



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
IMPRESIÓN 3D PARA LA REGENERACIÓN
ÓSEA

Autor: Elena Gemenó López

Fecha: Junio 2019

Tutor: María Victoria Cabañas Criado

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
2.1 Introducción.....	3
2.2 Estructura del hueso.....	4
2.3 Características de los biomateriales y andamios para la regeneración ósea	5
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
5.1 Impresión 3D	8
5.2 Componentes y fabricación de andamios	11
6. CONCLUSIÓN	18
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1. RESUMEN

La pérdida de capacidad de regeneración ósea debida a la edad, ligada al aumento de la esperanza de vida, ha generado un auge en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de patologías óseas. Los problemas planteados por autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos pueden superarse gracias a la impresión 3D. Diferentes biomateriales y combinaciones de los mismos pueden utilizarse para fabricar andamios (soportes o *scaffolds*) por impresión 3D que mimeticen al máximo posible la estructura y propiedades fisiológicas del hueso. En este trabajo se explican algunas de las técnicas de impresión 3D utilizadas para la fabricación de soportes para la regeneración del hueso. También se presentan algunos materiales cerámicos como la hidroxiapatita, o poliméricos como el colágeno o la policaprolactona, así como combinaciones de los mismos. Del mismo modo se incluyen ejemplos de distintos andamios con otro tipo de sustancias, sustancias biológicas, como factores de crecimiento o células que ayudan a simular la estructura ósea nativa y favorecen enormemente la formación ósea. Por último, se incluye un ejemplo de propiedades añadidas que puede tener el andamio si se incluyen en él fármacos que prevengan las infecciones óseas.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Introducción

El aumento de la esperanza de vida, causado entre otros motivos por los avances médicos en el último siglo (1), ha hecho que la capacidad de regeneración del hueso se vea gradualmente comprometida. Por ello, personas mayores de 85 años tienen una probabilidad al menos 10 veces mayor de sufrir una fractura ósea que las personas en un rango de edad entre 60 y 65 años (2). Es por ello que existe un aumento de la demanda de los tratamientos relacionados con patologías óseas, como se puede confirmar a través de los datos que postulan al hueso como el segundo tejido más trasplantado tras la sangre (3).

Existen múltiples opciones para obtener el material que va a reemplazar el hueso entre las que se encuentra como "*gold standard*" o "*estándar de oro*" el autoinjerto (3), consistente en utilizar hueso del propio paciente. El autoinjerto posee propiedades de osteogénesis (formación del hueso), osteoinducción (inducción de la diferenciación de células madre progenitoras en osteoblastos) y osteoconducción (capacidad de guiar el crecimiento del hueso) así como una baja capacidad antigénica (4). Si bien es cierto que la obtención del autoinjerto requiere un procedimiento quirúrgico, lo que aumenta el riesgo para el paciente y la cantidad de hueso extraída puede no ser suficiente (5). También podemos encontrar los aloinjertos o injertos alogénicos, que se obtienen de otros individuos de la misma especie, y los xenoinjertos, que se obtienen de individuos de otras especies. Estos injertos presentan algunas ventajas como una mayor cantidad de injerto disponible y menor invasividad ya que el paciente no tiene que ser intervenido. Pero también existen una serie de desventajas a tener en cuenta: no existe capacidad osteogénica, el injerto puede ser rechazado por el paciente, puede existir una transmisión de enfermedades y puede haber infección bacteriana (5-7). Por último, entre los materiales disponibles para reemplazar el tejido óseo encontramos los injertos aloplásticos que son biomateriales sintéticos que se desarrollaron con el objetivo de

evitar las desventajas de los injertos anteriores (8). Este campo de investigación es muy amplio y se encuentra altamente activo.

2.2 Estructura del hueso

Los mejores biomateriales para la regeneración ósea son aquellos que mejor mimetizan la estructura, propiedades y formación del hueso. Para poder evaluarlos correctamente y entender sus ventajas y desventajas primero es necesario entender cómo es la estructura y formación del hueso.

El hueso es un tejido que se encuentra en constante remodelación, es decir, en constante reemplazo o renovación del tejido óseo más viejo. El proceso de remodelado comienza antes del nacimiento y perdura durante toda la vida (9). El equilibrio entre formación y resorción ósea debe mantenerse durante la vida adulta para evitar patologías como osteoporosis (por exceso de resorción) u osteopetrosis (por exceso de formación).

El hueso se compone principalmente de dos tipos de tejido: el hueso trabecular o esponjoso y el hueso cortical o compacto (10). El hueso cortical se encuentra en la parte más externa y zona central (diáfisis) y posee unos conductos longitudinales llamados conductos de Havers, en el interior de los cuales se sitúan los nervios y los vasos sanguíneos que aportarán nutrientes al hueso. También posee unos canales perpendiculares llamados canales de Volkmann, que comunican los conductos de Havers entre ellos y con el exterior del hueso como se puede ver en la figura 1.

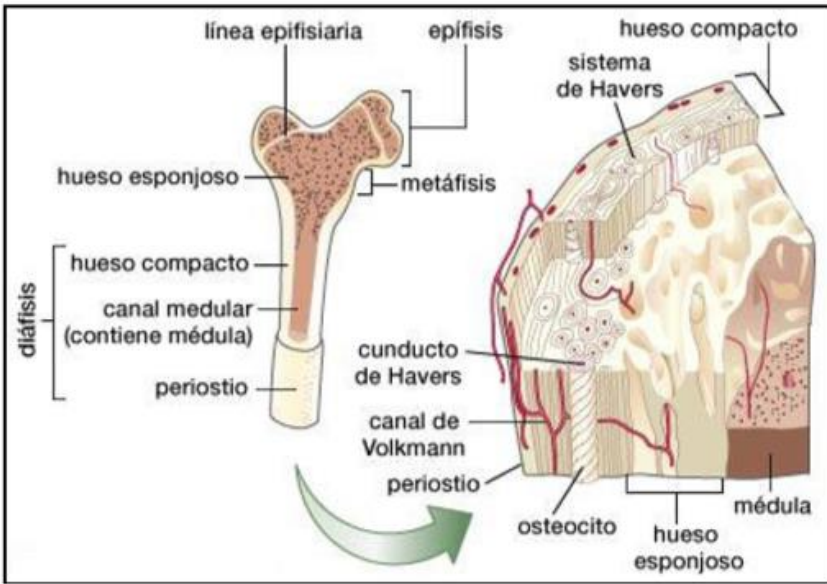


Figura 1. Estructura del hueso (12).

El tejido trabecular, sin embargo, carece de estos canales. Se sitúa en la zona interna de los huesos así como en sus extremos (epífisis). El hueso esponjoso es altamente poroso, albergando en su interior numerosos vasos sanguíneos, médula ósea y otros componentes orgánicos (11).

Existen fundamentalmente dos procesos de formación del hueso: osificación endocondral y osificación intramembranosa. Ambos procesos se inician a partir de células madre mesenquimales (MSC). Los osteoblastos proceden de estas células madre progenitoras y su diferenciación es inducida por algunas sustancias como las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) (13). Los osteoblastos secretan diferentes sustancias

que estimulan la formación del tejido. Una de las sustancias más importantes que secretan es el colágeno de tipo I. El colágeno, junto con los proteoglicanos y otras sustancias, forma el osteoide, sobre el que precipitan fácilmente las sales de calcio (14). Según se va formando el osteoide, algunos osteoblastos quedan atrapados en su interior convirtiéndose en osteocitos (11). Los osteocitos actúan como organizadores del proceso de remodelación, produciendo factores que influyen en las actividades de los osteoclastos y osteoblastos (15). Una vez formado el osteoide las sales de calcio precipitan sobre él. La hidroxiapatita (HA) es el componente de mayor proporción en la fase mineral ya que supone hasta un 70% de la composición del hueso (11). El 30% restante del hueso se compone de matriz orgánica. Esta matriz está formada entre un 90 y un 95% por colágeno. El 5% restante consiste en proteoglicanos, principalmente sulfato de condroitina y ácido hialurónico (14). Por lo tanto, el hueso es un material compuesto y sus propiedades se deben a la interacción entre sus componentes.

La continua remodelación del hueso es importante ya que el hueso viejo se vuelve más frágil y débil y al ser este sustituido por tejido nuevo, se mantiene la dureza normal del hueso (14), que disminuirá las posibles fracturas del mismo. Esta renovación se lleva a cabo en cinco fases. La primera de ellas es la fase de reposo. La segunda fase es la de activación de la remodelación en la que los osteoclastos (células fagocitarias, grandes y multinucleadas) son reclutados a la superficie del hueso. La tercera fase consiste en la resorción, en la que los osteoclastos disuelven el contenido mineral del hueso. La cuarta fase es la de inversión, en la que los osteoclastos entran en apoptosis y los osteoblastos son reclutados a la superficie del hueso. Y por último la quinta fase, la fase de formación, en la que los osteoblastos depositan colágeno (16). Los osteoblastos y osteoclastos se organizan en unidades multicelulares básicas temporales durante este proceso (17). Además, existe una comunicación directa e indirecta entre las células del hueso (15). El hueso que se va formando en la última fase a partir de los osteoblastos se dispone en sucesivas capas concéntricas llamadas laminillas alrededor de los conductos de Havers hasta que su crecimiento comienza a invadir los vasos sanguíneos que estos albergan (14).

2.3 Características de los biomateriales y andamios para la regeneración ósea

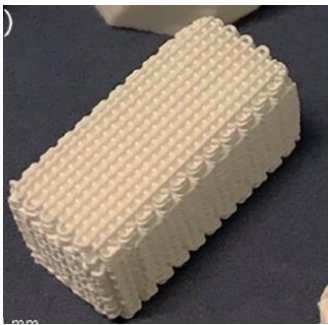
Los biomateriales que se van a emplear para la regeneración ósea deben cumplir una serie de características básicas para poder ser introducidos en el organismo y, además, deben favorecer la regeneración ósea.

En primer lugar todos los biomateriales deben ser biocompatibles. La biocompatibilidad se define como la falta o mínima respuesta antigénica del organismo frente al material implantado, motivo por el cual es propiedad indispensable en la elección del material (18). En segundo lugar, los biomateriales no deben ser tóxicos, teratógenos ni cancerígenos.

Además, el diseño y la forma deben ser los adecuados (19), y variarán en función del lugar donde vayan a ser implantados. Por otro lado, el biomaterial idóneo ha de ser bioactivo, esto es, ser capaz de unirse al tejido adyacente (osteointegración), unión que será diferente en tiempo y consistencia, así como el mecanismo y lugar donde ocurre esta unión difieren de un material a otro (20).

La reabsorción o biodegradación es una de las características más interesantes a tener en cuenta ya que va a permitir que el tejido óseo se forme y reemplace al biomaterial a medida que este se va degradando sin generar productos tóxicos (1). Hay que tener en cuenta también las características de osteoconducción y osteoinducción, es decir, la capacidad que tiene el biomaterial de estimular y guiar a las células progenitoras para diferenciarse en osteoblastos, facilitando de esta manera la formación de hueso nuevo (21).

Así mismo, su fabricación debe ser reproducible, es decir, que se pueda repetir creando un biomaterial con las mismas características. Otro factor clave es la facilidad con que se fabrique el material ya que es necesaria su producción a gran escala, motivo por el cual su disponibilidad también debe ser elevada (22). Del mismo modo el coste del biomaterial se valorará a la hora de introducirlo en la práctica clínica (23). Que sea estéril o que se pueda esterilizar es otro punto clave a la hora de elegir materiales (21).



El biomaterial ideal debe ser capaz de simular las características del tejido que se quiere regenerar. Con este fin se utilizan los denominados andamios, también llamados soportes o *scaffolds* (figura 2). Son estructuras tridimensionales diseñadas para mimetizar la matriz extracelular de los tejidos óseos (11). La función principal de estos andamios es servir de guía para la regeneración del hueso y facilitar el ambiente para que esta se produzca, es decir, actúan como osteoconductores (12).

Figura 2. Imagen de un soporte para regeneración ósea (24).

Los soportes van altamente ligados a la ingeniería de tejidos (figura 3) que ha sido definida por el Instituto Nacional de Imagen Biomédica y Bioingeniería de Estados Unidos como “la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales” (25). La ingeniería de tejidos, por tanto, se postula como una gran promesa en el tratamiento de defectos óseos (especialmente de aquellos de gran tamaño) gracias al avance de nuevos biomateriales, la bioimpresión 3D y la biología de las células madre entre otros (18).

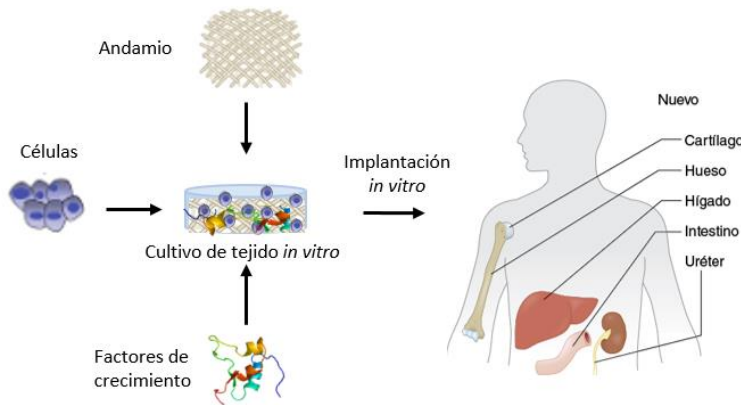


Figura 3. Esquema del proceso de la ingeniería de tejidos.

El *scaffold* ideal debe ser poroso, tener una fuerza mecánica suficiente para poder soportar el tejido óseo que crecerá sobre él y ser reabsorbible (18). La porosidad y el tamaño de poro son dos de los aspectos más críticos para la viabilidad del soporte. El tamaño de poro va a determinar la capacidad de albergar células progenitoras en su interior y la facilidad con que estas se adhieran a la estructura. La porosidad va a permitir que se creen redes interconectadas en su interior que posibiliten la vascularización y, con ella, la llegada de nutrientes y oxígeno al tejido que se está generando. Sin embargo, la cantidad y tamaño de los poros es inversamente proporcional a la resistencia mecánica de la estructura (1) por lo que es importante encontrar el equilibrio entre ambas características. Además, las propiedades mecánicas que se requieren en el material son aquellas que mejor simulen las del tejido que se va a reemplazar puesto que las células aledañas pueden responder al entorno, como es el caso de los condrocitos (23). Por otra parte, la reabsorción del soporte va a permitir que este vaya desapareciendo a medida que se crea el nuevo hueso sobre él. Es importante que la velocidad de degradación del *scaffold* y la de formación del hueso sean similares (1). La lenta degradación del andamio provoca un retraso en la regeneración ósea y si su degradación es demasiado rápida se va a producir una reparación incompleta del área.

La rugosidad de la superficie del andamio es otro factor a tener en cuenta ya que la adhesión e invasión celulares son procesos críticos para garantizar la viabilidad de la intervención siendo necesario del mismo modo que el *scaffold* sea permeable a las moléculas secretadas por las células (11).

Por último, no es una característica del biomaterial o del *scaffold* en sí pero el coste es un dato relevante a la hora de elegir qué sustancia se utilizará en el momento de imprimir estas estructuras tridimensionales, especialmente si se pretenden aplicar en la práctica clínica los avances que se producen en investigación (23).

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la bibliografía sobre el estado actual de la utilización de impresión 3D para la fabricación de andamios para la regeneración ósea, fundamentalmente qué biomateriales se están utilizando.

Igualmente, se considerará la inclusión de otros materiales biológicos como células o factores proangiogénicos que faciliten el proceso de regeneración ósea que va a tener lugar en el organismo receptor.

Además, se considerará la opción de incluir distintos fármacos durante la fabricación del andamio que favorezcan el proceso de integración del soporte en el organismo como pueden ser antibióticos para disminuir las infecciones sobre el implante que pueden provocar la retirada del mismo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado mediante una amplia revisión bibliográfica. Como principal fuente de información se han utilizado artículos y revisiones de revistas científicas, obtenidos de la base de datos MEDLINE a través del motor de búsqueda PubMed de la National Library of Medicine (NLM) y del motor de búsqueda de artículos científicos Google Académico. También se ha consultado la herramienta BUCea de la Universidad

Complutense de Madrid que contiene información de múltiples bases de datos. Por últimos, algunos artículos han sido extraídos del portal colaborativo de artículos científicos ResearchGate.

Algunas de las palabras clave empleadas fueron: *bone biology, bone tissue regeneration, 3D printing biomaterials, 3D printing techniques, tissue engineering, bone regeneration*, entre otras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Impresión 3D

Numerosas técnicas tradicionales se han utilizado para la fabricación de estructuras 3D porosas sin necesidad de impresoras. Una de esas técnicas clásicas utiliza *sustancias porógenas* para fabricarlos andamios. Para ello, se efectúa la preparación de una solución de un polímero en disolventes orgánicos junto con sustancias porógenas que se disolverán una vez formado el soporte, dando lugar a poros. Otro método tradicional es el *gas espumante* que generará los poros mediante burbujas. En tercer lugar se encuentra el método de *congelación-secado*, mediante el cual cristales solubles quedan atrapados en el interior de la estructura, siendo eliminados por sublimación para la generación de poros. En cuarto lugar el proceso de *separación de fases* consiste en separar en dos fases, una rica en polímero y otra rica en disolvente, los componentes de la mezcla mediante el uso de cambios térmicos de manera que se genere una estructura porosa. Por último, el *electrospinning* es la técnica mediante la cual se produce un hilo continuo de material gracias al uso de un campo eléctrico externo, con la ventaja de que esta técnica permite la inclusión de biomoléculas (26).

Una de las mayores desventajas de los procesos tradicionales es que no permiten controlar el tamaño de poro de los andamios, característica clave para la posterior adhesión, proliferación y diferenciación de células. Tampoco permiten controlar la geometría ni la interconectividad de los andamios (27). Estas desventajas han hecho que emerjan otras técnicas para combatirlos y es aquí donde la impresión 3D cobra una gran importancia.

La fabricación de *scaffolds* mediante la tecnología 3D implica el control de estos tres parámetros: tamaño de poro, interconectividad y geometría cuya importancia es crucial en el diseño (28). Estos parámetros pueden controlarse ya que los procesos basados en impresión 3D suelen llevarse a cabo capa por capa, bien con materiales sólidos o líquidos (26).

La impresión 3D consiste en la fabricación de un objeto, en este caso el andamio, gracias a una impresora que va superponiendo capas de material. El proceso es guiado por un modelo digital.

La impresión 3D ha supuesto grandes avances en lo que a regeneración ósea se refiere e innumerables posibilidades de mejora. Una de las grandes ventajas es que permite fabricar estructuras específicas para cada paciente (27). Se obtiene información del defecto óseo mediante distintas técnicas de biomagen como la tomografía computerizada o la resonancia magnética de alta resolución que aportarán diferentes datos para la creación tanto de su estructura externa (forma) como interna (poros y

conexiones internas) (11). Todo aquello que se vaya a imprimir en 3D por una impresora ha de ser cargado en un programa de diseño asistido por ordenador (CAD). Los modelos CAD describen los objetos 3D en capas de manera que permiten a la impresora reproducir la estructura mediante un modelo de adición, esto es, capa a capa. Estos CAD pueden ser cargados con la información obtenida de las pruebas de biomagen del paciente, con su defecto óseo concreto. Por otro lado la fabricación del andamio también se lleva a cabo a través de un programa asistido por ordenador (CAM). La CAM permite controlar parámetros como presión, temperatura, altura y velocidad de impresión (26). La impresión 3D también permite controlar la distancia entre capas y el grosor del material que se va imprimiendo (29).

Dentro de la impresión 3D existen numerosas técnicas, entre los que destacan los siguientes:

El primero (figura 4) es la deposición de material fundido (FDM, *Fused Deposition Modeling*). Consiste en la extrusión de materiales termoplásticos semifundidos en forma de filamento a través de la boquilla de la impresora. La temperatura utilizada es la necesaria para que el material, inicialmente en estado sólido, se ablande y pueda ser manejado. En ese estado, se deposita en capas que van generando el soporte. Una vez formado, se deja enfriar de manera que el material solidifica. Generalmente se imprime primero la capa externa y luego las más internas es decir, el relleno. Este es el método de bajo coste más utilizado en la impresión 3D. Tiene una buena precisión y permite la incorporación de distintos materiales utilizando un sistema de impresión de varias boquillas. Como inconveniente de cara a la bioimpresión es la necesidad de elevar la temperatura hasta que el material sea viscoso. Además, dado el alto grado de control que se puede ejercer sobre este método los andamios porosos que se sintetizan presentan una buena resistencia mecánica (30).

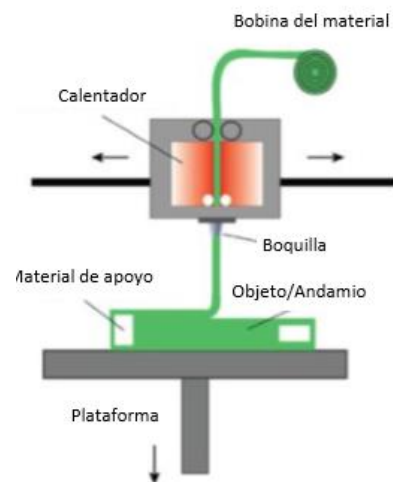


Figura 4. Impresión 3D por deposición de material fundido (FDM) (27).

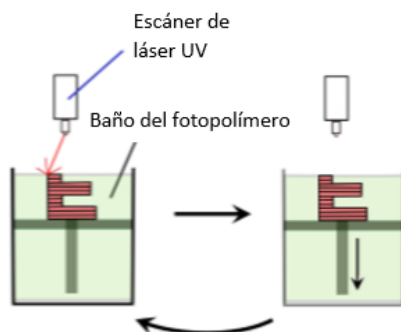


Figura 5. Impresión 3D por estereolitografía (SLA) (11).

El segundo es el llamado estereolitografía (SLA). Esta técnica se encuadra dentro de las conocidas como fotopolimerización del tanque (figura 5). Consiste en un tanque lleno de material fotosensible bien en estado líquido o bien en estado viscoso. Sobre él, un láser va actuando de tal manera que las zonas sobre las que se aplica se van endureciendo. Una vez se ha formado la capa más inferior la bandeja sobre la que se está sintetizando el andamio baja, quedando esta primera capa cubierta de nuevo por el material fotosensible que no ha entrado en contacto con el láser (y por tanto permanece sin solidificar). De este modo, capa a capa, se va fabricando el soporte a medida que el láser endurece el material a

conveniencia. Su uso no está muy extendido debido a la baja disponibilidad de materiales fotosensibles en el mercado (11). Este método se caracteriza por tener una excelente precisión y un coste elevado, suponiendo además una ventaja de cara a la bioimpresión que no sea necesario el uso de altas temperaturas (31).

El tercero (figura 6) es el llamado proceso de sinterización selectiva por láser (SLS, *Selective laser sintering*). Se parte de material en polvo y se eleva, mediante un láser, la temperatura lo suficiente como para que las partículas se sintericen pero no para que se fundan. En muchas ocasiones, para acelerar el proceso y disminuir el uso del láser, se sitúa la impresora en una cámara cerrada con unos determinados ajustes de temperatura cercanos al punto de fusión. El tamaño de las partículas del polvo es de vital importancia puesto que los microporos son creados a partir de los espacios vacíos entre estas partículas. La ausencia de fusión durante el proceso constituye otro punto clave. Los materiales que mejor se adaptan a este método son los polímeros con bajo punto de fusión (11). Su precisión es buena, su coste elevado y de nuevo la temperatura supone un obstáculo para la bioimpresión (31).

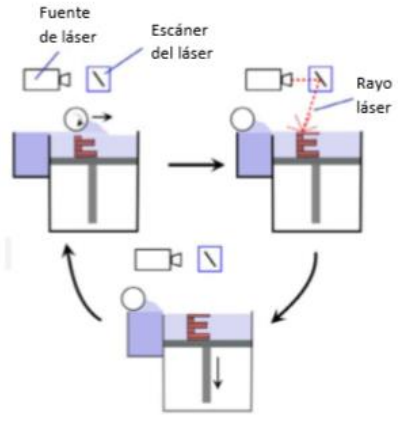


Figura 6. Impresión 3D por sinterización selectiva por láser (SLS) (11).

Las técnicas de impresión 3D permiten controlar parámetros críticos como la porosidad e interconectividad del andamio pero, ya que su objetivo es imitar lo mejor posible la estructura natural del hueso, es necesario ir un paso más allá. Esto implica la introducción en la impresión de otras sustancias que pueden ser de gran utilidad en el implante como son factores de crecimiento, incluyendo la BMP; factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o incluso células, lo que se conoce como bioimpresión (32). Esto ha supuesto un inmenso avance en la ingeniería de tejidos y especialmente en el ámbito de la regeneración ósea ya que la presencia de estos factores y células constituye un gran potencial para la creación de tejido funcional (33). Para llevar a cabo la inclusión de alguna de estas moléculas biológicas es necesario que la técnica empleada tenga algunas características especiales como no necesitar elevar la temperatura durante el proceso ya que podría dañar estas sustancias.

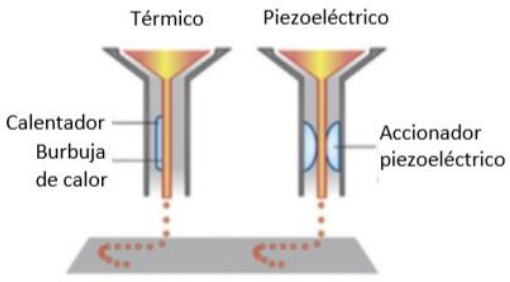


Figura 7. Bioimpresión 3D por inyección de tinta (1).

Una de las técnicas más ampliamente empleadas en la impresión 3D es la que se conoce como bioimpresión de inyección de tinta (*inkjet bioprinting*), que podemos ver en la figura 7. Existen cuatro métodos dentro de este tipo de bioimpresión, que son: térmico, piezoeléctrico, acústico y electroacústico, destacando los dos primeros. El proceso térmico utiliza temperatura para generar presión, la cual va a expulsar una gota de "tinta" gracias a las

burbujas generadas. El sistema piezoeléctrico se basa en el uso de descargas eléctricas para la generación de la presión que provoca la salida de la gota. Los voltajes utilizados pueden afectar a la viabilidad de las células por lo que el método térmico es más adecuado para la bioimpresión (32). La inyección de tinta es un método de impresión económico, eficiente, de alta disponibilidad y velocidad de impresión, pues consiste en una modificación de las impresoras que se usan habitualmente en casa (26).

5.2 Componentes y fabricación de andamios

Existen distintos tipos de biomateriales que se han utilizado para fabricar *scaffolds* y que se pueden reformular y adaptar para su impresión 3D. El biomaterial se elegirá en función de la localización del daño y, por tanto, según el tipo de tejido que se quiera sustituir, así como del método de impresión que se vaya a utilizar (1). Los biomateriales utilizados para la regeneración ósea se pueden clasificar en función de su composición química en polímeros, cerámicas, metales y compuestos (o *composites*). Dentro de los polímeros, se puede diferenciar entre aquellos de origen natural, como el colágeno, y aquellos de origen sintético, como el ácido poliláctico. Las cerámicas también se pueden subdividir en aquellas cuya composición se basa en fosfatos de calcio (como la hidroxiapatita), silicatos (como vidrios sol-gel y vitrocerámicas) y otras (como la alúmina). En el grupo de los metales se pueden encontrar desde titanio y aleaciones del mismo hasta acero inoxidable. Por último, los materiales compuestos son aquellos que están formados por más de un material del mismo o distinto grupo y que interactúan entre sí, como el fosfato de calcio recubierto de metal o las combinaciones de hidroxiapatita con ácido poliláctico (6). Por ello, los *composites* intentan aunar las mejores características de los biomateriales que mezclan para conseguir todas sus ventajas, por lo que actualmente se encuentran en auge (1).

Si bien la estructura básica del soporte está formada por un biomaterial (simple o compuesto), también se pueden introducir en los andamios productos naturales o biológicos que aporten ciertas características que los biomateriales no pueden aportar por sí mismos. Este es el caso de los factores de crecimiento proangiogénicos o que induzcan la diferenciación celular o incluso células madre.

Como cerámicas más utilizadas en la regeneración se encuentran la hidroxiapatita (HA) y el trifosfato de calcio (β -TCP, β -*Tricalcium phosphate*) debido a su similitud con el componente mineral del hueso.

La hidroxiapatita (HA) es un material sólido que se encuentra de manera natural en el hueso y los dientes (22), motivo por el cual su uso está ampliamente extendido. Es un fosfato de calcio cuya composición es la siguiente: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (relación Ca/P de 1.67) y supone en torno al 50% del peso del hueso (34). Además de existir de manera natural, se puede preparar artificialmente. Este biomaterial destaca por su biocompatibilidad, su excelente osteoconductividad y su bioabsorción. Su degradación en el organismo produce la liberación de iones calcio y fosfato que favorecen la osteoinducción *in vivo* (34). Además, presenta otras características de interés para los implantes como bioactividad, fuerza mecánica elevada, resistencia a la corrosión y resistencia a la compresión (26). Como principal desventaja destaca su fragilidad (18). Por otro lado, existen varios polimorfos del trifosfato de calcio, siendo el de mayor aplicación en este campo el romboédrico β -TCP. El β -TCP es muy similar a la HA

diferenciándose principalmente en tres factores. El primero es su composición, ligeramente diferente, que presenta la siguiente fórmula: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, lo que determina que su relación Ca/P sea menor, de 1.5 (34). El segundo es su falta de bioactividad. Y el tercero es la mayor solubilidad que la HA (21).

Se pueden fabricar andamios utilizando únicamente una cerámica como es el caso del estudio llevado a cabo por Pei *et al.* (35) para demostrar la importancia de la micro y macroporosidad. Para ello, se sintetizó polvo de HA mediante el método de precipitación a partir de una solución de monohidrógenofosfato de diamonio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ sobre una solución de nitrato de calcio tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en agitación en un medio básico. Tras 24h, se recogió el precipitado de nanopartículas de HA, se lavó y se secó. Para obtener la tinta (35), y poder imprimir en 3D un soporte capa a capa, se mezcló el polvo de HA con butiral de polivinilo, alcohol y agua. El material se fue extruyendo mediante la técnica FDM controlando el movimiento de la boquilla con el CAM. Esta fabricación se basó en el CAD, gracias al cual se pudo diseñar la macroporosidad del andamio. En un segundo paso se diseñó la microporosidad del andamio. Para ello se calentó el *scaffold* a 1100°C durante 6 minutos y luego se disminuyó la temperatura hasta 800°C durante 30 minutos. Finalmente se dejó enfriar el andamio hasta temperatura ambiente.

El *scaffold* se implantó *in vivo* en las patas traseras de beagles (a los que se les había creado el defecto óseo) observando una buena interconexión entre los poros y uniformidad en el tamaño de los mismos (figura 8). Esto permitió que crecieran pequeños vasos sanguíneos que facilitan nutrientes y oxígeno y transportan los desechos. Gracias a ello también se observó formación de hueso nuevo. Con estos hallazgos se puede concluir que la interconectividad de los macro y microporos es el requerimiento básico para la osteoinducción (35).

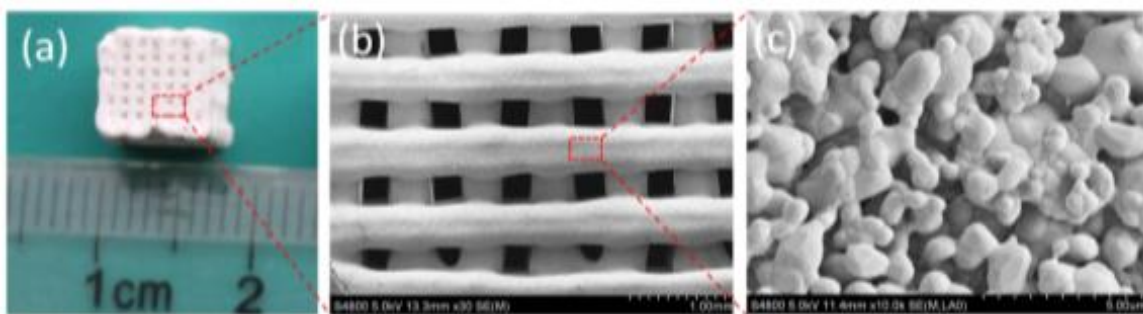


Figura 8. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de *scaffolds* de HA con diferentes porosidades (35).

Por otro lado, la mayor desventaja de las biocerámicas es la fragilidad que presentan. Existen diversas alternativas para solventarla como la adición de un polímero natural, como el colágeno (18), o sintético, como la policaprolactona (PCL) (36) o el recubrimiento del *scaffold* con polímeros como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Además, los *scaffolds* de biocerámicas puras, es decir, si se utiliza solo β -TCP o HA en el soporte, presentan propiedades mecánicas pobres (27).

En primer lugar se presenta el colágeno. El colágeno es un polímero natural que se encuentra en la matriz del hueso y supone un 90-95% de la misma. Es un material

biodegradable y biocompatible y se utiliza en *scaffolds* generalmente junto a otros biomateriales formando *composites* puesto que no tolera cargas excesivas (37). Es un material bioactivo ya que interacciona con el tejido del huésped (6). También es dúctil, de manera que al formularlo con HA aumenta su tenacidad a la fractura (21).

El *composite* formado por HA y colágeno se puede sintetizar mediante *robocasting* (38). Para ello, se mezcló colágeno (lío-filizado bovino) con HA (en polvo) en proporción 1:2 y se homogeneizaron en una solución de ácido acético. Se mantuvo la humedad al 90% y la temperatura a 4°C para evitar un secado no uniforme. Se observó tras su implantación *in vivo* una distribución del calcio y el colágeno uniforme y una mayor porosidad respecto a los *scaffold* que no fueron fabricados por impresión 3D. La HA aportaba la fuerza mecánica y el colágeno las ventajas biológicas (38).

En segundo lugar se presentan los polímeros sintéticos. El PGA, el PLA y la PCL son los tres polímeros sintéticos más utilizados en la impresión 3D de andamios para la regeneración ósea.

Son materiales biocompatibles y biodegradables en productos de fácil metabolización. Algunos de estos compuestos se encuentran de manera natural en el organismo, como el ácido láctico, por lo que su degradación es mediada por rutas naturales ya existentes (23). Si bien es natural, la degradación de PGA y PLA genera productos ácidos que pueden provocar una respuesta inflamatoria *in vivo* (6). Además, el PGA y el PLA se degradan tan rápido que no se pueden utilizar de manera individual y se encuentran generalmente combinados formando el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (37). El PLGA es un material compuesto que aumenta la vida media del andamio, ralentizando su degradación (37). Sin embargo, la PCL a pesar de ser biodegradable es bastante estable, pudiendo permanecer casi intacta en el lugar donde se ha implantado hasta 8 semanas. Otra de las características comunes de los polímeros sintéticos es que presentan una alta disponibilidad, es decir, son fáciles de obtener. Las características termoplásticas de la PCL hacen que sea un material adecuado para su impresión capa a capa y su energía de fractura es más alta que la de otros polímeros.

Es bastante común la asociación de la PCL con biocerámicas como la HA o el β -TCP que aumentan la adhesión celular, proliferación celular y la diferenciación osteogénica (39) así como la osteoconducción al presentarse en coformulación (11). Este es el caso del estudio llevado a cabo por Park *et al.* (29) en el que se imprimió un *scaffold* de PCL mediante SLA. En defectos óseos dentales creados en perros beagle se implantaron unos andamios de PCL con polvo de β -TCP y otros sin β -TCP. A las 8 semanas se observó que el hueso no había sustituido al andamio, apenas se había degradado y tampoco se había unido íntimamente al hueso. Sí se observó crecimiento de hueso nuevo alrededor del soporte en ambos casos (con y sin β -TCP) (29).

Dado que las distintas biocerámicas presentan varias características similares y beneficiosas para su uso en la regeneración ósea mediante la impresión 3D pero, también difieren entre ellas en algunas propiedades, se han diseñado *scaffolds* que intentan aunar las características positivas. El *composite* que representa esta unión es el fosfato de calcio bifásico, que consiste en la unión de β -TCP y HA en proporción 40/60 o 60/40, de manera que se consiga un equilibrio entre la resorción ósea (mayor en el β -TCP) y la fuerza mecánica (mayor en la HA) (21), (34). Esto se puede evidenciar en un estudio realizado por Vella *et al.* (40) se fabricó por impresión 3D un soporte con α -TCP

y HA en proporción 60/40 utilizando ácido fosfórico para la preparación de la tinta. La caracterización de los soportes indicó que gran parte de la cerámica se había transformado en β -TCP durante la sinterización. Además, se introdujo PCL tanto en la mezcla de polvos de HA y TCP como recubriendo el soporte, observando en ambos casos un aumento de la resistencia a la fractura y de la fuerza de flexión. Se observó también que la mayor proporción de β -TCP aumentaba la degradación del soporte, de manera que se relacionaba mejor con la formación del nuevo hueso (40).

Por lo tanto, la asociación de cerámicas con polímeros, tanto en recubrimiento como formando un material compuesto, permite subsanar el problema de la fragilidad que presentan las cerámicas al utilizarse solas. Sin embargo, para favorecer la regeneración ósea existen otras estrategias, como mejorar la osteoinducción. La osteoinducción juega un papel importante en la formación del hueso y puede verse favorecida mediante diferentes procesos.

Una de las estrategias para mejorar ambas características, osteoinducción y fragilidad, consiste en fabricar un andamio de HA **recubierto** con PCL y BMP-2 (41). La BMP-2 es un factor de crecimiento que va a favorecer la regeneración ósea y la PCL disminuirá la fragilidad del soporte. El uso de la BMP-2 es limitado ya que se requiere una dosis inicial alta y un mantenimiento de la concentración terapéutica para su uso en la aplicación clínica. En un estudio llevado a cabo por Kim *et al.* (41) se fabricó por impresión 3D un andamio de HA y se recubrió de una emulsión de PCL que incluía BMP-2 contenida en nanopartículas (NPs) de PLGA. Se observó que al añadir un recubrimiento de PCL al 5% la resistencia mecánica del andamio mejoraba sin afectar a la porosidad (si se utilizaba PCL al 10% la porosidad disminuía), acercándose a la fuerza mecánica del hueso trabecular. Si bien la PCL parece solucionar el problema de la fragilidad, en estudios anteriores se sugirió que inhibía la proliferación y la adhesión celular por lo que se añadió BMP-2 para combatirlo. Se observó que la liberación progresiva de la BMP-2, aumentó la proliferación celular y la diferenciación de los osteoblastos. La liberación de BMP-2 se mantuvo durante 30 días favoreciendo la regeneración ósea (41). Como puede observarse en la figura 9, la mayor formación de hueso nuevo se produce con el andamio que contiene PCL y BMP-2.

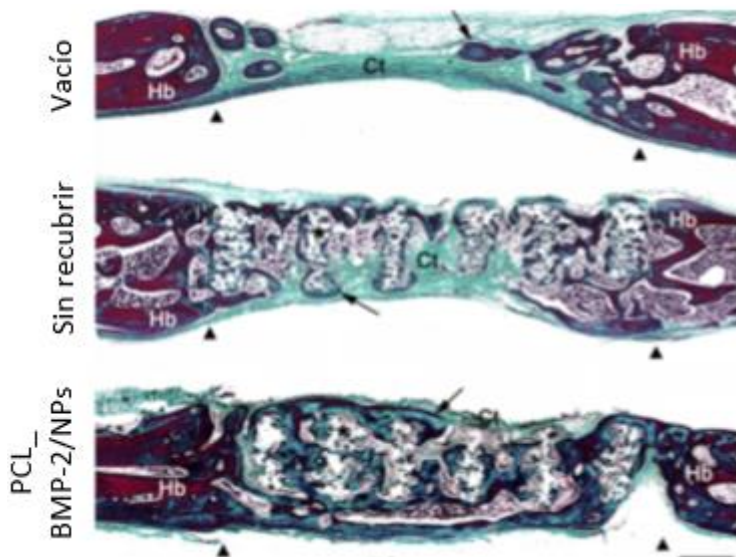


Figura 9. Formación de nuevo hueso sin andamio, con andamio sin recubrimiento y con andamio recubierto de PCL y BMP-2/NPs. El defecto óseo se encuentra delimitado por los triángulos. Hb=hueso del huésped; Ct=tejido conectivo; Barra de escala=500 μm (41).

Como se ha mencionado anteriormente, el polímero se puede añadir recubriendo el andamio o formando parte del material compuesto. Ocurre lo mismo al añadir factores como el BMP. Es el caso del estudio realizado por Deng *et al.* (42), en el que se fabricaron soportes de PLGA/HA con rhBMP-2 (BMP recombinante humana) contenida en nanopartículas de quitosano (polímero natural). Por un lado se fabricaron las nanopartículas de quitosano con rhBMP-2 mediante centrifugación. Por otro lado se combinó el PLGA (en proporción 75/25 de PLA/PGA) con nHA con un ratio 4:1 en una solución de 1,4-dioxano y se liofilizó. El liofilizado se colocó en un tubo a 130°C mientras que las nanoesferas de rhBMP-2 se colocaron en otro tubo a 4°C. Se fabricó el andamio con todos los materiales por impresión 3D. Las nanoesferas de quitosano resultaron ser unos transportadores ideales para el factor de crecimiento y la liberación sostenida del mismo observándose un paulatino incremento en la liberación de la rhBMP-2 hasta 30 días después de la implantación. Por otro lado, el PLGA tiene una excelente biodegradabilidad por lo que también se utiliza mucho como transportador de sustancias. Su combinación con la HA aumenta la conductividad ósea, así como la fuerza mecánica del *scaffold* y permite ajustar la tasa de degradación del PLGA de manera que se adecúe a la formación del hueso. El soporte demostró tener una correcta conectividad y tamaño de poro, lo que también favoreció el crecimiento celular. En comparación con el implante control (PLGA/nHA) se demostró inducción y promoción de la regeneración del nuevo hueso, observándose agregación de osteoblastos en el soporte. También se halló proliferación vascular. Todos estos resultados indican una correcta integración del andamio así como una inducción de la regeneración ósea (42).

Otro de los métodos más extendidos para la modificación de las propiedades de un material consiste en la sustitución de algunos iones por otros diferentes, lo que se conoce como **dopaje**. Dependiendo del tipo de sustancia que se introduzca se obtendrán diferentes características. Por ejemplo, los silicatos aumentan la osteoinducción y los iones estroncio, importantes en la osteoporosis, estimulan la regeneración ósea y disminuyen la resorción respecto a la actividad natural del hueso (6). En general el dopaje favorece la osteoinducción y puede ser una buena alternativa

frente a aquellos soportes que incluyen BMP para favorecer la proliferación de osteoblastos ya que la BMP necesita una liberación controlada y sostenida en el tiempo. Así mismo, mantener la viabilidad de estas proteínas supone un gran reto (43). En un estudio llevado a cabo por Nandi *et al.* (43) se incluyó dióxido de silicio junto con óxido de zinc (SiO_2/ZnO) en el soporte con el objetivo de aumentar la osteoinducción. Para ello se mezcló polvo de β -TCP con muy pequeñas cantidades de SiO_2 (0.5%) y ZnO (0.25%) y se introdujo en etanol anhidro, dejándolo secar a 60°C durante 72h. Se utilizó un método de impresión 3D basado en polvo llamado inyección de aglutinante (*binder-jet*). El *scaffold* se implantó en conejos blancos machos y se observó una mejora de la fuerza mecánica del soporte en torno al 5% respecto al andamio sin sustancias dopantes. La mejora de la fuerza mecánica se debe en realidad al aumento de la densidad ósea que provocaron las sustancias dopantes. En cuanto a la proliferación del tejido óseo se produjo en la mitad de tiempo en el implante dopado que en el que contenía únicamente β -TCP. Por tanto, se evidencia no solo una mejora en la fuerza mecánica sino también en la proliferación celular.

Una vez subsanados los problemas de fragilidad con la utilización de polímeros y la posible inhibición de la proliferación celular causada por estos al añadir BMP o sustancias dopantes, se intenta mejorar el crecimiento vascular. La formación de nuevos vasos sanguíneos va a ser clave para la rápida regeneración del hueso. Por ello, además de la BMP-2 se puede incluir también en el andamio **otro factor de crecimiento**, en este caso uno que facilite el crecimiento de los vasos sanguíneos como es el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular). En un estudio llevado a cabo por Bao *et al.* (44) se sintetizó un andamio de HA/PCL mediante el método de FDM y se recubrió de un hidrogel de PLGA-PEG-PLGA cargado con ambos factores de crecimiento. Se observó que el hidrogel se adhería correctamente al hueso y, según se iba degradando, se iban liberando los factores de crecimiento con una relación VEGF/BMP-2 de 1:10 para promover la formación del hueso (con otras relaciones se puede inhibir) y una cinética prácticamente de orden 1. La combinación de ambos factores promovió la osteogénesis más que la inclusión de la BMP únicamente, como se puede ver en la figura 10. La BMP-2 indujo la diferenciación celular mientras que el VEGF favoreció el crecimiento de vasos sanguíneos, observándose una gran similitud con el injerto autólogo (44).

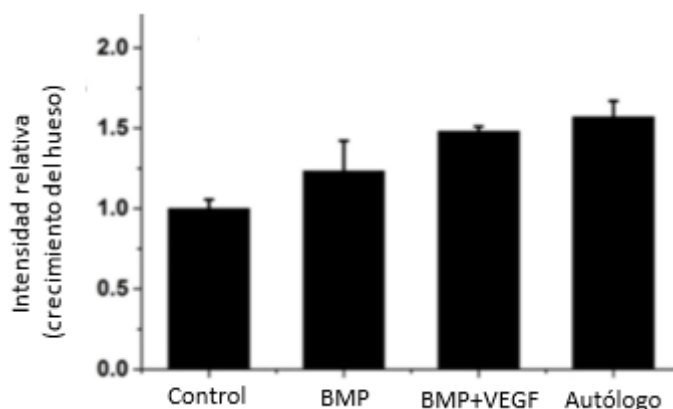


Figura 10. Comparativa del crecimiento del hueso con distintos soportes. El control, sin factores de crecimiento; el andamio que contiene únicamente BMP; el andamio que contiene ambos factores de crecimiento (BMP+VEGF) y el injerto autólogo (44).

Para ir un paso más se investigó la **adición de células** al soporte de manera que se favoreciera enormemente la osteogénesis. Las células más utilizadas en los scaffolds bioimpresos en 3D para la regeneración ósea son las células madre mesenquimales (MSC), que son las progenitoras de osteoblastos y osteoclastos. De esta manera se puede inducir la diferenciación directamente sobre las células que porta el andamio y agilizar el proceso de formación de hueso nuevo. Por ejemplo, en un experimento llevado a cabo por Levato *et al.* se utilizaron microtransportadores (MCs) en hidrogeles. Los MCs son partículas macrométricas con un área superficial altamente específica que promueven la adhesión y proliferación celular. Los MCs se prepararon con PLA y se funcionalizaron con colágeno tipo I para mejorar la respuesta celular al material. Las MSC (aisladas de huesos de ratas), así como los MCs cargados con ellas, se mezclaron con un hidrogel (GelMA). Este hidrogel se fabricó mediante un método de bioimpresión por extrusión. A los 21 días se observó diferenciación celular y deposición de la matriz mineralizada, demostrándose así la efectividad de las MSC en los andamios (45).

Como se ha comentado se pueden añadir numerosas sustancias al andamio con el fin de mejorar el proceso fisiológico de la regeneración ósea. Pero también se pueden incluir fármacos para aliviar el dolor generado por la operación o antibióticos como profilaxis para evitar la infección. La liberación de los fármacos se puede controlar con las características de los andamios, según su velocidad de degradación. El uso de fármacos directamente en el implante supone una buena alternativa frente a las terapias tradicionales ya que disminuye el riesgo de sobredosis así como disminuye los efectos adversos. Igualmente, aumenta la biodisponibilidad del fármaco con la apropiada concentración terapéutica en el sitio diana.

Las ventajas de este sistema pueden evidenciarse en el estudio llevado a cabo por García-Álvarez *et al.* (46), en el que se combinan diferentes antibióticos. El *scaffold* fabricado se obtuvo mediante tres preparaciones. En primer lugar se preparó nanocomposite cerámico constituido por apatita y vidrio bioactivo mesoporoso $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ (MGHA). Al polvo de MGHA se le adicionó el primer antibiótico, el levofloxacino (LEV) mediante una solución etanólica con la que se impregnó el polvo de MGHA. En segundo lugar se utilizó el polímero alcohol de polivinilo en solución al que se le añadió el segundo antibiótico, la vancomicina (VAN). Ambos componentes se mezclaron y formaron una tinta que se imprimió en 3D mediante escritura directa para fabricar el andamio. El *scaffold* se recubrió con una solución de gelatina conteniendo el último antibiótico, la rifampicina (RIF). Se

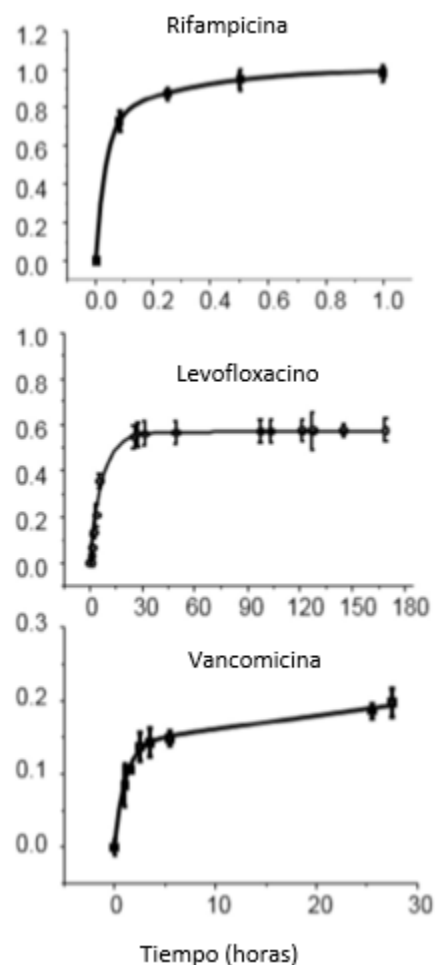


Figura 11. Cinéticas de liberación de los fármacos RIF, LEV y VAN de los *scaffolds* (46).

evaluaron la cantidad y velocidad de liberación de los fármacos, así como su efecto sobre bacterias tanto gram positivas como gram negativas. La RIF se liberó rápidamente lo que permitió atacar y romper el biofilm de bacterias existente en el modelo *in vitro* sobre el que se experimentaba. De esta manera, VAN y LEV podían actuar según se fueran liberando del andamio. Cada fármaco tenía su propio perfil de liberación en base a su formulación según se puede observar en la figura 11. Se observó que los fármacos liberados eran capaces de destruir el biofilm completo en 24h. También se pudo comprobar que la proliferación y la colonización eran adecuadas si bien la diferenciación celular era ligeramente inferior al control tras 7 días pero recuperaba éste tras 15 días (puede deberse a la concentración de antibióticos). Con esta fabricación de los andamios se obtuvieron resultados muy positivos frente a la infección gracias a los antibióticos pero también se favoreció la regeneración ósea gracias a las características de osteoinducción que proporcionaba la cerámica y la mejora de las propiedades mecánicas que supuso la adición del polímero.

6. CONCLUSIÓN

La impresión 3D ha supuesto grandes avances en la regeneración ósea. Gracias a ella se han podido fabricar soportes 3D de forma controlada para poder mimetizar la estructura del hueso al máximo. Las diversas técnicas de impresión permiten controlar parámetros críticos como la porosidad o geometría del andamio. Se pueden utilizar numerosos biomateriales como la HA, el β -TCP, el PGA, el PLA o la PCL o *composites* de los mismos. Además, se pueden añadir otras sustancias biológicas de manera que al combinar todo ello se genera un andamio muy similar al hueso en su composición química pero también biológica que va a favorecer en todos los sentidos la regeneración ósea.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo RO. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. 2016;83:363-82.
2. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *Journal of Dental Research*. 2010;89(12):1333-48.
3. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014;9(1):18-44.
4. Mimetic biomaterials. Naturally inspired bone regenerative solutions. 2019. <https://www.mimetic.com/biocompatibilidad-osteoconduccion-osteoinducción-biomateriales/>.
5. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2012;24:133-8.
6. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015;81:112-21.
7. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. 2015;32(1):21-34.
8. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynpras M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*. 2017;21:9-29.

9. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*. 2017;26(6):e12740-5.
10. Fernández-Tresguerres Hernández JA, Ariznabarreta Ruiz C. Fisiología humana. México D.F. Ed. McGraw-Hill. 4ªEd. 2010. Cap.:81; 1015-21.
11. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2018;80:1-30.
12. Suarez D. Principios básicos en regeneración ósea guiada. *Acta Bioclínica*. Vol. 2. Núm. 3. 2012:89-116.
13. Walmsley GG, Ransom RC, Zielins ER, Leavitt T, Flacco JS, Hu MS, et al. Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews*. 2016;12(5):524-9.
14. Hall JE. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. 13 ed. Barcelona, España: Elsevier Health Science Spain - T; 2016. Cap. 79:955-60.
15. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015; 421746-63.
16. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;142:155-70.
17. Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2003;26:7-17.
18. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 2018;28(3):351-62.
19. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. Principles of Tissue Engineering. San Diego, EEUU. Elsevier Science & Technology; 2013. Cap. 2; 9-22.
20. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2016;122(4):392-402.
21. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2014;25(10):2445-61.
22. Harris DA, Fong AJ, Buchanan EP, Monson L, Khechoyan D, Lam S. History of synthetic materials in alloplastic cranioplasty. *Neurosurgical Focus*. 2014;36(4):E20; p. 1-5.
23. Tomlins P. Characterisation and design of tissue scaffolds. Oxford: Woodhead Publishing; 2015. Cap. 1:1-22.
24. Ginebra M-P, Espanol M, Maazouz Y, Bergez V, Pastorino D. Bioceramics and Bone Healing. *EFORT open reviews*. 2018;3(5):173-83.
25. Instituto Nacional de Imagen Biomédica y Bioingeniería Estados Unidos. 2019. <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenier%C3%ADa-de-tejidos-y-medicina-regenerativa-0>.
26. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*. 2018;3(3):278-314.
27. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*. 2019;84:16-33.
28. Barba A, Maazouz Y, Diez-Escudero A, Rappe K, Espanol M, Montufar EB, et al. Osteogenesis by foamed and 3D-printed nanostructured calcium phosphate scaffolds: Effect of pore architecture. *Acta Biomaterialia*. 2018;79:135-47.

29. Park SA, Lee H-J, Kim K-S, Lee SJ, Lee J-T, Kim S-Y, et al. In Vivo Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffold Implantation Combined with β -TCP Powder for Alveolar Bone Augmentation in a Beagle Defect Model. *Materials*. 2018;11(2):238-49.
30. Vithani K, Goyanes A, Jannin V, Basit AW, Gaisford S, Boyd BJ. An Overview of 3D Printing Technologies for Soft Materials and Potential Opportunities for Lipid-based Drug Delivery Systems. *Pharmaceutical Research*. 2018;36(1):4-23.
31. Ma H, Feng C, Chang J, Wu C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomaterialia*. 2018;79:37-59.
32. Huang Y, Zhang X-F, Gao G, Yonezawa T, Cui X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnology Journal*. 2017;12(8):1600734-52.
33. Midha S, Dalela M, Sybil D, Patra P, Mohanty S. Advances in 3D Bioprinting of Bone: Progress and Challenges. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019; 1-21.
34. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2017;2(4):224-47.
35. Pei X, Ma L, Zhang B, Sun J, Sun Y, Fan Y, et al. Creating hierarchical porosity hydroxyapatite scaffolds with osteoinduction by three-dimensional printing and microwave sintering. *Biofabrication*. 2017;9(4):045008-21.
36. Jammalamadaka U, Tappa K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018;9(1):22-36.
37. Ceccarelli G, Presta R, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Lupi SM, Rodriguez Y Baena R. Emerging Perspectives in Scaffold for Tissue Engineering in Oral Surgery. *Stem Cells International*. 2017; 4585401-12.
38. Lin K-F, He S, Song Y, Wang C-M, Gao Y, Li J-Q, et al. Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(11):6905-16.
39. Bruyas A, Lou F, Stahl AM, Gardner M, Maloney W, Goodman S, et al. Systematic characterization of 3D-printed PCL/ β -TCP scaffolds for biomedical devices and bone tissue engineering: influence of composition and porosity. *Journal of Materials Research*. 2018;33(14):1948-59.
40. Vella JB, Trombetta RP, Hoffman MD, Inzana J, Awad H, Benoit DSW. Three dimensional printed calcium phosphate and poly(caprolactone) composites with improved mechanical properties and preserved microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2018;106(3):663-72.
41. Kim B-S, Yang S-S, Kim CS. Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an ϵ -polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;170:421-9.
42. Deng N, Sun J, Li Y, Chen L, Chen C, Wu Y, et al. Experimental study of rhBMP-2 chitosan nano-sustained release carrier-loaded PLGA/nHA scaffolds to construct mandibular tissue-engineered bone. *Archives of Oral Biology*. 2019;102:16-25.
43. Nandi SK, Fielding G, Banerjee D, Bandyopadhyay A, Bose S. 3D printed β -TCP bone tissue engineering scaffolds: Effects of chemistry on in vivo biological properties in a rabbit tibia model. *Journal of Materials Research*. 2018;33(14):1939-47.
44. Bao X, Zhu L, Huang X, Tang D, He D, Shi J, et al. 3D biomimetic artificial bone scaffolds with dual-cytokines spatiotemporal delivery for large weight-bearing bone defect repair. *Scientific Reports*. 2017;7(1):7814-27.

45. Vijayavenkataraman S, Yan W-C, Lu WF, Wang C-H, Fuh JYH. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;132:296-332.
46. García-Alvarez R, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. 3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm. *Acta Biomaterialia*. 2017;49:113-26.