersed in platelet-rich plasma (PRP) include growth factors that contribute to tissue regeneration, which is why the design of a polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) and PRP biomaterial ink was proposed for possible applications in the development of personalized wound dressings, as an alternative treatment to promote the healing of CDFUs.

The study proposed the search for a viscous material (ThA) to increase the printability of the polymer, the immobilization of PRP in the PEGDA ink at 10, 20 and 30% w / v, and ThA, and the evaluation of the printability by varying the flow parameters (150, 250 and 350%) and extrusion speed (2 and 5 mm / s). Therefore, gelatin was used to allow the printing of the mixture, and use it as a sacrificial matrix that was released from the structure. Likewise, biomaterial inks were obtained with optimal printability according to the fidelity in the morphology and designed dimensions, with a formation of continuous filaments. Subsequently, it was determined that PRP is not suitable for extrusion of a filament and does not allow obtaining a homogeneous solution when mixed with biomaterial ink, therefore, based on our criteria, it cannot be used for printing.

Based on the foregoing, it is established that the ink has the potential to be used for the immobilization of biomolecules and improve the treatment of CDFU, by allowing the manufacture of customized scaffolds.

**Keywords:** PEGDA, 3D bioprinting, biomaterial ink, PRP, CDFU

## Tabla de contenido

Capítulo 1. Problema u oportunidad .....	9
1.1 Introducción.....	9
1.2 Planteamiento del problema .....	9
1.3 Justificación.....	11
1.4 Pregunta Problema.....	12
1.5 Objetivo General.....	12
1.6 Objetivos Especificas .....	12
1.7 Limitaciones y delimitaciones .....	13
Capítulo 2. Marco Teórico .....	14
2.1 Úlceras crónicas de pie diabético y su proceso de cicatrización .....	14
2.2 Los apósitos como alternativa terapéutica a las UCPD .....	15
2.2.1 Hidrogeles y el polímero PEGDA.....	15
2.2.2 Biomoléculas y el Plasma Rico en Plaquetas .....	16
2.3 La bioimpresión y sus principales características.....	18
2.3.1 Tinta de biomaterial.....	18
2.3.2 Características de imprimibilidad y los parámetros de impresión.....	19
Capítulo 3. Estado del Arte .....	23
Capítulo 4. Metodología.....	28
4.1 Pruebas preliminares de viscosidad para la tinta .....	28
4.3 Fabricación de hidrogeles y estudio preliminar de liberación de gelatina .....	30
4.4 Caracterización mecánica preliminar de los hidrogeles .....	31
4.5 Impresión de los hidrogeles usando la tinta de biomaterial.....	32
4.6 Evaluación de la velocidad y flujo de impresión según parámetros de imprimibilidad .....	33
4.7 Estudio preliminar de liberación de gelatina en impresiones .....	34

4.8 Análisis estadísticos.....	34
Capítulo 5. Resultados y Análisis de resultados .....	36
5.1 Resultados.....	36
5.1.1 Pruebas preliminares de viscosidad para la tinta .....	36
5.1.2 Preparación de la tinta de biomaterial.....	39
5.1.3 Estudio preliminar de liberación de gelatina: Hidrogeles .....	41
5.1.4 Caracterización mecánica preliminar de los hidrogeles.....	42
5.1.5 Impresiones de los hidrogeles a partir de la tinta de biomaterial .....	44
5.1.5.1 Estandarización preliminar de las condiciones de impresión de la tinta de gelatina. .....	46
5.1.5.2 Estandarización preliminar de las condiciones de impresión de la tinta de biomaterial de PEGDA y gelatina.....	49
5.1.6 Estudio preliminar de liberación de gelatina: Impresiones .....	54
5.1.7 Preparación de la tinta de biomaterial con PRP .....	55
5.2. Análisis de Resultados.....	56
Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones.....	63
Referencias .....	65

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Fotopolimerización del PEGDA. (Li, y otros, 2018).....	16
<b>Figura 2</b> Evaluación de la imprimibilidad según el estado de gelación del filamento .....	21
<b>Figura 3</b> Gelación de las mezclas PRP y CaCl <sub>2</sub> .....	36
<b>Figura 4</b> Acumulación de calcio y plaquetas en mezcla de PRP con CaCl <sub>2</sub> .....	37
<b>Figura 5</b> Extrusión de las mezclas de PRP y CaCl <sub>2</sub> .....	38
<b>Figura 6</b> Residuos de calcio en la tinta PRP y CaCl <sub>2</sub> a concentración de 100 mM. ....	38
<b>Figura 7</b> Montaje con láminas portaobjetos y ganchos sujetapapeles como molde rectangular para obtener láminas de hidrogel. ....	40
<b>Figura 8</b> Liberación de la gelatina contenida en los hidrogeles.....	41
<b>Figura 9</b> Montaje representativo del ensayo de compresión de las muestras en forma de disco. ....	42
<b>Figura 10</b> Montaje representativo del ensayo de tensión de las muestras en forma de anillo. ...	43
<b>Figura 11</b> Módulos de compresión y elasticidad de las muestras evaluadas.....	44
<b>Figura 12</b> Representación de las dimensiones de la rejilla.....	45
<b>Figura 13</b> Procesamiento de imagen de una rejilla impresa. ....	45
<b>Figura 14</b> Configuración de los parámetros de impresión en la ventana Slicer de NewCreatorK. ....	46
<b>Figura 15</b> Resultados de imprimibilidad y error de área de las rejillas impresas con gelatina al 6% p/v.....	47
<b>Figura 16</b> Resultados de imprimibilidad de las rejillas impresas con las tintas de biomaterial de diferentes concentraciones de PEGDA y gelatina. ....	50
<b>Figura 17</b> Liberación de la gelatina contenida en los hidrogeles impresos. ....	54
<b>Figura 18</b> Mezclas de tintas de biomateriales con PEGDA (10, 20 y 30% p/v), PRP y gelatina. ....	56

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Factores de crecimiento inmersos en el PRP (Mehta & Watson, 2008).....	17
<b>Tabla 2</b> Cálculo de las tintas de biomaterial con ThA de gelatina, para un volumen total 1000 $\mu$ L. ....	30
<b>Tabla 3</b> Estudio de formación del filamento con diferentes concentraciones de gelatina. ....	39
<b>Tabla 4</b> Tintas de biomaterial y controles. ....	40
<b>Tabla 5</b> Portafolio de la estandarización preliminar de las condiciones de impresión con gelatina.....	48
<b>Tabla 6</b> Diferencias significativas de los resultados de ImpC y error de área .....	51
<b>Tabla 7</b> Estandarización preliminar de las condiciones de impresión de PEGDA y gelatina. ....	51
<b>Tabla 8</b> Continuidad de filamento .....	53



## **Capítulo 1. Problema u oportunidad**

### **1.1 Introducción**

Actualmente, se presenta un desafío en el tratamiento de las úlceras crónicas de pie diabético (UCPD) porque las alternativas terapéuticas disponibles en el mercado, no son del todo eficientes para promover una adecuada cicatrización de las heridas debido a que no consideran características propias de las úlceras de cada paciente como la localización, la dimensión y la morfología. Frente a esto, la ingeniería de tejidos mediante la impresión 3D, permite la fabricación de apósitos tipo hidrogel que proporcionan un ambiente adecuado para la regeneración tisular. El presente estudio se enfoca en el diseño de una tinta de biomaterial a base de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) y plasma rico en plaquetas (PRP), empleando la capacidad del polímero de elaborar hidrogeles con preservación de estructura y no citotoxicidad, y haciendo uso de las biomoléculas inmersas en el PRP que contribuyen en la mejora de la cicatrización de las úlceras.

### **1.2 Planteamiento del problema**

La diabetes es una enfermedad crónica que afecta mundialmente al 9.3% de adultos con edades entre los 20 a 79 años. Se origina cuando existen elevados niveles de glucosa en la sangre debido a que el cuerpo no produce cantidades suficientes de insulina, o no responde de forma eficaz a esta hormona (International Diabetes Federation, 2019). Entre las complicaciones más severas de la diabetes están las UCPD, las cuales suelen aparecer hasta en un 25% de los pacientes (Alavi , y otros, 2014). Las UCPD se derivan de compresiones altas en áreas específicas y son causadas por la vasculopatía y la neuropatía periféricas. La primera afecta a los vasos sanguíneos que irrigan las extremidades inferiores del cuerpo, impidiendo que la parte del pie tenga un suministro apropiado de sangre. Mientras que la segunda, provoca en el paciente una pérdida de sensación del dolor, presión y calor, haciendo la piel susceptible a lesiones (Alexiadou & Doupis, 2012).

Los anteriores factores contribuyen a que la UCPD no cierren de forma adecuada, ya que interfieren en la homeostasis de la cicatrización, y fomentan un entorno con elevados índices de marcadores inflamatorios, baja actividad de los factores de crecimiento, reducción en la proliferación celular, y altos niveles de proteasas que limitan la formación de matriz extracelular (Uccioli, y otros, 2015). Al no existir una correcta cicatrización, la úlcera queda expuesta y vulnerable ante infecciones microbianas (Armstrong, Boulton , & Bus, 2017). Lo anterior, sumado a la falta de irrigación contribuye a la formación de tejido necrótico (Qi , y otros, 2018), el cual interrumpe la recuperación de la úlcera y podría llevar a la amputación de la extremidad. Aún con la aplicación de tratamientos para el manejo de la herida, de un 14% a 20% de las UCPD requerirán una amputación mayor. Además, la recurrencia de las UCPD en tres años se encuentra en el 79%, y la tasa de mortalidad luego de una amputación sobrepasa el 70% a los 5 años del evento (Marinel.lo Roura & Verdú Soriano, 2018).

Con el fin de impedir una amputación de la extremidad, los tratamientos actuales se enfocan en reducir el tamaño de la UCPD. A pesar de los avances que se han logrado con las diferentes alternativas terapéuticas como el desbridamiento, la terapia de presión negativa, y las plantillas ortopédicas, un número significativo de los pacientes no responden a estos tratamientos y frecuentemente resultan en hospitalizaciones prolongadas y amputaciones (Pop & Almquist, 2017) (Tan C. T., Liang, Ngo, Dube, & Lim, 2020). Asimismo, algunas veces se utilizan terapias que implementan apósitos, con el fin de administrar fármacos y proporcionar un ambiente óptimo al favorecer el crecimiento celular y una cicatrización adecuada (Ortiz-Vargas, y otros, 2017). No obstante, este tipo terapias no consideran que cada paciente puede presentar úlceras en diferentes locaciones y dimensiones, y no tienen en cuenta la morfología del pie ni la profundidad y la topografía de la herida (Hicks, y otros, 2020). Por lo tanto, las alternativas no son adaptables y no

permiten un acople con las necesidades de cada paciente, lo que inhibe la recuperación óptima de la herida.

### **1.3 Justificación**

Al día de hoy existe la necesidad de generar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento eficaz de las UCDP, con el propósito de mejorar el proceso de cicatrización, logrando la reducción de las heridas.

La cicatrización del tejido cutáneo inicia con las fases de hemostasia e inflamación, donde se suministra un flujo constante de sangre y se previene la entrada de microorganismos. Luego se da la formación de una matriz extracelular, para continuar con la fase de proliferación; sin embargo, en las UCPD, los factores de crecimiento y biomoléculas que se tienen en el sitio no son suficientes para lograr la homeostasis del proceso, debido a la presencia de una alta concentración de glucosa que dificulta las actividades fisiológicas de las células cutáneas (Tan C. T., Liang, Ngo, Dube, & Lim, 2020). Por tanto, para que ocurra correctamente el proceso de cicatrización, se necesita de un microambiente que contribuya a la regeneración de tejido, a partir de un andamio y biomoléculas inmovilizadas.

La posibilidad de crear un andamio, con capacidad de mejorar la regeneración tisular en una úlcera, mediante apósitos personalizados a las dimensiones de la herida de cada paciente, es viable gracias a la tecnología de la impresión 3D. Para construir esta estructura, es necesario contar con un biomaterial que actúe como soporte y sea de fácil modelado, así como el polímero para fabricar hidrogeles, PEGDA. El uso de este material es viable, dadas sus características como preservación de la integridad de estructuras construidas, no citotoxicidad y no inmunogenicidad de sus componentes, su resistencia a la adsorción de proteínas y sus propiedades mecánicas ajustables

(Gungor-Ozkerim, Inci, Zhang, Khademhosseini, & Dokmeci, 2018). Además, al ser un material bioinerte, puede ser combinado con biomoléculas para contribuir en la regeneración de tejidos (Peters, Christoforou, Leong, Truskey, & West, 2016). En este contexto, las biomoléculas presentes en el plasma rico en plaquetas (PRP) promueven este tipo de respuesta, ya que incluyen factores de crecimiento y con su acción de coagulación, actúan como agentes reguladores de la actividad inflamatoria, proliferación, angiogénesis y migración celular en el proceso de cicatrización (Conde-Montero, de la Cueva Dobao, & Martínez González, 2017).

De este modo, se plantea la obtención de una tinta de biomaterial a base de PRP y PEGDA para impresión 3D con potencial aplicación en el desarrollo de apósitos personalizados para úlceras crónicas de pie diabético.

#### **1.4 Pregunta Problema**

¿Cuáles son las características idóneas de imprimibilidad de una tinta de biomaterial diseñada a partir de PRP y PEGDA?

#### **1.5 Objetivo General**

Diseñar una tinta de biomaterial a base de PEGDA y PRP para potenciales aplicaciones en el desarrollo de apósitos personalizados para úlceras crónicas de pie diabético.

#### **1.6 Objetivos Especificas**

1. Establecer un método para lograr la inmovilización de PRP en PEGDA, evaluando diferentes relaciones de concentración entre sus componentes.
2. Evaluar diferentes parámetros de extrusión con el fin de imprimir las formulaciones obtenidas de PRP y PEGDA.

3. Determinar la imprimibilidad de las diferentes formulaciones de tintas de biomaterial PEGDA-PRP.

### **1.7 Limitaciones y delimitaciones**

La presente investigación se enfocó en establecer un método para lograr la inmovilización de PRP en PEGDA, así como lograr una viscosidad adecuada para extruir un filamento y realizar impresiones con la tinta de biomaterial. Igualmente, se evaluaron diferentes parámetros de extrusión como el flujo y la velocidad de impresión con las tintas de biomaterial elaboradas, a través del estudio de imprimibilidad de una rejilla construida con la bioimpresora.

El peso molecular del polímero PEGDA que se utilizó en la metodología del proyecto se limitó a 3.4 kDa, debido a su disponibilidad en el laboratorio. Adicionalmente, los ensayos realizados con este material se planearon cuidadosamente debido a su costo y difícil adquisición. En cuanto a la cantidad de pruebas realizadas, se tuvo la limitación de horarios e ingreso al laboratorio debido a la contingencia sanitaria generada por la pandemia del virus Covid-19. Esto limitó el número de repeticiones realizadas en cada experimento.

## **Capítulo 2. Marco Teórico**

### **2.1 Úlceras crónicas de pie diabético y su proceso de cicatrización**

Las UCPD son complicaciones comunes asociadas a la diabetes, las cuales se originan en un área del pie que está expuesta a un estrés repetitivo vertical o cortante. La base de la patología de las UCPD se relaciona con la neuropatía y la vasculopatía periférica, las cuales afectan el sistema nervioso a nivel sensorial y motor, y alteran el sistema de irrigación en las extremidades inferiores, contribuyendo a que la piel sea susceptible a roturas y se formen heridas (Armstrong, Boulton , & Bus, 2017).

La cicatrización de una herida se da a través de procesos regulados de tipo biológico y molecular tales como, la migración celular, la proliferación celular y la disposición de una matriz extracelular. El proceso de cicatrización consta de cuatro fases secuenciales: hemostasia, inflamación, proliferación y contracción de la herida. Durante el desarrollo de las fases, deben ocurrir interacciones entre factores de crecimiento, células y componentes de la matriz. En las UCPD ocurren alteraciones en el proceso de cicatrización, y este queda detenido en la fase inflamatoria (Uccioli, y otros, 2015).

Dentro de las características que presentan las heridas que no cicatrizan y las UCPD, se aprecian altos niveles de proteasas, marcadores inflamatorios elevados, actividad baja de los factores de crecimiento, y reducción en la proliferación celular (Uccioli, y otros, 2015). Específicamente, en las UCPD, el microambiente se encuentra con altos niveles de glucosa, los cuales alteran los procesos de glicosilación y, en consecuencia, afecta las células cutáneas y su actividad fisiológica. Por ejemplo, los fibroblastos presentan fallas en la proliferación celular, disminuyendo la producción de proteínas y provocando retrasos en el proceso de cicatrización (Pang, y otros, 2016).

## **2.2 Los apósitos como alternativa terapéutica a las UCPD**

Actualmente existen varias alternativas terapéuticas para el tratamiento de las UCPD. Dentro de las opciones de tratamiento se destacan la hidroterapia, la aplicación de antisépticos, los apósitos, la terapia de oxígeno, el uso de presión negativa, y el uso de ondas eléctricas y electromagnéticas, láseres, ondas de choque y ultrasonidos (Game, y otros, 2016).

Los apósitos son vendajes que cubren temporalmente una lesión, se utilizan como terapia para mantener condiciones óptimas de ambiente en una herida crónica, con el fin de que ocurra la cicatrización (Miraftab, y otros, 2006). Este último proceso requiere de un entorno húmedo con circulación adecuada de oxígeno y baja carga bacteriana. La ingeniería de tejidos utiliza los andamios (scaffolds) como base estructural del apósito, los cuales deben poseer propiedades mecánicas y características fisiológicas similares al tejido a imitar.

Un andamio es una red de estructuras interconectadas de forma tridimensional que tiene características estructurales de una matriz extracelular. Los materiales que se utilicen en la composición del andamio son los encargados de aportar las propiedades mecánicas de la estructura (Luo, y otros, 2014), donde las células y biomoléculas puedan promover procesos como la regeneración de tejidos, esto se aprecia en los andamios construidos a base de hidrogeles.

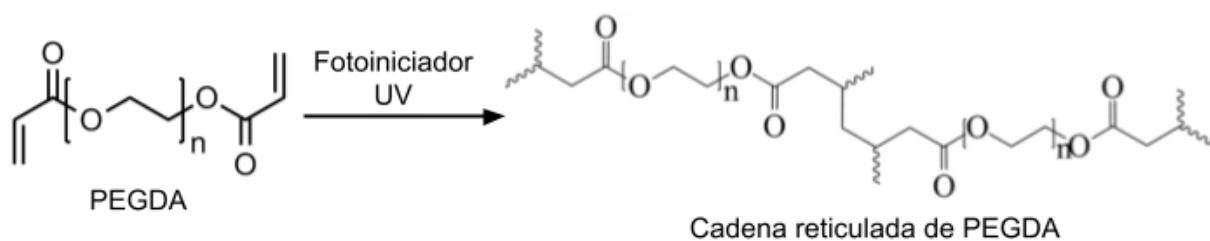
### ***2.2.1 Hidrogeles y el polímero PEGDA***

Los hidrogeles son cadenas de polímeros estructuradas en redes tridimensionales, que tienen una alta capacidad de absorción de agua. Suelen estar constituidos por polímeros naturales o polímeros sintéticos (Yang , Olanrele, Zhang, & Hsu, 2018). Dentro de los materiales más utilizados en la práctica, se aprecia el PEGDA.

El PEGDA es un polímero sintético derivado del PEG (polietilenglicol), que se sintetiza de la fotopolimerización del óxido de etileno con luz ultravioleta, y puede estar conformado por diferentes longitudes de cadenas (Gungor-Ozkerim, Inci, Zhang, Khademhosseini, & Dokmeci, 2018). En la figura 1 se aprecia el proceso de reticulación de la cadena de PEGDA al utilizar un fotoiniciador UV. Dadas algunas características como biocompatibilidad, propiedades mecánicas adaptables y capacidad para encapsular células, el PEGDA ha sido utilizado en el desarrollo de hidrogeles y andamios para aplicaciones en medicina regenerativa y suministro de fármacos (Li, y otros, 2018).

### Figura 1

*Fotopolimerización del PEGDA. (Li, y otros, 2018)*



Fuente: Modificado de (Tan, y otros, 2012)

Los andamios de PEGDA tienen características que son relevantes en el suministro de fármacos o en la administración de factores los cuales son importantes en medicina regenerativa. Dentro de las propiedades que ofrece el PEGDA se destacan, su capacidad de contener grandes cantidades de agua generando un entorno apropiado para las biomoléculas encapsuladas y, su facultad para repeler la adsorción de proteínas específicas (Li, y otros, 2018).

#### **2.2.2 Biomoléculas y el Plasma Rico en Plaquetas**

Las biomoléculas que se inmovilicen en los andamios son de gran importancia debido al papel que pueden desempeñar en la regeneración funcional de tejidos (Luo, y otros, 2014), tal es el caso



de los factores de crecimiento y citocinas, las cuales dirigen la especificidad de las células tisulares en procesos de remodelación de tejidos. Los factores de crecimiento inmersos en el plasma, son las biomoléculas más importantes en la activación del proceso de inflamación y la regeneración tisular que conduce a la cicatrización de tejidos (Deuel & Chang, 2014).

El PRP es una porción de plasma proveniente de la sangre, la cual tiene una concentración plaquetaria de 3 a 5 veces mayor al nivel normal de plaquetas ( $(201 \pm 43) \times 10^3/\mu\text{L}$ ) (Li, y otros, 2020) y factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como los que se listan en la tabla 1. Adicionalmente, posee proteínas que respaldan los procesos de adhesión celular y dan soporte estructural a los procesos de migración, proliferación y crecimiento celular, por lo cual es utilizado en la elaboración de apósitos (Rodríguez Flor, Palomar Gallego, & García-Denche, 2012). Por último, es importante resaltar que el plasma rico en plaquetas es capaz de formar un hidrogel de fibrina mediante su activación con compuestos como gluconato de calcio (Jo, Roh, Kim, Shin, & Yoon, 2013), cloruro de calcio (Sadeghi-Ataabadi, y otros, 2016), batroxobina (Mazzucco, Balbo, Cattana, & Borzini, 2008) y trombina (Samberg, y otros, 2019).

**Tabla 1**

*Factores de crecimiento inmersos en el PRP (Mehta & Watson, 2008)*

<b>Sigla</b>	<b>Factor de crecimiento</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>VEGF</b>	Factores de crecimiento endotelial vascular
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico

## **2.3 La bioimpresión y sus principales características**

La bioimpresión 3D es una tecnología que permite construir andamios tridimensionales para aplicaciones de regeneración tisular, donde se tiene en cuenta aspectos de semejanza y autoensamblaje del tejido a imitar. Dentro de las ventajas que trae el uso de esta técnica se encuentra la posibilidad de simular la complejidad estructural de un tejido, a través de la impresión capa a capa (Hong, Yang, Lee , & Kim , 2017).

Dentro de los tipos de bioimpresión existentes se pueden destacar los métodos realizados por inyección de tinta, técnica asistida por láser y sistema por extrusión. La impresión por inyección de tinta expulsa gotas creadas por medio térmico o acústico, a través de un cristal piezoeléctrico. La técnica de bioimpresión asistida por láser deposita gotas de tinta en una zona, luego de crear burbujas en la superficie del biomaterial a través de un pulso láser de alta energía. Por otro lado, el sistema para bioimpresión 3D por extrusión expulsa la tinta a través de la boquilla de una jeringa, cuyo émbolo es presionado por acción de un pistón, originando un filamento que se extruye para construir estructuras. En adición a lo anterior, el método de bioimpresión por extrusión tiene ciertas ventajas sobre las otras técnicas, como lo es el control de la velocidad de salida de la tinta por la boquilla, la posibilidad de construir estructuras porosas, y los múltiples materiales que se pueden emplear para imprimir (Hong, Yang, Lee , & Kim , 2017).

### ***2.3.1 Tinta de biomaterial***

Las tintas de biomaterial son formulaciones acuosas de polímeros o hidrogeles, que se caracterizan por ser usadas en la producción de andamios para regeneración tisular. Tienen la capacidad de albergar biomoléculas que intervienen en la regeneración del tejido, como los factores de crecimiento, pero a diferencia de las biotintas, estas no contienen células (Groll, y otros, 2018).

Para la selección de los componentes de la tinta se debe tener en cuenta la aplicación para la que se requiera, y la capacidad de impresión que tenga el biomaterial. Además, la tinta debe contener a las biomoléculas integradas mientras el material atraviese la boquilla, sin obstruir el flujo de impresión (Hong, Yang, Lee , & Kim , 2017).

El biomaterial debe poseer características mecánicas, reológicas y biológicas, que conduzcan a la fabricación de un andamio con resistencia mecánica adecuada para conservar la similitud con el tejido; también debe proporcionar una gelificación ajustable para ayudar a la bioimpresión de estructuras; y, por último, se busca que la tinta tenga una biocompatibilidad y biodegradabilidad semejante al microambiente del tejido (Gungor-Ozkerim, Inci, Zhang, Khademhosseini, & Dokmeci, 2018). Es por esto que una mezcla de diferentes materiales o polímeros suele ser utilizada, dado que se busca satisfacer puntos de diseño y al mismo tiempo ensamblar los componentes para su posterior uso en la bioimpresión (Groll, y otros, 2016). En este tipo de situaciones, hay aditivos que son incorporados a la tinta con el propósito de aumentar la viscosidad y así mismo mejorar la resolución de la impresión, al facilitar la extrusión de filamentos capaces de conservar su forma, estas sustancias son conocidas como *thickening agents* (ThA) (Williams, Thayer, Martinez, Gatenholm, & Khademhosseini, 2018).

### ***2.3.2 Características de imprimibilidad y los parámetros de impresión***

La imprimibilidad o capacidad de impresión de una tinta, se caracteriza según la formación uniforme de un filamento y la fidelidad de la forma de la tinta depositada (Zhang, y otros, 2018) . Además, representa la idoneidad en la fabricación de andamios y la efectividad de dicha impresión comparada con el diseño de la estructura. Para que la tinta pueda imprimirse deben tenerse en cuenta ciertos parámetros que tienen una influencia en la resolución durante el proceso de

impresión (He, y otros, 2016). La resolución es la medida que representa que tan detallada se puede recrear una estructura diseñada. a estructura diseñada.

Dentro de los parámetros que se destacan para obtener un proceso de impresión apropiado, se encuentran la velocidad de extrusión y de la boquilla, la temperatura, el flujo y el tiempo de fotopolimerización con luz UV (Zhang, Cristescu, Chrisey, & Narayan, 2020). Así mismo, se debe tener en cuenta que todos los parámetros están interrelacionados y afectan la capacidad de impresión, es por esto que la mayoría de estudios de imprimibilidad inician evaluando el comportamiento de flujo de la tinta, con el fin de asegurar una viscosidad adecuada. Por otro lado, el parámetro de velocidad de la boquilla es importante dado que afecta el diámetro del filamento y el tamaño de los poros (Naghieh & Chen, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, la tinta de biomaterial debe tener una fluidez apropiada para que la estructura a imprimir no colapse; por lo tanto, su viscosidad debe estar en el rango de 300–30000 cps (He, y otros, 2016), con el fin de facilitar el flujo por la boquilla y la conservación de la estructura impresa. Así mismo, la tinta debe mostrar un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento y tener una rápida recuperación después de ser extruida por la boquilla (Zhang, Cristescu, Chrisey, & Narayan, 2020). Es importante tener en cuenta que a una viscosidad muy alta los materiales no se podrían imprimir, ya que la tinta resultaría difícil de fluir y el hidrogel se fracturaría (Naghieh, Sarker, Sharma, Barhoumi, & Chen, 2020).

Considerando lo previamente descrito, la tinta de biomaterial a utilizar en la impresión debe poseer una gelificación ideal para que el filamento extruido tenga una morfología con superficie lisa y ancho constante, con el fin de imprimir estructuras con alta imprimibilidad (Ouyang, Yao, Zhao, & Sun, 2016). Para cuantificar la imprimibilidad de una biotinta se pueden utilizar procesos

de medición y comparación en función de las estructuras a imprimir, por ejemplo, utilizando el coeficiente de imprimibilidad de formas cuadradas ( $ImpC$ ) a través de la fórmula:

### Ecuación 1

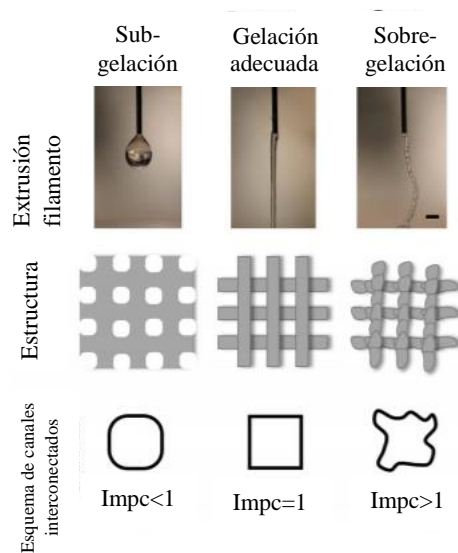
*Coefficiente de imprimibilidad de formas cuadradas ( $ImpC$ )*

$$ImpC = \frac{Perimetro_{Exp}^2}{16 (Área_{Exp})} \quad (1)$$

Donde,  $ImpC$  [adimensional], coeficiente de imprimibilidad de formas cuadradas;  $Perimetro_{Exp}$  [mm], representa la longitud del contorno de la estructura interna de los cuadrados impresos; y  $Área_{Exp}$  [mm<sup>2</sup>] representa el área de la estructura interna de los cuadrados impresos.

### Figura 2

*Evaluación de la imprimibilidad según el estado de gelación del filamento*



*Fuente:* Modificado de (Ouyang, Yao, Zhao, & Sun, 2016)

Este coeficiente, como lo muestra la figura 2, denota que entre más cercano a 1 se encuentre el valor, la forma impresa tiene características de cuadrado, sin irregularidades de filamentos sub-gelados o sobre-gelados. Es decir, cuanto mayor sea el valor del índice, mayor el grado de

gelificación de la tinta (sobre-gelado), o, por el contrario, entre menor sea la cantidad, menor el grado de gelificación de la tinta (sub-gelado). Si el coeficiente oscila entre 0.9 y 1.1, las estructuras impresas presentaran estabilidad morfológica y mecánica (Ouyang, Yao, Zhao, & Sun, 2016).

Otro parámetro que puede ser utilizado en la cuantificación de la imprimibilidad es la comparación de una figura impresa con el diseño creado, a través del cálculo del error de área (He, y otros, 2016), utilizando la ecuación 2.

### **Ecuación 2**

*Error de área.*

$$\% Error = \frac{\text{Área}_t - \text{Área}_{Exp}}{\text{Área}_t} * 100 \quad (2)$$

Donde  $\%Error$  [adimensional], representa el margen de error con el que se reproduce la impresión de la cuadrícula;  $\text{Área}_{Exp}$  [mm<sup>2</sup>], representa el área de la estructura interna de la rejilla experimental; y  $\text{Área}_t$  [mm<sup>2</sup>], representa el área de la estructura interna de la rejilla diseñada. Este parámetro denota que, a mayor magnitud, el valor experimental se aleja del valor de área diseñado.

Este parámetro también nos dicta la tasa de difusión que tiene la tinta al momento de ser impresa. Si el  $\text{Área}_{Exp}$  es menor al  $\text{Área}_t$ , hay una alta tasa de difusión dado que el área en los experimentos se volvió irregular debido a la difusión de los filamentos superpuestos por acción de la gravedad (He, y otros, 2016).

### Capítulo 3. Estado del Arte

En los últimos años, la ingeniería de tejidos ha permitido grandes avances en las alternativas para generar tratamientos en heridas crónicas como las UCPD. Esto se ha logrado con diseño de andamios que faciliten la regeneración de la matriz extracelular, ya que esta es un elemento crítico en la cicatrización de las lesiones de este tipo (Maione, y otros, 2016).

A partir del uso de andamios para la cicatrización de UCPD, estudios recientes evalúan la respuesta de la regeneración tisular, con la aplicación de PRP a través de apósitos tipo hidrogel a base de biomateriales como seda (Li, y otros, 2020), alginato (Gao, y otros, 2019), colágeno (Murray, y otros, 2007), PEG (Samberg, y otros, 2019) y otros. En particular, Qui et al. realizaron un apósito que contenía una mezcla de polímeros, entre ellos PEG, y le incorporaron PRP, con el propósito de analizar el proceso de cicatrización en un modelo de roedor. En sus resultados mostraron un cierre de la herida más rápido gracias a la liberación de factores de crecimiento (Qiu, y otros, 2016) presentes en el PRP. De manera similar, Jain et al. desarrollaron hidrogeles de PEG degradables para la administración sostenida de PRP como fármaco terapéutico, logrando la liberación de factores de crecimiento biológicamente activos, y el aumento de la proliferación de células cutáneas (Jain, Sheth, Dunn, Zustiak, & Sell, 2017). Además, en posteriores estudios comprueban sus efectos beneficios, como su capacidad de suprimir la expresión de genes antiinflamatorios (Jain, y otros, 2019). Estos hallazgos sugieren que las biomoléculas del PRP tienen el potencial de promover una adecuada regeneración de las UCPD; no obstante, requieren de un material que actúe como soporte para la liberación de los factores de crecimiento.

El PEGDA es uno de los principales polímeros utilizados en la fabricación de hidrogeles para aplicaciones en ingeniería de tejidos y administración de fármacos; por lo que ha sido utilizado como material base en la fabricación de andamios para el desarrollo de matrices extracelulares

capaces de inducir angiogénesis, migración celular y demás procesos que contribuyen a la cicatrización y regeneración de tejidos. En este contexto, Zhang et al. desarrollaron hidrogeles de PEGDA con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y el grado de hinchamiento de los apósitos, comprobando que no se presentó citotoxicidad, y condujo a un ambiente adecuado para el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Zhang, Yang, & Nie, 2008). Así mismo, Nemir et al. seleccionaron el PEGDA y mostraron que las propiedades mecánicas de los hidrogeles formados a partir de éste, son ajustables de acuerdo a las necesidades de aplicación, resaltando la importancia de la elasticidad para realizar cultivos con múltiples tipos de células (Nemir, Hayenga, & West, 2010).

Para fabricar los apósitos de hidrogel, se puede emplear la impresión 3D, la cual permite construir estructuras diseñadas según dimensiones, y parámetros ajustados a las necesidades y objetivos del investigador. Por esto, es de vital importancia estudiar la imprimibilidad, para evaluar la capacidad de impresión de la tinta del hidrogel teniendo en cuenta la consistencia y comportamiento reológico, los mecanismos de foto-reticulación y los parámetros de impresión. Por ejemplo, en el estudio de Naghieh et al. se reporta la influencia que tiene la composición y los parámetros de impresión, en la imprimibilidad de andamios de hidrogel. Para ello, caracterizan la imprimibilidad por el diámetro del filamento generado, el tamaño del poro, los ángulos entre la formación de rejillas y la irregularidad en las estructuras. Los resultados mostraron que las propiedades como la viscosidad y los parámetros de fabricación como la velocidad de la boquilla y el patrón angular seleccionado, pueden repercutir en la calidad de impresión, en particular, al utilizar materiales con baja viscosidad se debe emplear una velocidad alta teniendo en cuenta que puede afectar negativamente la impresión de los vértices, debido a los cambios repentinos de dirección de la boquilla (Naghieh, Sarker, Sharma, Barhoumi, & Chen, 2020). Otros autores han



evaluado la imprimibilidad de las tintas de biomaterial a partir de su comportamiento reológico al ser extruida. Particularmente, Paxton et al. realizaron un estudio preliminar de formación de filamento y capacidad de apilamiento de capas, a través de la dispensación manual por una aguja de 125  $\mu\text{m}$  de radio. Esto permitió determinar la concentración adecuada para diferentes composiciones de hidrogeles, validando su capacidad de impresión (Paxton, y otros, 2017). En el caso de las tintas de biomaterial a partir de PEGDA, Joas et al. obtuvieron un flujo laminar tipo tapón en la boquilla de dispensación, lo que permitió la formación de filamentos uniformes y estructuras 3D definidas. Con sus resultados determinaron que se puede lograr la impresión de tintas por extrusión, que tengan un límite elástico relevante y una capacidad de adelgazamiento por cizallamiento alta (Joas, Tovar, Celik, Bonten, & Southan, 2018).

Debido a que las propiedades de una tinta se encuentran definidas por su formulación y afectan la imprimibilidad de las estructuras, proyectos como el de H. Y. Chung et al. buscaban determinar los requisitos de la tinta de hidrogel para imprimir por extrusión. Uno de estos, fue la consistencia, y partir de esta, se identificó que la heterogeneidad en una solución es un factor que contribuye a una imprimibilidad deficiente (Chung, y otros, 2013).

En la búsqueda por encontrar una metodología generalizada para la bioimpresión 3D, se han generado estrategias para los biomateriales que normalmente no cumplen con los requisitos de imprimibilidad, como es el caso del PEGDA. Ouyang et al. propusieron la estabilización temporal de las tintas con una red termo-reversible de gelatina al 5% p/v, donde la deposición de los filamentos se logra por la gelificación de la gelatina, la foto-reticulación del hidrogel por la luz UV, y la liberación térmica de gelatina por exposición a 37°C. Esta metodología permitió obtener una librería de 12 polímeros foto-reticulables, entre ellos el PEGDA, con resultados de impresión por extrusión adecuados y estabilidad a largo plazo (Ouyang, y otros, 2020). No obstante, al

mezclar PEGDA con gelatina, algunos autores han reportado que la tinta que se obtiene tiene un aspecto turbio. Liang et al. manifestaron que al agregar ácido acético al 0,5% v/v a mezclas de diferentes concentraciones de PEG y gelatina, se obtiene una tinta transparente, demostrando que la heterogeneidad de la mezcla puede decrecer (Liang, Guo, Timmerman, Grijpma, & Poot, 2018). Por el contrario, otros autores han sugerido el uso de otras metodologías. En el caso del estudio de Burdick et al., se diseñó un capilar fotopermeable para reticular el hidrogel inmediatamente antes de la extrusión. A través de ensayos de viabilidad celular e impresión de estructuras de tejido a macroescala, se determinó que la foto-reticulación *in situ* o durante la extrusión genera una formación de filamento más estable y estructuras no citotóxicas, mientras se mantenga igual la velocidad de la tinta y del movimiento de la boquilla (Ouyang, Highley, Sun, & Burdick, 2017).

Según la literatura, otra de las metodologías propuestas por diversos autores para incrementar la viscosidad de los polímeros como el PEGDA con el fin de lograr su impresión, es mezclarlos con diferentes componentes. De hecho, Frost et al. establecieron parámetros de fabricación e impresión para la obtención de andamios de gradiente de PEGDA y nanocristales de celulosa por extrusión, debido a la baja viscosidad que presenta el PEGDA a temperatura ambiente. Los nanocristales de celulosa permitieron aumentar su viscosidad, restringiendo su deformación y preservando su estructura antes de la foto-reticulación (Frost, Sutliff, Thayer, Bortner, & Foster, 2019). De manera similar, el PEG y sus derivados también se han mezclado con la gelatina para la fabricación de tintas de biomaterial. Rutz et al. determinaron diferentes formulaciones a la mezcla PEG con gelatina, y obtuvieron hidrogeles, “suaves” y “robustos”, refiriéndose a la capacidad de ser esparcido o retener su forma cuando son manipulado con una espátula, respectivamente. En sus resultados, determinaron que los hidrogeles robustos, no son adecuados para la impresión ya que no se pueden extruir y requieren una presión mayor que afecta la estructura del hidrogel; por lo

tanto, sugieren usar una tinta cercana al punto de gelación. Adicionalmente, los autores recomiendan llevar a cabo la reticulación con luz UV después de imprimir, para aumentar la estabilidad de las estructuras impresas por mayor tiempo (Rutz, Hyland, Jakus, Burghardt, & Shah, 2015).

Las tintas de biomaterial elaboradas a partir de PEGDA, además de incluir un agente para incrementar su viscosidad, deben contener moléculas bioactivas que permitan promover respuestas celulares. En este sentido, diferentes autores han incluido PRP en las formulaciones de tintas para bioimpresión 3D, con el fin de realizar un análisis de sus propiedades fisicoquímicas y su biocompatibilidad. Tal es el caso de Li et al., quienes desarrollaron una biotinta de fibroína de seda con diversas concentraciones de PRP. En este estudio, utilizan PEG400 para la reticulación de la tinta, y determinan que la eficiencia de gelificación se correlaciona con la proporción añadida de PEG. Posteriormente, realizaron estudios de cinética de liberación, donde se evidenció la liberación controlada de los factores de crecimiento del PRP. Esta tinta les permitió imprimir andamios con una estructura de poro interna adecuada, con propiedades biomecánicas y una tasa de degradación óptimas para la regeneración de tejidos. Además, resaltan que el PRP mejoró las propiedades biológicas de las tintas, al favorecer la proliferación celular y la secreción de matriz extracelular (Li, y otros, 2020). Asimismo, Bhatt et. al investigaron una biotinta que contenía dialdehído de alginato, gelatina y PRP, y concluyen que la presencia de PRP en el hidrogel, aumentó su rigidez (Somasekharan, Kasoju, Raju, & Bhatt, 2020). Estos estudios sugieren el potencial que tiene el PRP de implementarse como componente de tintas de biomaterial y ser empleadas en el campo de la regeneración de tejidos.

## Capítulo 4. Metodología

### 4.1 Pruebas preliminares de viscosidad para la tinta

Con el objetivo de elegir el ThA adecuado para la tinta de biomaterial, se realizaron pruebas de gelación y un estudio preliminar de formación de filamento con diferentes componentes. Se utilizó PRP, PRP con cloruro de calcio y gelatina de carnaza bovina. Las pruebas realizadas se describen a continuación:

- Se evaluó la gelación de la mezcla PRP y cloruro de calcio, usando concentraciones de 0 M, 5 mM, 20 mM y 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Para esto, el PRP se obtuvo a partir de sangre periférica extraída de 5 donantes voluntarios, después de firmar el respectivo consentimiento informado aprobado por el Comité Institucional de Ética para la Investigación CIEI-UNAB. De cada uno, se extrajo 20 mL de sangre en 5 tubos Vacutainer® de 4.5 mL. Para la obtención de plasma rico en plaquetas, se siguió el protocolo establecido por Amable Paola et al. (Amable, y otros, 2013), donde se reporta la centrifugación de la sangre donada a 300 gravedades durante 5 minutos y a temperatura de 12°C, con el fin de separar el plasma, posterior se vuelve a centrifugar el plasma extraído durante 17 minutos, a 700 gravedades con temperatura de 18°C. Del proceso se obtuvo plasma pobre en plaquetas (PPP), el cual se utilizó para mezclarlo con el precipitado de plaquetas, y así garantizar una concentración de  $1.4 \cdot 10^6$  a  $1.9 \cdot 10^6$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  en el PRP. Una vez extraído el PRP, se mezcló con el cloruro de calcio, y la solución resultante se dejó en baño maría a 37°C durante una hora, con el fin de apreciar si la mezcla se gelificaba y mantenía su consistencia. Posteriormente, la solución se sometió a un estudio preliminar de formación de filamento en la bioimpresora 3D Dr. INVIVO 4D (Rokit Healthcare, INC), realizando cargas de extrusión de 0.1 mL cada

15 minutos y registrando la caída del filamento con capturas fotográficas de una cámara Canon EOS Rebel T5i.

- Se prepararon soluciones de gelatina a concentraciones de 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6% y 8% p/v, al disolver la gelatina correspondiente en agua destilada, bajo calentamiento a 37 °C y agitación magnética a 800 rpm. Cada una de las soluciones se empleó para llevar a cabo el estudio preliminar de formación de filamento descrito en el anterior ítem.

#### **4.2 Preparación de la tinta de biomaterial**

La tinta de biomaterial a base de PEGDA de 3.4kDa y gelatina (denominada ThA), se preparó con una concentración final de 10, 20 y 30% p/v del polímero sintético, y usando PRP como solvente, en el caso de ser incluido en la formulación de la tinta, de lo contrario se utilizó agua destilada. Para esto, la gelatina se preparó a la concentración requerida (final 6% p/v), se mezcló con el PEGDA y luego se adicionó ácido acético hasta lograr una solución homogénea. En el caso de la tinta que contenía PRP, la gelatina se disolvió en éste, y los volúmenes de la solución de ácido acético se mantuvieron.

Se utilizó la plancha de calentamiento con agitador magnético Velp Scientifica™ para mezclar la gelatina y el solvente, luego se añadió el PEGDA y el ácido acético, y se empleó el vortex Velp Scientifica™ a 1600 rpm y el sonicador Branson Ultrasonics™ para incorporarlos a la solución. Por último, se agregó el fotoiniciador Irgacure 2959 (I2959), para obtener una concentración final en la solución de 3% p/v, a partir de un stock a una concentración de 26.2% p/v disuelto en etanol al 70% v/v. En la Tabla 2 se listan las cantidades que se emplearon de los distintos materiales, en la preparación de las tintas de biomaterial.

**Tabla 2**

*Cálculo de las tintas de biomaterial con ThA de gelatina, para un volumen total 1000  $\mu$ L.*

Solución Precursora	PEGDA 10% p/v	PEGDA 20% p/v	PEGDA 30% p/v
PEGDA (mg)	100	200	300
ThA ( $\mu$ L)	800	700	600
Solución ácido acético ( $\mu$ L) [Concentración final]	40 [0.8% v/v]	50 [1.4% v/v]	30 [5.7% v/v]
Agua destilada (solvente) ( $\mu$ L)	60	50	70
Solución de I2959 ( $\mu$ L)	30	30	30

### **4.3 Fabricación de hidrogeles y estudio preliminar de liberación de gelatina**

La implementación de gelatina como ThA en la tinta permitió su incorporación como matriz de sacrificio en las estructuras fabricadas, es decir, se utilizó durante la extrusión para aumentar la imprimibilidad de la tinta y posteriormente se buscó su eliminación de los hidrogeles fotopolimerizados. Para evaluar la salida de la gelatina, se fabricaron hidrogeles, y se realizó un estudio de la liberación de proteínas del medio de hinchamiento.

Por lo tanto, a partir de las tintas de biomaterial, se fabricaron láminas de hidrogeles de 0.5 mm de grosor usando montajes rectangulares con portaobjetos. Soluciones precursoras de PEGDA al 10, 20 y 30% p/v se emplearon como controles. Los montajes se expusieron a luz UV en un transiluminador Spectroline™ Select™ Series a una longitud de onda de 365 nm e intensidad de 9000  $\mu$ w/cm<sup>2</sup>, durante 12 minutos para generar la reticulación del polímero. Los hidrogeles resultantes se dejaron hinchar durante 48 horas a 37 °C en cajas Petri (Falcon®) que contenían 20 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

A continuación, se realizaron mediciones de la concentración de gelatina liberada en el PBS, utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One, a una absorbancia de 280 nm. Para la medición, se usó PBS como blanco y se utilizó 2  $\mu$ l de cada muestra para obtener el valor de concentración de proteínas (colágeno en la gelatina) en mg/mL.

#### **4.4 Caracterización mecánica preliminar de los hidrogeles**

Con el fin de determinar las propiedades mecánicas de los hidrogeles y evidenciar el efecto del ThA en las estructuras, se extrajeron discos de dimensiones 6 mm de diámetro y altura 0.5 mm, así como anillos con dimensiones 8mm de diámetro externo, 6 mm de diámetro interno y altura de 0.5 mm, de los hidrogeles fabricados en el ítem 4.3. Los discos se sometieron a pruebas de compresión, y los anillos a pruebas de tracción en el banco de carga ElectroForce® 3200 Serie III, usando una celda de carga de 45 N.

Los ensayos de compresión se realizaron aplicando una precarga de 0.05 N y una velocidad de 0.01 mm/s hasta comprimir el disco un 40%. Los ensayos de tracción se realizaron a una velocidad de 0.5 mm/s hasta fractura. El esfuerzo se obtuvo a partir de la carga en N dividida en el área transversal de la estructura. A su vez, la deformación se calculó aplicando la ecuación 3, donde  $L_f$  se refiere a la longitud final, es decir, la adición entre el desplazamiento del pistón del banco de carga con la longitud inicial de la muestra, y  $L_i$  que se refiere a longitud inicial. Estos datos fueron utilizados para determinar el módulo de elasticidad y de compresión a través de la pendiente del segmento lineal en las curvas de esfuerzo-deformación.

### **Ecuación 3**

*Deformación de las muestras*

$$Deformación = \frac{L_f - L_i}{L_i} * 100 \quad (3)$$

#### **4.5 Impresión de los hidrogeles usando la tinta de biomaterial**

Los hidrogeles fabricados a partir de las tintas de biomaterial obtenidas en el ítem 4.2, se imprimieron mediante el sistema Syringe Dispenser de la bioimpresora. Este sistema consiste de un módulo que permite la extrusión de tinta desde una jeringa, y es activado por un pistón que presiona el émbolo de la misma. Se utilizó una jeringa de 3 mL con una aguja punta roma de 0.2 mm de diámetro interno. La temperatura del dispensador y de la cama de impresión se mantuvieron en 16°C.

El software para el manejo de la bioimpresora es NewCreatorK, en el cual se importan archivos de diseño asistido por computadora (CAD) con formato. stl, .3ds, .obj, etc. Estos archivos son denominados objetos y pueden ser modificados en escala, rotación y orientación. A ese objeto se le adjudicaron los parámetros para el filamento INVIVO@GEL, que pueden ser modificados según las propiedades de la tinta o necesidades del operador. Entre los parámetros que se pueden cambiar para obtener una impresión adecuada, se encuentran los siguientes: la altura de la capa, la velocidad de impresión, el flujo, el patrón de relleno, la densidad de relleno, la distancia de retracción y, las dimensiones y la velocidad de la falda o contorno de la estructura impresa.

Cuando se digitaron los parámetros considerados, se realizó un *slicing* para determinar el tiempo de impresión y se guardó el archivo en formato .gcode, el cual contiene las instrucciones y especificaciones de la ruta de impresión. Sobre la cama de la impresora se posicionó una placa de



Petri Falcon® de 100 mm como base para mantener la estructura impresa. Antes de empezar cada impresión, se realizaron dos cargas de tinta de 0.05 mL. Una vez impresas las estructuras, se sometieron a un proceso de foto-reticulación al exponerlas a luz UV en un transiluminador, durante 12 minutos.

#### **4.6 Evaluación de la velocidad y flujo de impresión según parámetros de imprimibilidad**

Para establecer la velocidad y el flujo de impresión idóneos, se evaluó la imprimibilidad de estructuras en forma de cuadrículas impresas con las diferentes tintas de biomaterial. Se diseñó un prisma rectangular de 14 x 14 x 0.1 mm<sup>3</sup> en SolidWorks®, y se importó al software NewCreatorK como formato stl. En NewCreatorK se modificaron los parámetros de *slicing* para formar la rejilla, con una densidad de llenado (*fill density*) de 15% y, un patrón de relleno tipo rejilla (*infill pattern: Grid*). Los valores en la sección de retracción se estimaron descartando la formación de líneas de viaje (*travel lines*) en la estructura diseñada. Todas las impresiones se realizaron con falda (*skirt*) para permitir una estabilización del flujo. Para la impresión de las cuadrículas se variaron

Después de la fotopolimerización, se tomaron fotografías de las estructuras impresas con la cámara, y se procesaron con ayuda del software libre ImageJ. Para esto, el contraste de la imagen se ajustó, seguido de una sustracción del fondo y el uso de la herramienta encontrar bordes para obtener un croquis de la estructura. Posteriormente, la imagen resultante se binarizó y se seleccionó la opción de *close*, para realizar una operación de dilatación y luego, una de erosión, con el propósito de rellenar agujeros en la estructura. De ser necesario, se utilizó la imagen original de referencia y se realizó un trazado manual de los bordes para obtener una representación de la estructura más exacta. Finalmente, se utilizó la herramienta de trazado para seleccionar las figuras internas de la cuadrícula, y con ROI Manager se obtuvo la medida del área y perímetro de las zonas de interés.

Con los valores de área y perímetro obtenidos con ayuda de ImageJ se determinó la imprimibilidad de cuadrados y el porcentaje de error utilizando las ecuaciones 1 y 2. Asimismo, se evaluó la continuidad del filamento impreso en las rejillas, basado en el conteo de filamentos que no presenten intermitencias en su recorrido. Para ello se tienen en cuenta los 10 segmentos que conforman la estructura diseñada, los cuales tienen como longitud 14 mm individualmente. El conteo de filamentos formados se registró en una tabla.

#### **4.7 Estudio preliminar de liberación de gelatina en impresiones**

Se realizaron impresiones de discos, los cuales fueron diseñados en SolidWorks® con dimensiones 6 mm de diámetro y 0.75 mm de altura. Para la impresión de discos se modificaron los parámetros de *slicing*, con una densidad de llenado (*fill density*) de 100% y un patrón de relleno tipo concéntrico (*infill pattern: Concentric*). Los parámetros de impresión de velocidad y flujo se determinaron a partir de los mejores resultados obtenidos de la evaluación de imprimibilidad, descritos en el ítem 4.6. Una vez se imprimieron los discos, se dejaron hinchar durante 48 horas a 37 °C. A continuación, se determinó la concentración de proteínas liberadas usando el proceso descrito en el ítem 4.3.

Este estudio se realizó con el propósito de comprobar que efectivamente la gelatina se liberaba después de que los hidrogeles impresos se hincharan, y así corroborar que, tanto en la fabricación de hidrogeles como en su impresión, la gelatina ya no hacía parte de la estructura final.

#### **4.8 Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos se reportaron como la media aritmética de los valores  $\pm$  error estándar. Las comparaciones entre las distintas formulaciones de la tinta de biomaterial, se realizaron utilizando un análisis de varianza ANOVA, seguido de un test de Tukey para comparaciones múltiples. Para todos los análisis estadísticos realizados, valores de  $p < 0.05$  se consideraron

estadísticamente significativos. Para comprobar si los datos presentaban comportamiento normal, se utilizó el test Shapiro-Wilk; de no pasar el test de normalidad, se utilizó la estadística no paramétrica. Se realizaron tres réplicas por experimento ( $n = 3$ ), a menos que se indique lo contrario.

## Capítulo 5. Resultados y Análisis de resultados

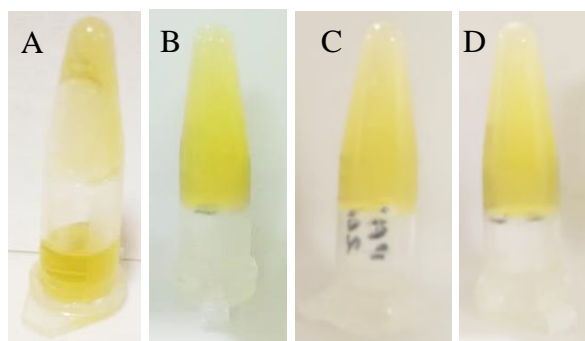
### 5.1 Resultados

#### 5.1.1 Pruebas preliminares de viscosidad para la tinta

A continuación, se presentan los resultados de las pruebas preliminares de viscosidad para encontrar el ThA adecuado y su respectiva concentración a usar en la tinta de biomaterial. En la figura 3, se encuentran los resultados de las soluciones con PRP, luego de exposición a temperatura de 37 °C en baño maría durante 1 hora. Se pudo apreciar que las 3 soluciones con concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (5 mM, 20 mM y 100 mM) presentaron gelación debido a que la mezcla no se deslizó hacia el lado contrario al invertir los tubos, sino que se mantuvo en la parte baja del tubo de microcentrífuga Eppendorf™; contrario a lo que se observa en la solución de PRP sin CaCl<sub>2</sub>, la cual presenta gelación parcial. No obstante, cada una de las soluciones vuelven a estado líquido luego de dejarlas a temperatura ambiente. Estos resultados indican que el PRP no es un ThA; por tanto, no mantiene la viscosidad de la solución por largos periodos de tiempo.

#### Figura 3

*Gelación de las mezclas PRP y CaCl<sub>2</sub>.*

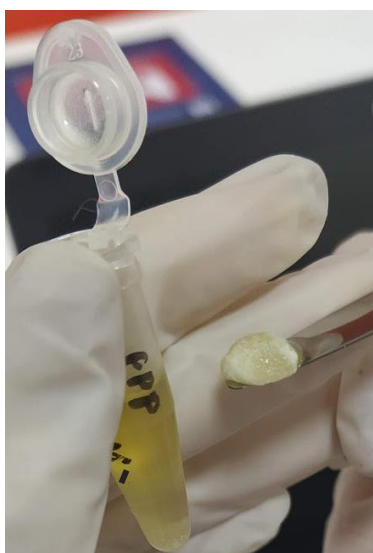


*Nota.* (A) PRP sin CaCl<sub>2</sub> (B) Concentración al 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. (C) Concentración 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. (D) Concentración de 100 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Adicionalmente, en la solución con mayor concentración de cloruro de calcio (100 mM), se pudo percibir una aparente acumulación de calcio y plaquetas lisadas (ver Figura 4), provocada por la temprana activación plaquetaria con  $\text{CaCl}_2$ . Sin embargo, esto no es lo que se busca durante la fase de preparación de la tinta, dado que afecta la homogeneidad de la solución y podría llevar a una liberación temprana de los factores de crecimiento, lo cual no es deseado en esta etapa.

#### **Figura 4**

*Acumulación de calcio y plaquetas en mezcla de PRP con  $\text{CaCl}_2$ .*



Debido a que los resultados anteriores mostraron la capacidad de gelación de las mezclas de PRP y  $\text{CaCl}_2$ , las soluciones se transfirieron a una jeringa con el fin de realizar un estudio preliminar de formación de filamento *in vivo*. Durante la hora que se realizó el ensayo, solo se evidenció la formación de gotas en la boquilla sin presentar gelación de la tinta para extrusión de filamento, como se muestra en la Figura 5. Esto ocurrió con las tintas preparadas a diferentes concentraciones. Al finalizar el estudio con la tinta de 100 mM, una vez más, se notaron restos de calcio en el émbolo de la jeringa (ver Figura 6).

## Figura 5

*Extrusión de las mezclas de PRP y CaCl<sub>2</sub>.*



*Nota.* Imagen representativa de las extrusiones con las mezclas de PRP y CaCl<sub>2</sub> a concentraciones de 0 mM, 5 mM, 20 mM y 100 mM.

## Figura 6

*Residuos de calcio en la tinta PRP y CaCl<sub>2</sub> a concentración de 100 mM.*






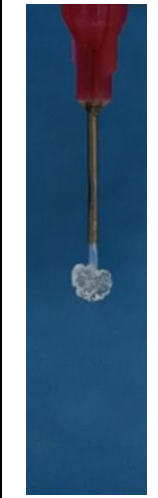


Estos resultados demuestran que no es posible obtener la viscosidad necesaria para imprimir con PRP; por tanto, se procedió a utilizar gelatina para realizar pruebas preliminares de formación de filamento con concentraciones al 3.5, 4, 4.5, 5, 6 y 8% p/v, cuyos resultados se reportan en la Tabla 3. En cuanto a la formación de filamento, solo las mezclas con concentraciones al 3.5, 5 y 6% p/v mostraron una viscosidad adecuada para poder fluir a través de la boquilla sin formar un

grumo en la punta de la aguja. A pesar de esto, la concentración de 3.5% p/v presentó una baja viscosidad, es decir, estaba por debajo de su punto de gelación; por el contrario, las concentraciones de 5 y 6% p/v, permitieron la extrusión de filamentos continuos y estables. Al comparar estas últimas concentraciones, se seleccionó el ThA de 6% p/v de gelatina teniendo en cuenta que se obtuvo un filamento más prolongado, y se percibió mayor uniformidad en su morfología. La gelatina se mezcló con el PEGDA para aumentar la viscosidad de la tinta, buscando mejorar la imprimibilidad del polímero.

**Tabla 3**

*Estudio de formación del filamento con diferentes concentraciones de gelatina.*

Concentración de gelatina	3.5% p/v	4% p/v	4.5% p/v	5% p/v	6% p/v	8% p/v
						

### 5.1.2 Preparación de la tinta de biomaterial

La preparación de las tintas de biomaterial se realizó siguiendo las especificaciones dadas en la metodología en el ítem 4.2. En la Tabla 4 se encuentran las abreviaciones de las tintas realizadas y sus respectivos controles.

**Tabla 4**

*Tintas de biomaterial y controles.*

<b>Sigla</b>	<b>Tinta de biomaterial</b>
<b>T1</b>	PEGDA 10% p/v + Gel 6% p/v
<b>T2</b>	PEGDA 20% p/v + Gel 6% p/v
<b>T3</b>	PEGDA 30% p/v + Gel 6% p/v
<b>Sigla</b>	<b>Controles</b>
<b>C1</b>	PEGDA 10% p/v
<b>C2</b>	PEGDA 20% p/v
<b>C3</b>	PEGDA 30% p/v

La implementación de gelatina como ThA en la tinta permite su incorporación como matriz de sacrificio en las estructuras fabricadas, es decir, se utiliza durante la extrusión para aumentar la imprimibilidad de la tinta y posteriormente se busca su eliminación de los hidrogeles fotopolimerizados. Por lo tanto, antes de estandarizar los parámetros de bioimpresión, se debe verificar la liberación de la gelatina después del hinchamiento. Para esto, se decide hacer hidrogeles con un montaje convencional de portaobjetos y ganchos de sujeción, ver Figura 7.

**Figura 7**

*Montaje con láminas portaobjetos y ganchos sujetapapeles como molde rectangular para obtener láminas de hidrogel.*



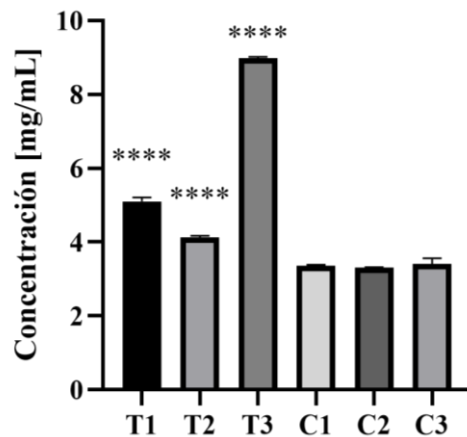


### 5.1.3 Estudio preliminar de liberación de gelatina: Hidrogeles

La concentración de gelatina liberada se determinó a partir de la medición de la absorbancia de las distintas soluciones usando el Nanodrop, como se describió en el ítem 4.3 de la metodología. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 8. Los controles mostraron diferencias estadísticamente no significativas, presentando una concentración total de proteínas entre 3.320 y 3.583 mg/mL. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en las comparaciones de las láminas de hidrogeles fabricadas con las tintas de biomaterial, entre ellas mismas y con sus controles, y se resalta que la concentración de proteínas liberada por la muestra T3 llega hasta 9 mg/mL, mientras que las muestras T1 y T2 tuvieron en promedio concentraciones de 5.10 mg/mL y 4.120 mg/mL, respectivamente. Evidenciando que existe una liberación de gelatina de las estructuras fotopolimerizadas después del hinchamiento.

**Figura 8**

*Liberación de la gelatina contenida en los hidrogeles.*



*Nota.* Las tintas utilizadas se representan por **T1** (PEGDA 10% p/v + Gel 6% p/v), **T2** (PEGDA 20% p/v + Gel 6% p/v), **T3** (PEGDA 30% p/v + Gel 6% p/v), **C1** (PEGDA 10% p/v), **C2** (PEGDA 20% p/v), **C3** (PEGDA 30% p/v). Las diferencias estadísticas de  $p < 0.0001$  se simbolizan con \*\*\*\*.

Estos resultados muestran que, en el intervalo de tiempo determinado, al pasar por hinchamiento, la gelatina se separa del hidrogel. Para comprobar esto, se decide evaluar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, antes de continuar con la estandarización de los parámetros de impresión.

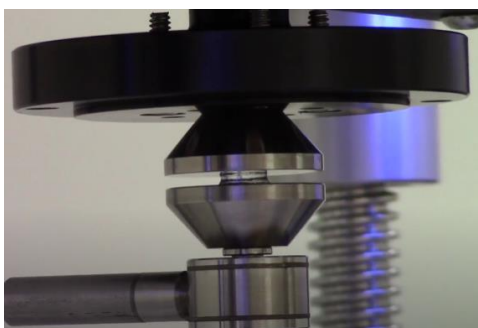
#### **5.1.4 Caracterización mecánica preliminar de los hidrogeles**

Se realizaron pruebas de compresión y tensión con el objetivo de obtener los módulos de elasticidad para las diferentes muestras evaluadas, como se describió en el ítem 4.4 de la metodología. De esta manera se busca verificar que la gelatina después del hinchamiento ya no se encuentra en el hidrogel, y evidenciar el efecto de la gelatina y ácido acético en las estructuras fabricadas.

Teniendo en cuenta el propósito de este estudio, no se tuvieron en cuentas en los ensayos las muestras T1 y C1, ya que T1 y T2, presentaron concentraciones de ácido acético muy cercanas; por tanto, se decidió solo incluir la formulación del 20% p/v de PEGDA. Las figuras 9 y 10 incluyen una foto representativa del montaje de los ensayos de compresión y tensión, respectivamente.

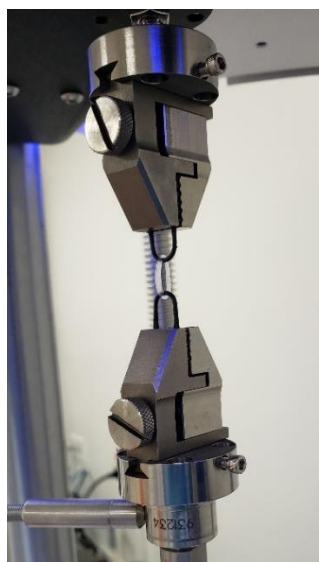
#### **Figura 9**

*Montaje representativo del ensayo de compresión de las muestras en forma de disco.*



## Figura 10

*Montaje representativo del ensayo de tensión de las muestras en forma de anillo.*



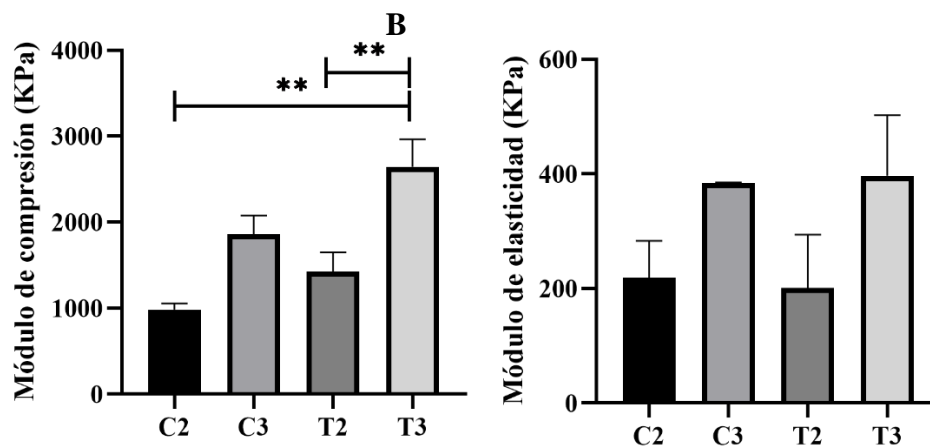
Los módulos de elasticidad se calcularon a partir de los datos obtenidos en los ensayos realizados, al graficar la curva esfuerzo vs deformación para cada una de las muestras (ver Figura 11). En los ensayos de compresión, la muestra C2 tuvo un módulo de 981.55 kPa, el cual fue significativamente diferente al de la muestra T3 ( $p = 0.0013$ ), con un valor de 2645.7 kPa. Adicionalmente, las muestras T2 y T3 también presentaron diferencias significativas ( $p = 0.0068$ ), obteniéndose un módulo mayor para la muestra T3. Asimismo, se observó un incremento en los módulos de compresión, al aumentar la concentración de PEGDA en las tintas de biomaterial que se emplearon para fabricar los hidrogeles, tanto en las muestras como en los controles. Este comportamiento también se obtuvo en los ensayos de tensión. No obstante, no se notaron diferencias significativas entre las muestras y los controles.

Estos resultados sugieren que, en los ensayos de compresión, aunque se obtuvieron valores más grandes para los módulos en las tintas de biomaterial respecto a los controles para la misma concentración de PEGDA, el aumento no fue estadísticamente significativo. Contario a lo

apreciado en tensión, que los módulos fueron muy similares entre las muestras y controles, y se esperaban estadísticos de no significancia.

## Figura 11

*Módulos de compresión y elasticidad de las muestras evaluadas*



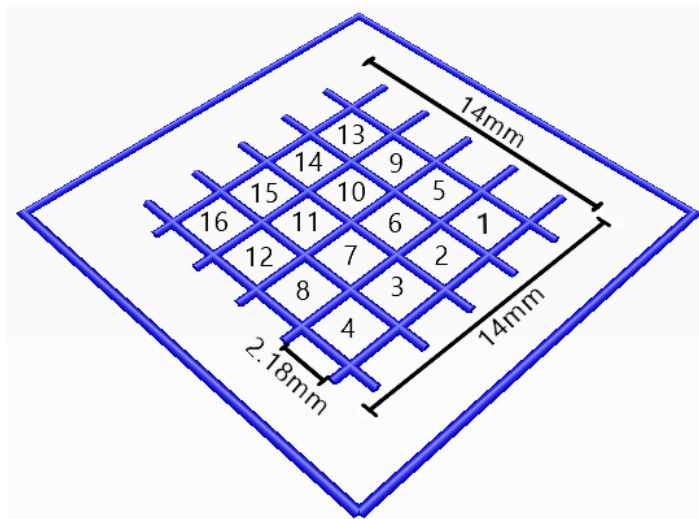
*Nota.* (A) Módulo de compresión. (B) Módulo de elasticidad, no se encontraron diferencias significativas (ns). Las tintas utilizadas se representan por T1 (PEGDA 10% p/v + Gel 6% p/v), T2 (PEGDA 20% p/v + Gel 6% p/v), T3 (PEGDA 30% p/v + Gel 6% p/v), C1 (PEGDA 10% p/v), C2 (PEGDA 20% p/v), C3 (PEGDA 30% p/v). Las diferencias estadísticas se representan por: \*\* ( $p = 0.0013$  y  $p = 0.0068$ ).

### 5.1.5 Impresiones de los hidrogeles a partir de la tinta de biomaterial

Con el fin de establecer el efecto de los parámetros de impresión en el comportamiento de las tintas de biomaterial, y determinar cuáles serían los adecuados para obtener estructuras con mayor imprimibilidad, se realizó una estandarización preliminar con gelatina al 6% p/v (ThA elegido) y otra con PEGDA (al 10, 20 y 30 % p/v) y gelatina (al 6% p/v). Para ello se utilizó la rejilla diseñada en el ítem 4.6, presentada en la Figura 12.

## Figura 12

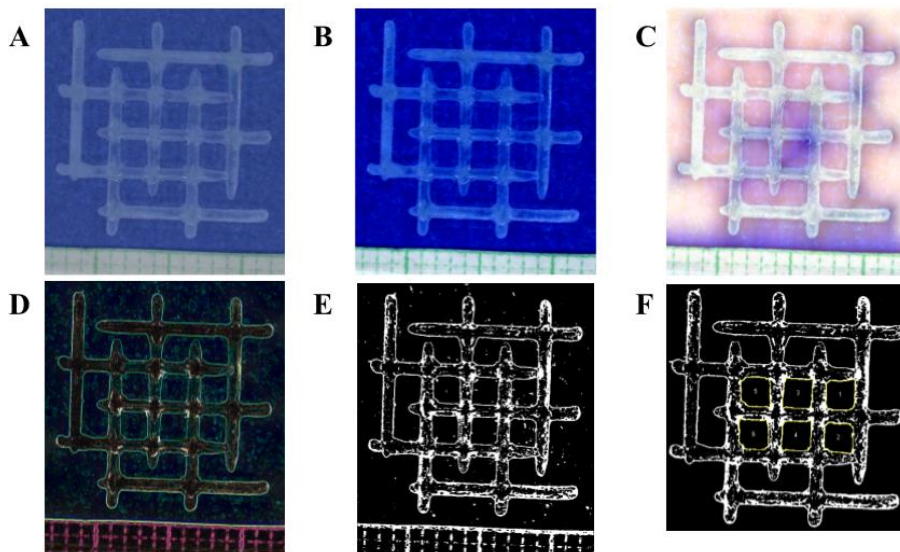
*Representación de las dimensiones de la rejilla.*



Con las fotografías de las rejillas impresas se realizó el procesamiento de imágenes, con el que se obtuvo las área y perímetros de los cuadrados internos de la rejilla, ver Figura 13.

## Figura 13

*Procesamiento de imagen de una rejilla impresa.*



*Nota.* (A) Imagen original de una rejilla impresa. (B) Imagen con el contraste mejorado. (C) Imagen con sustracción del fondo. (D) Contorno de la estructura. (E) Imagen binarizada. (F) Imagen final.

Los parámetros que se obtuvieron en la estandarización de gelatina, se usaron posteriormente para evaluar los resultados con la tinta que incluye PEGDA, y finalmente, a partir de lo anterior, se estudiaría el comportamiento de la mejor combinación de parámetros en la tinta con PRP.

### 5.1.5.1 Estandarización preliminar de las condiciones de impresión de la tinta de gelatina.

La tinta de gelatina al 6% p/v se utilizó para imprimir rejillas variando la velocidad y flujo de impresión, como se describió en el ítem 4.7 de la metodología, con el objetivo de establecer un precedente de la capacidad de impresión de la gelatina y así estimar el comportamiento de la tinta de biomaterial a implementar. En la figura 14 se muestran los parámetros que se pueden ajustar en el programa NewCreatorK, y se resaltan en amarillo los que se modificaron en las diferentes impresiones realizadas.

**Figura 14**

*Configuración de los parámetros de impresión en la ventana Slicer de NewCreatorK.*

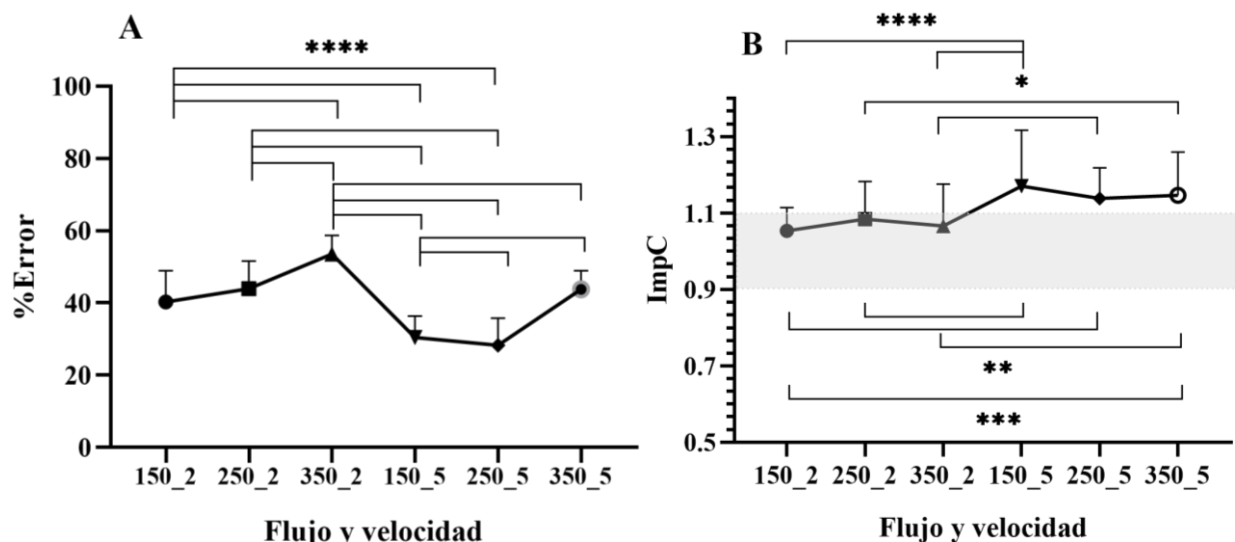
Basic Setting	
<b>General</b>	
Nozzle Size (mm)	0.2
Layer Height (mm)	0.1
Fill Density (%)	15
Printing Temperature (C)	0
Enable Retraction	<input checked="" type="checkbox"/>
Infill Pattern	Grid
Infill Rotate Angle	90
First Layer Infill Angle	90
<b>Speed</b>	
Print Speed (mm/s)	2
Travel Speed (mm/s)	5
Bottom Layer Speed (mm/s)	2
Infill Speed (mm/s)	0
Outer Shell Speed (mm/s)	0
Inner Shell Speed (mm/s)	0.0
<b>Fill</b>	
Solid Infill Top	<input type="checkbox"/>
Solid Infill Bottom	<input type="checkbox"/>
Bottom/Top Thickness (mm)	0
Infill Overlap (%)	15
Perimeter Before Infill	<input type="checkbox"/>
infill oneline	<input type="checkbox"/>
<b>Retraction</b>	
Retraction Speed (mm/s)	1
Retraction Distance (mm)	0.2
Distance (mm, Nozzle change)	0.2
Minimum Travel (mm)	0.01
Minimum Extrusion (mm)	0
Z HOP (mm)	0.4
Z HOP (mm, Nozzle change)	20
Hop Speed (mm/s)	10
<b>Quality</b>	
Shell Thickness (mm)	0
Initial Layer Height (mm)	0.1
Line Width Ratio at First Layer(%)	100
Cut Off Object Bottom (mm)	0.0
Cut Off Object Top (mm)	0.0
Load Before Print(mm)	0.0
Retraction Distance at cancel or finish (mm)	0.5
<b>Skirt</b>	
Skirt Line Count	1
Skirt Start Distance (mm)	3
Skirt Minimal Length (mm)	5
Skirt Speed (mm/s)	7
<b>Filament</b>	
Diameter (mm)	10.12
Input Flow (%)	350

*Nota.* Los cuadros resaltados en amarillo indican los parámetros que fueron modificados entre los ensayos.

En la Figura 15 se reportan los datos de imprimibilidad y error de área que se obtuvieron para las rejillas impresas con gelatina según los parámetros de flujo y velocidad de impresión. Los mayores porcentajes de error de área se hallaron en las estructuras que se imprimieron con un flujo de 350%. Además, no se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones de parámetros de 150% y 250% con 2 mm/s y 5 mm/s. Tampoco hubo diferencias en las relaciones de 350\_5 con 150\_2 y 250\_2. En las demás conjugaciones de parámetros se apreciaron diferencias muy significativas ( $p < 0.0001$ ). Respecto a los resultados de imprimibilidad, las estructuras impresas a una velocidad de 2 mm/s presentaron una imprimibilidad entre 1.05 y 1.08, mientras que las que se imprimieron con una velocidad de 5 mm/s oscilaron entre 1.13 y 1.17.

### Figura 15

*Resultados de imprimibilidad y error de área de las rejillas impresas con gelatina al 6% p/v.*



*Nota.* (A) Porcentaje de error de áreas en función de los parámetros de impresión. (B) Imprimibilidad de las estructuras en función de los parámetros de impresión. Los parámetros de

extrusión se encuentran indicados como flujo\_velocidad y sus unidades son % para flujo, y mm/s para velocidad. La zona sombreada de color gris representa el intervalo de 0.9 a 1.1 en el cual se logra una capacidad de impresión adecuada (Ouyang, Yao, Zhao, & Sun, 2016). Las diferencias estadísticas se representan por: \*\*\*\* (p < 0.0001), \*\*\* (p = 0,0003), \*\* (p = 0.0014, 0,0010 y 0,0029) y \* (p = 0.0469 y 0.0108).

Asimismo, en la Tabla 5 se registran fotos representativas de las estructuras impresas con los 3 mejores parámetros de impresión para cada criterio de imprimibilidad, en orden descendente de izquierda a derecha. Esta selección se realizó identificando los errores de área menores y *ImpC* que se encuentren más cercanos al rango ideal (0.9 a 1.1). Estos resultados sugieren que la gelatina podría cumplir el objetivo de aumentar la capacidad de impresión del polímero PEGDA, dado que las impresiones se caracterizaron por tener errores de áreas por debajo del 54% y buena imprimibilidad de cuadrados, específicamente a una velocidad de 2 mm/s. En particular, las impresiones más acertadas se apreciaron a una velocidad de 2 mm/s y un flujo de 150%.

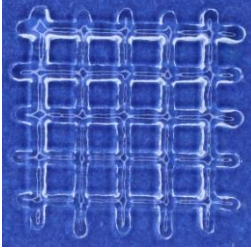
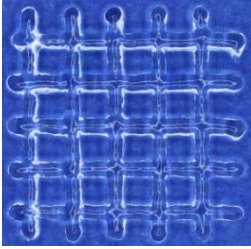
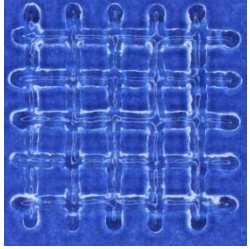
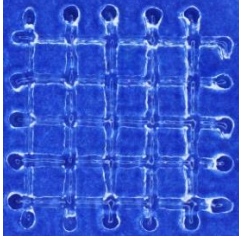
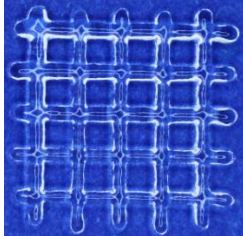
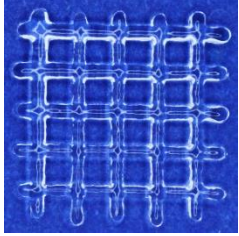
Estos resultados sugieren que la gelatina podría cumplir el objetivo de aumentar la capacidad de impresión del polímero PEGDA, dado que las impresiones se caracterizaron por tener errores de áreas por debajo del 54% y buena imprimibilidad de cuadrados, específicamente a una velocidad de 2 mm/s. En particular, las impresiones más acertadas se apreciaron a una velocidad de 2 mm/s y un flujo de 150%, ya que esta combinación de parámetros se seleccionó entre las tres mejores, tanto para *ImpC*, como en error de área.

## Tabla 5

*Portafolio de la estandarización preliminar de las condiciones de impresión con gelatina.*

	<i>1er parámetro</i>	<i>2do parámetro</i>	<i>3er parámetro</i>
<i>Parámetro</i>	150% & 2 mm/s	250% & 2 mm/s	350% & 2 mm/s



<i>Imprimibilidad de cuadrado</i>			
<i>Parámetro</i>	250% & 5 mm/s	150% & 5 mm/s	150% & 2 mm/s
<i>Error de área</i>			

*Nota:* Se resalta en color amarillo la combinación de parámetros que tienen en común los dos criterios de imprimibilidad.

### ***5.1.5.2 Estandarización preliminar de las condiciones de impresión de la tinta de biomaterial de PEGDA y gelatina***

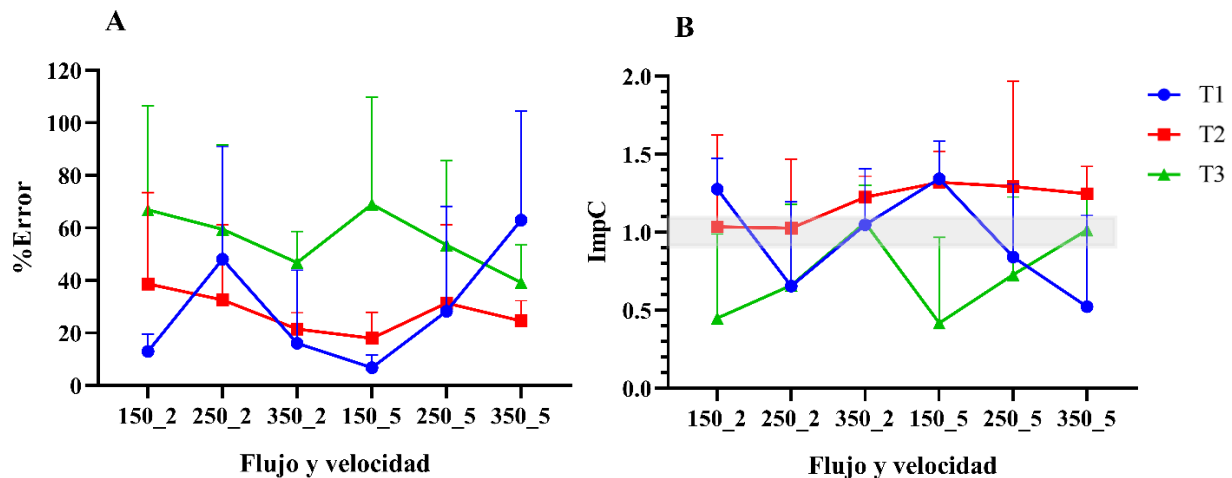
Esta sección muestra los resultados de la estandarización preliminar de las condiciones de impresión con las tintas de biomaterial, establecida en el ítem 4.7 de la metodología, con el objetivo de evaluar la imprimibilidad y comparar el efecto de la adición de gelatina a la tinta de biomaterial a base de PEGDA.

En la Figura 16 se presentan los resultados de *ImpC* y error de área obtenidos a partir de las impresiones de las rejillas usando las tintas de biomaterial de PEGDA (al 10%, 20% y 30% p/v) y gelatina (al 6% p/v). Los mayores porcentajes de error de área se encontraron para las muestras T3, en donde las estructuras tuvieron un error en el área de los poros de las rejillas mayor a 55,77%, ya que el filamento es más grueso por la deposición de una tinta menos viscosa (ver Tabla 7). Asimismo, las estructuras de tintas T2 presentan poca variabilidad entre los parámetros a comparación de las otras tintas, y con ellas se obtuvo en promedio la medida más baja, un 27.76% de error. Con la tinta T1, también hay un promedio de error de 28.98% pero existen diferencias

significativas de  $p < 0.0001$  entre las comparaciones de los parámetros de impresiones como se evidencia en la tabla 6.

### Figura 16

*Resultados de imprimibilidad de las rejillas impresas con las tintas de biomaterial de diferentes concentraciones de PEGDA y gelatina.*



*Nota.* (A) Gráfica de errores de áreas para las tintas de biomaterial PEGDA y gelatina. (B) Gráfica del coeficiente de imprimibilidad de cuadrados para las tintas de biomaterial PEGDA y gelatina. Las tintas utilizadas se representan por **T1** (PEGDA 10% p/v + Gel 6% p/v), **T2** (PEGDA 20% p/v + Gel 6% p/v), **T3** (PEGDA 30% p/v + Gel 6% p/v).

Por otra parte, los datos de imprimibilidad (Figura 16B) mostraron nuevamente que la tinta T2 presenta menor variabilidad, sin ser afectada de forma significativa por los cambios de velocidad y flujo de impresión. De hecho, por el promedio del coeficiente de imprimibilidad de cuadrados (1.19), se evidencia que, con esta tinta, se logra una formación de estructuras y una morfología de filamento adecuadas. En general, los resultados revelaron que la concentración de PEGDA afectó la imprimibilidad de las estructuras; en particular, con la tinta de concentración de PEGDA al

10%p/v se extruyen filamentos en el rango adecuado (0.94), mientras que con las de PEGDA al 30% p/v se presentó sub-gelación (0.72).

**Tabla 6**

*Diferencias significativas de los resultados de ImpC y error de área*

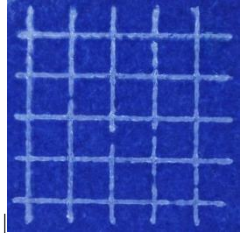
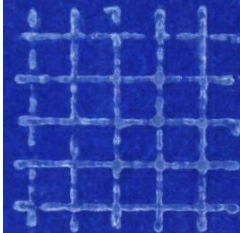
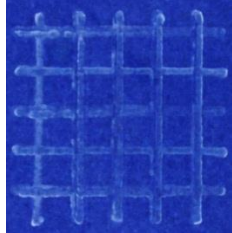
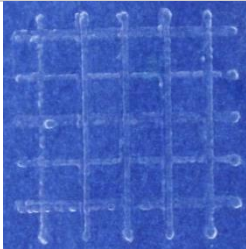
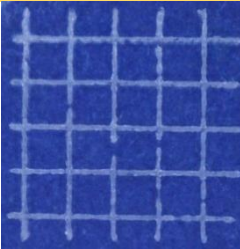
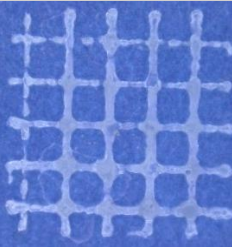
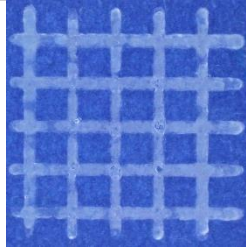
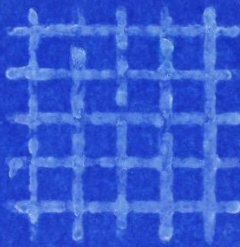
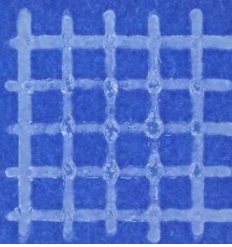
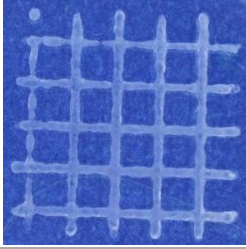
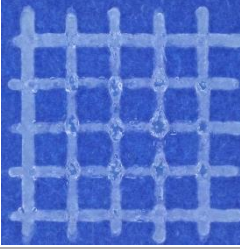
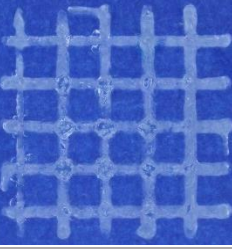
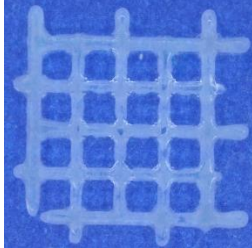
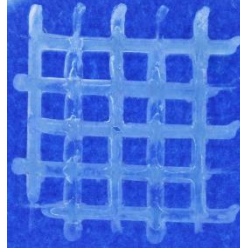
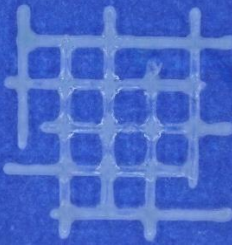
	Error de área			ImpC		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
150_2 vs. 250_2	****	ns	ns	****	ns	ns
150_2 vs. 350_2	ns	*	**	ns	ns	****
150_2 vs. 150_5	ns	**	ns	ns	*	ns
150_2 vs. 250_5	ns	ns	ns	****	*	*
150_2 vs. 350_5	****	ns	****	****	ns	****
250_2 vs. 350_2	****	ns	ns	**	ns	***
250_2 vs. 150_5	****	ns	ns	****	*	ns
250_2 vs. 250_5	**	ns	ns	ns	*	ns
250_2 vs. 350_5	ns	ns	**	ns	ns	**
350_2 vs. 150_5	ns	ns	**	*	ns	****
350_2 vs. 250_5	ns	ns	ns	ns	ns	**
350_2 vs. 350_5	****	ns	ns	****	ns	ns
150_5 vs. 250_5	**	ns	ns	****	ns	**
150_5 vs. 350_5	****	ns	****	****	ns	****
250_5 vs. 350_5	****	ns	ns	**	ns	*

*Nota:* Las diferencias estadísticas se presentan con \*\*\*\* (para  $p < 0.0001$ ), \*\*\* (para  $p < 0,0002$ ), \*\* (para  $p < 0.0021$ ), \* (p para  $< 0.332$ ) y ns (p para  $< 0.1234$ ).

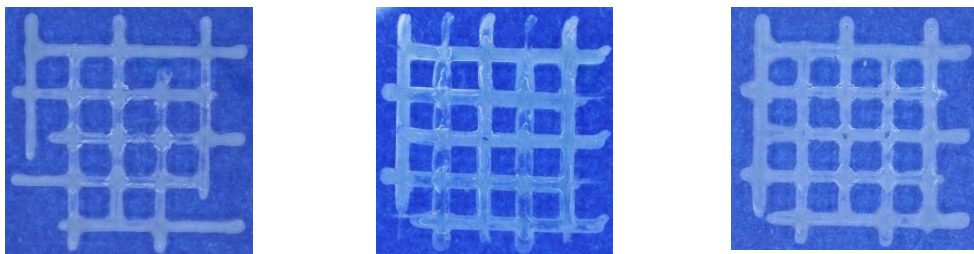
En la Tabla 7 se incluyen fotos representativas de las estructuras impresas con los mejores parámetros de impresión para cada criterio de imprimibilidad de las tintas de biomaterial en estudio (T1, T2 y T3), en orden descendente de izquierda a derecha. Esta selección se realizó identificando los errores de área menores y *ImpC* que se encuentren más cercanos al rango ideal (0.9 a 1.1).

**Tabla 7**

*Estandarización preliminar de las condiciones de impresión de PEGDA y gelatina.*

	<i>1er parámetro</i>	<i>2do parámetro</i>	<i>3er parámetro</i>
	<b>PEGDA 10% p/v + Gel 6% p/v</b>		
<i>Parámetro</i>	<b>350% &amp; 2 mm/s</b>	<b>250% &amp; 5 mm/s</b>	<b>150% &amp; 2 mm/s</b>
<i>Imprimibilidad de cuadrado</i>			
<i>Parámetro</i>	<b>150% &amp; 5 mm/s</b>	<b>350% &amp; 2 mm/s</b>	<b>350% &amp; 5 mm/s</b>
<i>Error de área</i>			
	<b>PEGDA 20% p/v + Gel 6% p/v</b>		
<i>Parámetro</i>	<b>250% &amp; 2 mm/s</b>	<b>150% &amp; 2 mm/s</b>	<b>350% &amp; 2 mm/s</b>
<i>Imprimibilidad de cuadrado</i>			
<i>Parámetro</i>	<b>150% &amp; 5 mm/s</b>	<b>350% &amp; 2 mm/s</b>	<b>350% &amp; 5 mm/s</b>
<i>Error de área</i>			
	<b>PEGDA 30% p/v + Gel 6% p/v</b>		
<i>Parámetro</i>	<b>350% &amp; 5 mm/s</b>	<b>350% &amp; 2 mm/s</b>	<b>250% &amp; 5 mm/s</b>
<i>Imprimibilidad de cuadrado</i>			
<i>Parámetro</i>	<b>250% &amp; 5 mm/s</b>	<b>350% &amp; 2 mm/s</b>	<b>350% &amp; 5 mm/s</b>

Error de área



*Nota:* Se resalta en color amarillo la combinación de parámetros que tienen en común los dos criterios de imprimibilidad.

A partir de la Tabla 8, se determinan los parámetros de impresión que se encuentran en común entre los mejores según los criterios de imprimibilidad para las tintas de biomaterial T1, T2 y T3, obteniendo la combinación de flujo a 350% y velocidad a 2 mm/s. Para estos parámetros, en el error de área se obtuvieron valores de 14.937, 21.49274 y 46.79796%, y en ImpC 1.04963, 1.22397 y 1.06146, en las tintas T1, T2 y T3, respectivamente.

Teniendo en cuenta lo planteado en la metodología en cuanto a continuidad del filamento impreso en las rejillas, presentado en el ítem 4.6, y en el anterior resultado, se registró el conteo de filamentos formados en las estructuras impresas con 350% de flujo y 2 mm/s de velocidad, en la Tabla 8. Estos resultados indican que T2, es la solución que mayor cantidad de filamentos forma, mientras que en las construcciones con la tinta de T3, se evidencio la menor formación de filamentos continuos.

**Tabla 8** Continuidad de filamento

	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>
<i>T1</i>	7.66666667	2.081665999
<i>T2</i>	10	0
<i>T3</i>	2.33333333	2.516611478

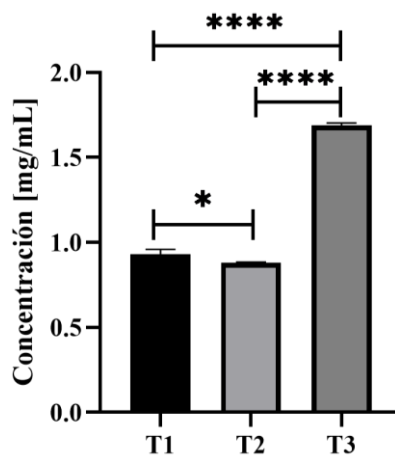
### 5.1.6 Estudio preliminar de liberación de gelatina: Impresiones

Se realizó un estudio de liberación de gelatina en estructuras impresas, basado en el ítem 4.7 de la metodología expuesta, con el propósito de comprobar que efectivamente la gelatina se liberó después de que los hidrogeles impresos se hinchen, y así corroborar con la medición de concentración de proteínas que, tanto en la fabricación de hidrogeles como en su impresión, la gelatina después de hinchamiento ya no hace parte de la estructura final. Los discos utilizados para la prueba se imprimieron con los parámetros de extrusión elegidos en el resultado anterior (350% de flujo y 2 mm/s de velocidad).

Cuando se evalúa la concentración proteica en discos impresos (Figura 17), se presentan diferencias significativas al comparar las muestras T1 y T2 con la T3 ( $p > 0.0001$ ), la cual presenta una mayor concentración, en promedio 1.6876 mg/mL. Las muestras T1 y T2 se mantienen con una diferencia significativa menor ( $p < 0.05$ ) y valores de concentración de 0.929 mg/mL y 0.880 mg/mL, respectivamente. Lo que permite inferir que existió una liberación de proteínas de los discos impresos bajo las condiciones de temperatura y tiempo especificadas, como se esperaba según los resultados obtenidos en los hidrogeles fabricados anteriormente.

**Figura 17**

*Liberación de la gelatina contenida en los hidrogeles impresos.*





*Nota.* Las tintas utilizadas se representan por **T1** (PEGDA 10% p/v + Gel 6% p/v), **T2** (PEGDA 20% p/v + Gel 6% p/v), **T3** (PEGDA 30% p/v + Gel 6% p/v), **C1** (PEGDA 10% p/v), **C2** (PEGDA 20% p/v), **C3** (PEGDA 30% p/v). Las diferencias estadísticas de  $p < 0.0001$  se simbolizan con \*\*\*\*, y \* para  $p = 0.0492$ .

### **5.1.7 Preparación de la tinta de biomaterial con PRP**

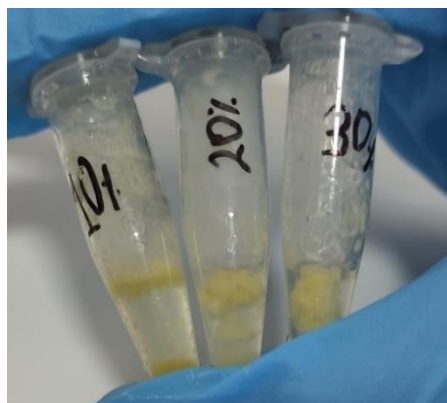
Debido a la baja viscosidad del PEGDA y las limitaciones sobre la cantidad del polímero almacenado en el laboratorio, se estableció una estandarización preliminar con gelatina al 6% p/v (ThA elegido) y otra con PEGDA y gelatina para conocer el efecto de los parámetros de impresión en el comportamiento de las tintas y tener una percepción de cuáles serían los adecuados para obtener estructuras con mayor imprimibilidad.

Después de esta estandarización, se procedió a la preparación de las tintas de biomaterial con adición de PRP, siguiendo las especificaciones dadas en el ítem 4.2 de la metodología establecida. Esto se realizó con la finalidad de adicionar PRP en la tinta y continuar con los ensayos para determinar su efecto en la liberación de proteínas, caracterización mecánica y evaluación de la imprimibilidad de las tintas.

El PRP se adicionó a la tinta como solvente de la gelatina, es decir, remplazando la función del agua destilada. Sin embargo, al proseguir con el protocolo de mezclado, los componentes no fueron miscibles entre ellos, por lo que se apreció más de una fase en la mezcla y acumulación de PEGDA y plaquetas, como se observa en la Figura 18. Este resultado limita la obtención de una tinta de biomaterial con PRP que sea homogénea para la fabricación de hidrogeles. Por lo tanto, no fue posible realizar impresiones usando esta tinta, ya que no disponía de las características de imprimibilidad idóneas para fabricar andamios.

## Figura 18

*Mezclas de tintas de biomateriales con PEGDA (10, 20 y 30% p/v), PRP y gelatina.*



### 5.2. Análisis de Resultados

La cicatrización de las UCPD es una problemática afrontada por la ingeniería de tejidos a través de diferentes alternativas terapéuticas; sin embargo, su tratamiento continúa siendo un reto. Es por esto que se diseñó una tinta de biomaterial para potenciales aplicaciones en el desarrollo de apósitos personalizados para UCPD mediante la bioimpresión 3D.

En el presente estudio se buscó la obtención de tintas de biomaterial con PEGDA y PRP, que contaran con una imprimibilidad adecuada según parámetros de velocidad y flujo de extrusión. Además, se realizaron ensayos preliminares para la caracterización mecánica y el estudio de liberación de gelatina, con los hidrogeles fabricados con tinta de biomaterial sin PRP.

Con el fin de imprimir utilizando la tinta de biomaterial a base de PEGDA, se buscó la incorporación de un agente que aumentara la viscosidad de dicha tinta para obtener un filamento estable y uniforme al momento de ser extruido en la impresora. En primera instancia se propuso el uso del PRP como ThA; sin embargo, a pesar de alcanzar una gelación, no fue posible extruirlo a través de la boquilla. Además, no se encontraron diferencias al momento de extruir los geles formados, pues todas las mezclas de PRP y  $\text{CaCl}_2$  (0 mM, 5 mM, 20mM y 100mM) pasaron a fase



liquida al ser comprimidas por el émbolo, a pesar que se esperaba que la mezcla de PRP con una mayor concentración de  $\text{CaCl}_2$ , lograra la deposición y formación de filamentos. Esto se debe a que el aumento de rigidez permite mejoras en la obtención de filamentos (Mouser, y otros, 2016), y esta propiedad es proporcional al módulo de elasticidad, el cual aumenta a causa del incremento en la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en hidrogeles de fibrina, como lo reporta el estudio de Carr, M. E., Jr, & Carr, S. L. (Carr & Carr, 1995).

Basado en lo anterior, se reemplazó el PRP como ThA, y se escogió a la gelatina debido a que podía aumentar la viscosidad de la mezcla según la concentración agregada. La concentración final de la gelatina (6% p/v) fue elegida debido a la obtención de un filamento prolongado y uniforme en su morfología según las pruebas preliminares de formación de filamento. En la selección se consideró que esta es la formulación con mayor concentración de gelatina capaz de extruir una fibra, ya que se buscaba obtener mejor imprimibilidad en las estructuras, al aumentar la viscosidad de las tintas con el polímero PEGDA. Es importante resaltar que, si se utiliza una tinta con baja viscosidad, es decir, por debajo de su punto de gelación, la extrusión no permitiría la formación de estructuras con buena imprimibilidad; por otra parte, si se implementa una tinta con elevada viscosidad, la solución puede que se acumule en la boquilla y no se dé la formación de un filamento, tal y como se apreció en la concentración de 8% p/v de gelatina. Por lo tanto, se buscó que la gelatina al 6% p/v, permitiera un punto adecuado de gelación para la extrusión de filamentos y no formara gotas líquidas, ni grumos en la boquilla.

Debido a la incorporación de la gelatina en la tinta, se decidió utilizarla como matriz de sacrificio para lograr la capacidad de impresión y descartarla después de fotopolimerizar la estructura impresa. Para comprobar la salida del material, se realizó un estudio preliminar de liberación de gelatina, donde se pudo asumir que la razón por la que se encuentra un valor de concentración en

los hidrogeles de control PEGDA, se debe a la presencia de I2959 y PEGDA en el medio PBS, esto con base al estudio Bahney et al., donde muestran que el fotoiniciador presenta un pico de absorbancia a una longitud de onda cercana a 280 nm, asimismo, en el estudio, evaluaron una solución de PEGDA al 10% p/v, que también presenta valores de absorbancia a esta medida (Bahney, y otros, 2011). Como las proteínas, en este caso el colágeno presente en la gelatina, también absorben luz a esa longitud de onda, se puede presentar una interferencia en la información de la cuantificación de proteínas. Sin embargo, esto no es un impedimento para afirmar que, si hubo una liberación de gelatina de las estructuras, dado que los valores de concentración proteica son mayores en el PBS de las tintas de biomaterial que, en los medios de los controles.

Los resultados de la liberación de gelatina en hidrogeles e impresiones, no pueden ser comparados y analizados entre ellos, ya que se emplearon metodologías diferentes. Por esto, la discrepancia entre las escalas del eje y, de las Figuras 11 y 18, se produjo por la diferencia de masas iniciales sometidas a hinchamiento, dado que en los hidrogeles se analiza el PBS de láminas completas y en las impresiones se evalúa el medio de los cilindros con dimensiones considerablemente inferiores ( $\varnothing 8 \times 0.75$  mm), por esto en los hidrogeles se encuentra una cantidad mayor de gelatina liberada y los datos de cuantificación de estas estructuras no pueden ser comparados entre ellos.

De los resultados obtenidos en la liberación de proteínas de los hidrogeles, en relación a la concentración de PEGDA, se apreció en la Figura 11 que las tintas T1 y T2 tuvieron un decrecimiento en la liberación de proteínas al aumentar la concentración de PEGDA, esto ocurrió dado que, a mayor concentración del polímero, hay mayor reticulación en las estructuras y a su vez un tamaño de poro pequeño (Ranganathan, Joseph Bensingh, Abdul Kader, & Nayak, 2018). Sin embargo, en la concentración de 30% p/v PEGDA (T3), se obtuvo un alto valor de liberación, que

no sigue la tendencia explicada anteriormente, debido a que el valor liberado fue muy alto (8.98 mg/mL), se puede inferir que no hubo una óptima reticulación en la estructura.

Siguiendo con el comportamiento de los hidrogeles de la tinta T3 en la liberación de proteínas, se puede relacionar con la caracterización mecánica de los hidrogeles en cuanto a que, al presentarse una alta liberación de proteínas, se asumió que la estructura debía poseer un tamaño de poro grande y, por consiguiente, un módulo de compresión menor al de las formulaciones de 10 y 20% p/v PEGDA, o de valor menor al obtenido, que fue de 2645.7 kPa. Sin embargo, en cuanto a la caracterización mecánica, los hidrogeles de tinta T3 presentaron un comportamiento acorde a la alta concentración del polímero que contenían, dado que se obtuvieron módulos elásticos altos para los ensayos.

Por otro lado, en relación a los resultados de los ensayos de tracción, los módulos de los hidrogeles de PEGDA con y sin gelatina, al no tener diferencias significativas entre ellos, se infiere que los componentes agregados para obtener la tinta de biomaterial, gelatina y ácido acético, no afectan las propiedades mecánicas de los hidrogeles de PEGDA. Por tanto, la gelatina se comportó como una matriz de sacrificio, debido a que no afectó de forma significativa las propiedades mecánicas de los hidrogeles y pudo ser liberada de las estructuras construidas. El uso de la gelatina para permitir el proceso de impresión, se reporta en el artículo de Ouyang et al. donde utilizan la gelatina como una red complementaria termo-reversible, la cual estabiliza temporalmente las tintas optimizando la capacidad de impresión, y después por efecto de la incubación a 37°C, ocurre la liberación de la gelatina de las estructuras impresas foto-reticuladas (Ouyang, y otros, 2020).

Adicionalmente, diversos estudios han reportado la aplicación de gelatina como matriz de sacrificio para la adherencia de células a un material, tal es el caso del estudio de Ruzt et al., donde la gelatina proporciona sitios de adhesión para las células en el material PEGX, y luego de la

fotopolimerización de la estructura, la gelatina se libera por medio del hinchamiento de los hidrogeles e incubación, y se logra mantener la inmovilización de las células en las impresiones (Rutz, Hyland, Jakus, Burghardt, & Shah, 2015).

Dado que la gelatina como matriz de sacrificio es la encargada de proporcionar la capacidad de impresión de la tinta se decidió iniciar con una estandarización preliminar de condiciones de impresión con gelatina y las tintas de biomaterial PEGDA y gelatina. De los resultados se pudo inferir que la impresión por extrusión del ThA presenta un filamento con comportamiento similar a una tinta en sobre-gelación al aplicar altas velocidades (5mm/s), debido a que los valores del coeficiente  $ImpC$  están por encima del rango idóneo (0.9 - 1.1). Contrario a lo anterior, las impresiones que se llevaron a cabo a velocidades bajas, presentaron mayor tiempo de deposición, por lo tanto, mejor formación de filamento, y un comportamiento ideal. Debido a esto se esperaba que, la mezcla del ThA y PEGDA tuviera un comportamiento similar, dado que el PEGDA es un material con baja imprimibilidad y la adición de gelatina sería el factor que aporte al comportamiento reológico de la tinta, aumentando la capacidad de formar un filamento. Sin embargo, la única tinta de biomaterial que mantuvo un desempeño similar fue T2, ya que a velocidad de 2mm/s presento un  $ImpC$  ideal, mientras que, al aumentar la velocidad, la morfología de los cuadrados estuvo por encima del rango. Contrario a las tintas T1 y T3, las cuales presentan diferencias significativas frente a las variaciones de los parámetros, por ejemplo, para los parámetros de 150% flujo y 2 mm/s velocidad, la tinta T1 muestra sobre-gelación, la tinta T3 sub-gelación y la gelatina presenta una imprimibilidad idónea.

Para el indicador de porcentaje de error de área, tampoco hay semejanzas entre los resultados de la gelatina y de las tintas de biomaterial T1, T2 y T3, como se presenta en las Figuras 16 y 17, donde se encuentran valores elevados de error con gelatina, pero cuando esta se añadió a las tintas

T1 y T2, la imprimibilidad mejora, al disminuir el error en el área interna de los cuadrados. Sin embargo, en la tinta T3, se reportaron altos valores de error, debido a la formación de filamentos más gruesos por la baja viscosidad de la tinta. Cuando se tiene un alto porcentaje de error, se tiene una alta tasa de difusión, es decir, la tinta se esparce luego de ser extruida por la impresora, lo que afecta la imprimibilidad de las estructuras (He, y otros, 2016) Teniendo esto en cuenta, se puede deducir que la tinta T3, posee una mayor tasa de difusión independientemente de los parámetros de impresión usados en la fabricación de las estructuras, porque más de la mitad de los datos tienen un porcentaje de error mayor al 50%. Por lo tanto, se puede inferir que, la presencia del PEGDA en las tintas de biomaterial afecta la imprimibilidad.

De las rejillas impresas para la estandarización de las tintas de biomaterial, se pudo analizar la continuidad del filamento en la mejor combinación de parámetros de extrusión (flujo 350% y velocidad 2 mm/s), donde se apreció que la tinta T2 imprime en todas las repeticiones la totalidad de los filamentos requeridos para formar la rejilla. Relacionando lo anterior con los resultados de la evaluación de imprimibilidad, se deduce que la sinergia de parámetros para flujo mayor, velocidad menor y viscosidad adecuada de la tinta permite la continuidad del filamento en la construcción de la rejilla. Por esta razón, se resalta la importancia de analizar la imprimibilidad de una tinta utilizando más de un parámetro de evaluación, dado que si solo se evaluara desde una perspectiva no se tendría una elección integral de los parámetros de impresión a utilizar. En este estudio, se buscó evaluar la reproducción de los diseños en CAD en cuanto a sus dimensiones y morfología, ya que se consideran como los factores fundamentales que permiten sustentar la imprimibilidad de una tinta.

Elegidos los parámetros de extrusión con los que se obtuvo una imprimibilidad alta, se evaluó la liberación de gelatina en estructuras cilíndricas impresas con dichos parámetros. De estos

resultados se pudo apreciar que las tintas T1 y T2, pese a tener valores cercanos de concentración de proteínas, T2 es significativamente menor que T1; por lo que se aprecia una disminución en la liberación de gelatina al aumentar la concentración de PEGDA. Sin embargo, la tinta T3 no presentó el mismo comportamiento, dado que obtuvo un valor de concentración significativamente mayor a las otras tintas, sugiriendo que la anormalidad del resultado se pudo dar por la misma razón expuesta en la liberación de proteínas de los hidrogeles, es decir, por no ocurrió una óptima reticulación en la estructura. Debido a lo anterior, se esperaría que al incluir PRP a las tintas de biomaterial, se presentara una liberación de proteínas mayor a la apreciada en las impresiones de T1, T2 y T3.

Los experimentos de impresión con la tinta de biomaterial que incluía al PRP no se llevaron a cabo debido a la mezcla heterogénea que se formó, al intentar integrar el PRP con el PEGDA y la gelatina. Este comportamiento sugiere que se generó un tapón de fibrina que limitó la disolución de los componentes; lo cual pudo ser causado por el lisado de las plaquetas al mezclar la solución resultante en el sonicador, o al exponer la solución a una temperatura de 37 °C. Asimismo, la falta de literatura no permitió establecer la posible miscibilidad que existe entre el PEGDA, la gelatina, el PRP y el ácido acético, con el fin de reestructurar la composición de la mezcla y establecer un proceso de combinación adecuado. Algunos autores sugieren otras alternativas, como es el caso de Jain et al., quienes liofilizaron el PRP para encapsular sus factores de crecimiento en hidrogeles de PEG (Jain, y otros, 2019), el cual sería un posible enfoque para combinar este PRP con el PEGDA; no obstante, algunos estudios reportan que el proceso de liofilización de los factores presentes en el PRP podría afectar su bioactividad (Pan, y otros, 2016) (Huber, Junior, Silva, Montalvão, & Annichino-Bizzacchi, 2019), llevando a una disminución en su efectividad como posible tratamiento para las UCPD.

## Capítulo 6: Conclusiones y recomendaciones

En el presente estudio, se desarrolló el diseño de una tinta de biomaterial para potenciales aplicaciones en la fabricación de apósitos personalizados para UCPD, dado que se logró realizar impresiones con una tinta capaz de formar estructuras fiables y estables con la posibilidad de permitir la incorporación de biomoléculas que contribuyan a la regeneración de tejidos. La impresión de dicha se pudo llevar a cabo gracias a la incorporación de la gelatina al 6% p/v como ThA para aumentar la viscosidad de la mezcla, ya que se determinó que los hidrogeles de fibrina formados por PRP y  $\text{CaCl}_2$  no son aptos para su extrusión debido a que no mantienen su estado de gelación. Además, se determina que el PRP no puede ser añadido a una tinta de biomaterial de PEGDA, gelatina y ácido acético, según la metodología implementada. Por lo tanto, se recomienda investigar estrategias y/o alternativas para la integración de PRP a la tinta, ya sea modificando parámetros de protocolo, en cuanto al orden y metodología de mezclado de los componentes, o cambiando la presentación de PRP, añadiendo polvo de PRP liofilizado. Mediante los estudios de cuantificación de la proteína liberada y caracterización mecánica preliminares, se comprobó que la gelatina puede ser utilizada como una matriz de sacrificio ya que mostró evidencias de su liberación de la estructura foto-reticulada después del hinchamiento en PBS, y no afectó las propiedades mecánicas del polímero en los ensayos de tracción. Lo anterior, aumenta el potencial uso de la tinta en tratamientos para la UCPD ya que abre oportunidades para la incorporación de moléculas o células, que se puedan inmovilizar en las estructuras gracias a los sitios de adhesión brindados por la gelatina.

Por último, se concluye que el porcentaje de error y el coeficiente de formación de cuadrados son medidas fundamentales para la evaluación de la imprimibilidad de estructuras, ya que permiten valorar la fidelidad en las dimensiones y morfología con el diseño inicial. A partir de esto, se

determina la combinación de parámetros 350% de flujo y 2 mm/s de velocidad como la más idónea, según los indicadores de imprimibilidad, para todas las tintas de biomaterial elaboradas. Sin embargo, se destaca que, con el fin de mejorar la capacidad de impresión de las tintas, deben implementarse más factores de evaluación para desarrollar una perspectiva integral del efecto de los parámetros de impresión en la resolución del proceso, y así obtener impresiones adecuadas para cumplir con la fabricación de apósitos personalizados a las UCPD.



## Referencias

- Alavi , A., Sibbald, R., Mayer, D., Goodman, L., Botros, M., Armstrong, D., . . . Kirsner, R. (2014). Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention. *Journal of the American Academy of Dermatology*. doi:10.1016/j.jaad.2013.06.055
- Alexiadou, K., & Doupis, J. (2012). Management of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*. doi:10.1007/s13300-012-0004-9
- Amable, P. R., Carias, R. B., Teixeira, M. V., da Cruz Pacheco, I., Corrêa do Amaral, R. J., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2013). Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem cell research & therapy*. doi:10.1186/scrt218
- Armstrong, D., Boulton , A., & Bus, S. (2017). Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *The New England journal of medicine*. doi:10.1056/NEJMra1615439
- Bahney, C. S., Lujan, T. J., Hsu, C. W., Bottlang, M., West, J. L., & Johnstone, B. (2011). Visible light photoinitiation of mesenchymal stem cell-laden bioresponsive hydrogel. *European cells & materials*. doi:10.22203/ecm.v022a04
- Carr, M. E., & Carr, S. L. (1995). Fibrin structure and concentration alter clot elastic modulus but do not alter platelet mediated force development. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. doi:10.1097/00001721-199502000-00013
- Chung, J., Naficy, S., Yue, Z., Kapsa, R., Quigley, A., Moulton, S. E., & Wallace, G. G. (2013). Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials science*. doi:10.1039/c3bm00012e
- Conde-Montero, E., de la Cueva Dobao, P., & Martínez González, J. (2017). Platelet-rich plasma for the treatment of chronic wounds: evidence to date. *Chronic Wound Care Management and Research*. doi:https://doi.org/10.2147/CWCMR.S118655
- Deuel, T. F., & Chang, Y. (2014). Growth factors. In R. Lanza, R. Langer, & J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering* (pp. 291 - 308). doi:10.1016/b978-0-12-398358-9.00016-1
- Frost, B. A., Sutliff, B. P., Thayer, P., Bortner, M. J., & Foster, E. J. (2019). Gradient poly (ethylene glycol) diacrylate and cellulose nanocrystals tissue engineering composite scaffolds via extrusion bioprinting. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. doi:10.3389/fbioe.2019.00280
- Game, F., Apelqvist, J., Attinger, C., Hartemann, A., Hinchliffe, R., Löndahl, M., . . . Jeffcoate, W. (2016). Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26344936/>

- Gao, X., Gao, L., Groth, T., Liu, T., He, D., Wang, M., . . . Zhao, M. (2019). Fabrication and properties of an injectable sodium alginate/PRP composite hydrogel as a potential cell carrier for cartilage repair. *Journal of biomedical materials research. Part A*. doi:10.1002/jbm.a.36720
- Groll, J., Boland, T., Blunk, T., Burdick, J. A., Cho, D. W., Dalton, P. D., & Malda, J. (2016). Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*. Retrieved from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/8/1/013001>
- Groll, J., Burdick, J., Cho, D.-W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S., . . . Woodfield, T. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*. doi:10.1088/1758-5090/aaec52
- Gungor-Ozkerim, P., Inci, I., Zhang, Y., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*. doi:10.1039/c7bm00765e
- He, Y., Yang, F., Zhao, H., Gao, Q., Xia, B., & Fu, J. (2016). Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Scientific reports*. doi:10.1038/srep29977
- Hicks, C., Canner, J., Mathioudakis, N., Lippincott, C., Sherman, R., & Abularrage, C. (2020). Incidence and Risk Factors Associated With Ulcer Recurrence Among Patients With Diabetic Foot Ulcers Treated in a Multidisciplinary Setting. *The Journal of surgical research*. doi:10.1016/j.jss.2019.09.025
- Hong, N., Yang, G.-H., Lee, J., & Kim, G. (2017). 3D bioprinting and its in vivo applications. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28106947/>
- Huber, S. C., Junior, J., Silva, L. Q., Montalvão, S., & Annichino-Bizzacchi, J. M. (2019). Freeze-dried versus fresh platelet-rich plasma in acute wound healing of an animal model. *Regenerative medicine*. doi:<https://doi.org/10.2217/rme-2018-0119>
- International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas* (9th ed.). Brussels, Belgium. Retrieved from <https://www.diabetesatlas.org/en/>
- Jain, E., Chinzei, N., Blanco, A., Case, N., Sandell, L., Sell, S., . . . Zustiak, S. (2019). Platelet-Rich Plasma Released From Polyethylene Glycol Hydrogels Exerts Beneficial Effects on Human Chondrocytes. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. doi:10.1002/jor.24404
- Jain, E., Sheth, S., Dunn, A., Zustiak, S., & Sell, S. (2017). Sustained release of multicomponent platelet-rich plasma proteins from hydrolytically degradable PEG hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28865187/>
- Jo, C. H., Roh, Y. H., Kim, J. E., Shin, S., & Yoon, K. S. (2013). Optimizing Platelet-Rich Plasma Gel Formation by Varying Time and Gravitational Forces During Centrifugation. *Journal of Oral Implantology*. doi:10.1563/AAID-JOI-D-10-00155

- Joas, S., Tovar, G., Celik, O., Bonten, C., & Southan, A. (2018). Extrusion-Based 3D Printing of Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels Containing Positively and Negatively Charged Groups. *Gels (Basel, Switzerland)*. doi:<https://doi.org/10.3390/gels4030069>
- Li, H., Ma, T., Zhang, M., Zhu, J., Liu, J., & Tan, F. (2018). Fabrication of sulphonated poly(ethylene glycol)-diacrylate hydrogel as a bone grafting scaffold. *Journal of materials science. Materials in medicine*. doi:10.1007/s10856-018-6199-1
- Li, Z., Zhang, X., Yuan, T., Zhang, Y., Luo, C., Zhang, J., . . . Fan, W. (2020). Addition of Platelet-Rich Plasma to Silk Fibroin Hydrogel Bioprinting for Cartilage Regeneration. *Tissue engineering. Part A*. doi:10.1089/ten.TEA.2019.0304
- Liang, J., Guo, Z., Timmerman, A., Grijpma, D., & Poot, A. (2018). Enhanced mechanical and cell adhesive properties of photo-crosslinked PEG hydrogels by incorporation of gelatin in the networks. *Biomedical Materials*. Retrieved from <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/aaf31b/meta>
- Luo, Y., Engelmayr, G., Auguste, D., Ferreira, L., Karp, J., Saigal, R., & Langer, R. (2014). 3D Scaffolds. In R. Lanza, R. Langer, & J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering* (4 ed., pp. 475 - 494). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00024-0>
- Maione, A., Smith, A., Kashpur, O., Yanez, V., Knight, E., Mooney, D., . . . Garlick, J. (2016). Altered ECM deposition by diabetic foot ulcer-derived fibroblasts implicates fibronectin in chronic wound repair. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27102877/>
- Marinel.lo Roura, J., & Verdú Soriano, J. (2018). *Conferencia nacional de consenso sobre las úlceras de la extremidad inferior (C.O.N.U.E.I.)* (2da Edición ed.). Madrid, Ergon, España. Retrieved from <https://gneaupp.info/wp-content/uploads/2018/04/CONUEIX2018.pdf>
- Mazzucco, L., Balbo, V., Cattana, E., & Borzini, P. (2008). Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex®. *Vox sanguinis*. doi:10.1111/j.1423-0410.2007.01027.x
- Mehta, S., & Watson, J. (2008). Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *Journal of orthopaedic trauma*. doi:10.1097/BOT.0b013e31817e793f
- Miraftab, M., Smart, G., Kennedy, J. F., Knill, C. J., Mistry, J., & Grocock, M. R. (2006). Novel chitosan-alginate fibres for advanced wound dressings. *Medical Textiles and Biomaterials for Healthcare*. doi:10.1533/9781845694104.1.37
- Mouser, V., Melchels, F., Visser, J., Dhert, W., Gawlitta, D., & Malda, J. (2016). Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication*. doi:10.1088/1758-5090/8/3/035003
- Murray, M. M., Spindler, K. P., Abreu, E., Muller, J. A., Nedder, A., Kelly, M., . . . Connolly, S. A. (2007). Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine

- anterior cruciate ligament. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. doi:10.1002/jor.20282
- Naghieh, S., & Chen, D. (2021). Printability – a Key Issue in Extrusion-based Bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001
- Naghieh, S., Sarker, M., Sharma, N., Barhoumi, Z., & Chen, X. (2020). Printability of 3D Printed Hydrogel Scaffolds: Influence of Hydrogel Composition and Printing Parameters. *Applied Sciences*. doi:https://doi.org/10.3390/app10010292
- Nemir, S., Hayenga, H. N., & West, J. L. (2010). PEGDA Hydrogels With Patterned Elasticity: Novel Tools for the Study of Cell Response to Substrate Rigidity. *Biotechnology and bioengineering*. doi:10.1002/bit.22574
- Ortiz-Vargas, I., García-Campos, M. L., Beltrán-Campos, V., Gallardo-López, F., Sánchez-Espinosa, A., & Montalvo, M. E. (2017). Cura húmeda de úlceras por presión. Atención en el ámbito domiciliar. *Enfermería universitaria*. doi:14(4), 243-250
- Ouyang, L., Armstrong, J., Lin, Y., Wojciechowski, J. P., Lee-Reeves, C., Hachim, D., . . . Stevens, M. M. (2020). Expanding and optimizing 3D bioprinting capabilities using complementary network bioinks. *Science advances*. doi:10.1126/sciadv.abc5529
- Ouyang, L., Highley, C. B., Sun, W., & Burdick, J. A. (2017). A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27982464/>
- Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*. doi:10.1088/1758-5090/8/3/035020
- Pan, L., Yong, Z., Yuk, K. S., Hoon, K. Y., Yuedong, S., & Xu, J. (2016). Growth Factor Release from Lyophilized Porcine Platelet-Rich Plasma: Quantitative Analysis and Implications for Clinical Applications. *Aesthetic plastic surgery*. doi:https://doi.org/10.1007/s00266-015-0580-y
- Pang, L., Wang, Y., Zheng, M., Wang, Q., Lin, H., Zhang, L., & Wu, L. (2016). Transcriptomic study of high-glucose effects on human skin fibroblast cells. *Molecular medicine reports*. doi:https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4822
- Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., & Jungst, T. (2017). Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*. doi:10.1088/1758-5090/aa8dd8
- Peters, E., Christoforou, N., Leong, K., Truskey, G., & West, J. (2016). Poly(ethylene glycol) Hydrogel Scaffolds Containing Cell-Adhesive and Protease-Sensitive Peptides Support Microvessel Formation by Endothelial Progenitor Cells. *Cellular and molecular bioengineering*. doi:10.1007/s12195-015-0423-6

- Pop, M. A., & Almquist, B. D. (2017). Biomaterials: A potential pathway to healing chronic wounds? *Experimental dermatology*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28094868/>
- Qi , M., Zhou, Q., Zeng, W., Wu, L., Zhao, S., Chen, W., . . . Tang , C.-E. (2018). Growth factors in the pathogenesis of diabetic foot ulcers. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. doi:10.2741/4593
- Qiu, M., Chen, D., Shen, C., Shen, J., Zhao, H., & He, Y. (2016). Platelet-Rich Plasma-Loaded Poly(d,l-lactide)-Poly(ethylene glycol)-Poly(d,l-lactide) Hydrogel Dressing Promotes Full-Thickness Skin Wound Healing in a Rodent Model. *International journal of molecular sciences*. doi:10.3390/ijms17071001
- Ranganathan, N., Joseph Bensingh, R., Abdul Kader, M., & Nayak, S. (2018). Synthesis and Properties of Hydrogels Prepared by Various Polymerization Reaction Systems. In *Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Springer, Cham. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0\\_18-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_18-1)
- Rodríguez Flor, J., Palomar Gallego, M., & García-Denche, J. (2012). Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Revista Española de cirugía oral y maxilofacial*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.maxilo.2011.10.007>
- Rutz, A. L., Hyland, K. E., Jakus, A. E., Burghardt, W. R., & Shah, R. N. (2015). A Multimaterial Bioink Method for 3D Printing Tunable, Cell-Compatible Hydrogels. *Advanced Materials*. doi:<https://doi.org/10.1002/adma.201405076>
- Sadeghi-Ataabadi, M., Mostafavi-pou, Z., Vojdani, Z., Sani, M., Latifi, M., & Talaei-Khozan, T. (2016). Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering application. *Materials Science & Engineering C*. doi:10.1016/j.msec.2016.10.001
- Samberg, M., Stone II, R., Natesan, S., Kowalczewski, A., Becerra, S., Wrice, N., & Christy, R. (2019). Platelet rich plasma hydrogels promote in vitro and in vivo angiogenic potential of adipose-derived stem cells. *Acta biomaterialia*. doi:10.1016/j.actbio.2019.01.039
- Samberg, M., Stone, R. 2., Kowalczewski, A., Becerra, S., Wrice, N., Cap, A., & Christy, R. (2019). Platelet rich plasma hydrogels promote in vitro and in vivo angiogenic potential of adipose-derived stem cells. *Acta biomaterialia*. doi:10.1016/j.actbio.2019.01.039
- Somasekharan, L. T., Kasoju, N., Raju, R., & Bhatt, A. (2020). Formulation and Characterization of Alginate Dialdehyde, Gelatin, and Platelet-Rich Plasma-Based Bioink for Bioprinting Applications. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*. doi:10.3390/bioengineering7030108
- Tan, C. T., Liang, K., Ngo, Z. H., Dube, C. T., & Lim, C. Y. (2020). Application of 3D Bioprinting Technologies to the Management and Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Biomedicines*. doi:<https://doi.org/10.3390/biomedicines8100441>

- Tan, C. T., Liang, K., Ngo, Z. H., Dube, C. T., & Lim, C. Y. (2020). Application of 3D Bioprinting Technologies to the Management and Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Biomedicines*, 8. doi:<https://doi.org/10.3390/biomedicines8100441>
- Tan, F., Xu, X., Deng, T., Yin, M., Zhang, X., & Wang, J. (2012). Fabrication of positively charged poly(ethylene glycol)-diacrylate hydrogel as a bone tissue engineering scaffold. *Biomedical materials*. doi:<https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/5/055009>
- Uccioli, L., Izzo, V., Meloni, M., Vainieri, E., Ruotolo, V., & Giurato, L. (2015). Non-healing foot ulcers in diabetic patients: general and local interfering conditions and management options with advanced wound dressings. *Journal of wound care*. doi:10.12968/jowc.2015.24.Sup4b.35
- Williams, D., Thayer, P., Martinez, H., Gatenholm, E., & Khademhosseini, A. (2018). A Perspective on the Physical, Mechanical and Biological Specifications of Bioinks and the Development of Functional Tissues in 3D Bioprinting. *Bioprinting*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2018.02.003>
- Yang, J., Olanrele, O., Zhang, X., & Hsu, C. (2018). Fabrication of Hydrogel Materials for Biomedical Applications. *Advances in experimental medicine and biology*. doi:10.1007/978-981-13-0947-2\_12
- Zhang, B., Cristescu, R., Chrisey, D., & Narayan, R. (2020). Solvent-based Extrusion 3D Printing for the Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds. *International journal of bioprinting*. doi:10.18063/ijb.v6i1.211
- Zhang, X., Yang, D., & Nie, J. (2008). Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential. *International journal of biological macromolecules*.
- Zhang, Z., Jin, Y., Yin, J., Xu, C., Xiong, R., Christensen, K., . . . Ringeisen, B. (2018). Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Applied Physics Reviews*. doi:<https://doi.org/10.1063/1.5053979>