



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: Bioimpresión en 3D.

Autor: M^a Victoria Castaño Amores.

Fecha: 22 de Julio de 2020.

Tutor: Dolores Remedios Serrano López.

Índice

1	RESUMEN	3
2	INTRODUCCIÓN.....	3
3	OBJETIVOS	5
4	METODOLOGÍA.....	5
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
5.1	Concepto de bioimpresión	6
5.2	Biotintas	7
5.3	Bioimpresoras	9
5.3.1	Bioimpresión basada en inyección	9
5.3.2	Bioimpresión basada en extrusión.....	10
5.3.3	Bioimpresión asistida por láser.....	11
5.3.4.	Bioelectrospray y electrospinning celular.....	12
5.4	Aplicaciones.....	12
5.5	Desafíos y Limitaciones.....	20
6	CONCLUSIÓN	21
7	BIBLIOGRAFÍA	21

1 RESUMEN

El continuo avance de la tecnología se está viendo reflejado en muchos ámbitos del día a día. El campo de la medicina también le ha abierto sus puertas y concretamente, es la tecnología de impresión en tres dimensiones la que ha llegado para quedarse. Numerosas son las aplicaciones de la impresión 3D en este ámbito gracias a la alta precisión y versatilidad de la técnica. Recientemente se ha introducido un nuevo concepto, el de la bioimpresión en tres dimensiones. En esta memoria se hace un breve repaso de esta técnica y sus aplicaciones.

Con la bioimpresión 3D se pretende fusionar la medicina con la tecnología mediante la impresión de estructuras con propiedades similares a las del cuerpo humano que sean capaces de llevar a cabo sus funciones. Las biotintas son el material de impresión que permite vehiculizar los componentes celulares en la estructura final. Las técnicas de bioimpresión (basada en inyección, extrusión y láser) deben favorecer la viabilidad celular, en lo que difiere con las de impresión en 3D.

Además, en esta revisión, se han incorporado, ordenada y esquemáticamente, los avances en la bioimpresión de algunos órganos y tejidos del cuerpo humano, con el fin de permitir al lector conocer la aplicación actual que tienen en medicina. Por último, se hace referencia a las limitaciones y desafíos de la técnica.

2 INTRODUCCIÓN

La impresión 3D se ha utilizado como método de fabricación en numerosos y diferentes ámbitos. Actualmente, se está abriendo camino en el campo de la medicina y por ello, es necesario revisar las bases de la impresión 3D para, posteriormente, centrar el estudio en la bioimpresión 3D.

La impresión en 3D se define como la técnica de fabricación basada en la administración de capas sucesivas de material, dispuestas unas sobre otras, para dar forma a diferentes estructuras previamente modeladas por ordenador. De manera general, este proceso consta de cuatro pasos:

1. Obtención de imágenes de la estructura a imprimir mediante diferentes técnicas.
2. Procesado de las imágenes en formato STL para definir la geometría de la estructura.
3. Procesamiento informático mediante un programa informático para dividir la estructura a imprimir en las sucesivas capas del material.
4. Impresión en 3D.

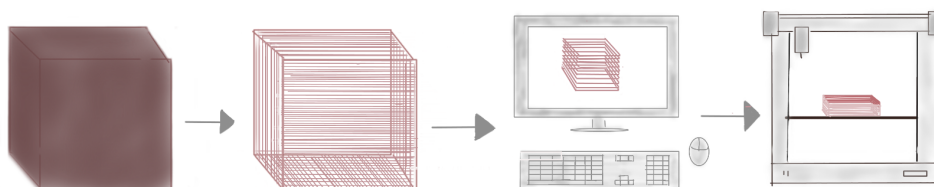


Figura 1. Esquema del proceso general de impresión en 3D. Primero se obtienen las imágenes de la estructura a imprimir. Esas imágenes son procesadas para generar un archivo STL que permita definir la geometría de la estructura. Utilización del slicing software para dividir la estructura en las capas de material que posteriormente imprimirá la impresora 3D (1).

Algunas de las aplicaciones de la impresión 3D en el campo de la medicina son:

- **Personalización de tratamientos.** Es posible imprimir medicamentos de uso oral con diferentes principios activos en una sola forma farmacéutica, así como modificar el perfil de liberación. El objetivo es hacer de esta técnica una práctica rutinaria en las farmacias con la que se consiga personalizar el tratamiento de los pacientes.
- **Preparación de intervenciones quirúrgicas.** Son muchos los modelos creados mediante impresión 3D para el estudio previo a una intervención quirúrgica. De esta forma, se consigue minimizar los riesgos que acarrearía la toma de decisiones en plena operación, sobre todo si se trata de órganos o estructuras delicadas o poco accesibles.
- **Modelos protésicos.** Siguiendo este hilo, otra aplicación actual es la impresión de modelos protésicos individualizados en función del paciente (1).

Existen diferentes técnicas dentro de la impresión en 3D, pero principalmente son tres las que se usan en el ámbito sanitario. Estas son los sistemas de **inyección de tinta**, los sistemas basados en **extrusión** y los sistemas de impresión **láser**. Dentro de estos tres grupos se encuentran las diferentes técnicas a detallar.

Los **sistemas de inyección** se basan en la impresión de capas de material en polvo que se van depositando unas sobre otras gracias a una solución aglutinante. Existen dos tipos de impresoras basadas en esta técnica. Figura 2.

- La impresión continuada por chorro de tinta (CIP). En esta impresora se impulsa la salida del material de impresión a través de la boquilla gracias a la presión ejercida por una bomba, de manera que el material es expulsado en forma de gotas gracias a un cristal piezo eléctrico (2). Las gotas son expulsadas a gran velocidad, por lo que es necesario un sistema de reciclaje que permite volver a recircular el material y así obtener un sistema continuo (3).
- La técnica de caída bajo demanda (DOD) utiliza múltiples cabezales piezoeléctricos o térmicos. La diferencia entre uno y otro radica en la temperatura de trabajo. El piezo-eléctrico permite la impresión a temperatura ambiente, sin embargo, el volumen de las gotas obtenidas mediante esta técnica puede no ser tan preciso(2).

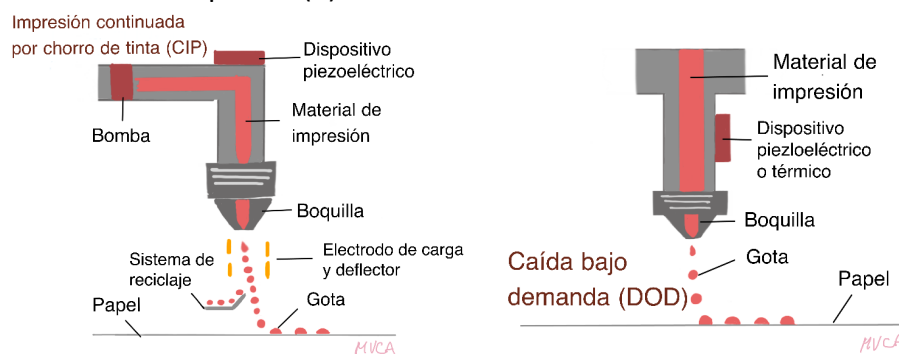


Figura 2. Esquema de dos tipos de impresoras basadas en la técnica de impresión por inyección. La imagen de la izquierda es un esquema de la impresión continuada por chorro de tinta (CIP) y la imagen de la derecha es un esquema de la técnica de caída bajo demanda (DOD)(3).

Impresión basada en **extrusión** del material. En esta técnica se hace pasar el material de impresión a través de la boquilla para ir depositándolo capa a capa (Figura 3).

- El modelo de deposición fundida (FDM) utiliza temperaturas muy elevadas para fundir el material filamentosos y así forzar su paso a través de la boquilla para que al depositarse sobre la plataforma se solidifique.
- Las microjeringas asistidas por presión (PAM) no necesitan fundir el material ya que usan un pistón con aire a presión y una jeringa como método de extrusión que fuerza a pasar el material en forma de solución viscosa por la boquilla para depositarse sobre la plataforma.

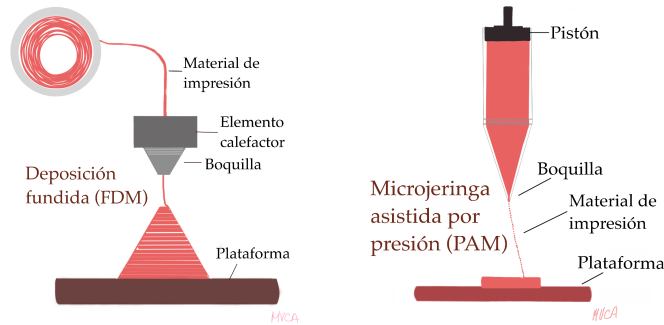


Figura 3. Modelos de impresión basada en extrusión. La imagen de la izquierda es un esquema de la técnica de deposición fundida (FDM) y la imagen de la derecha representa a la técnica de microjeringa asistida por presión (PAM) (2).

Las basadas en **láser** necesitan una resina fotopolimerizable que se cura por la exposición a la luz ultravioleta (Figura 4). En este caso, el movimiento de la plataforma permite que cuando una capa se ha solidificado, ésta se mueva y así el láser pueda llegar a la resina líquida para que solidifique formando la siguiente capa de la estructura (2).

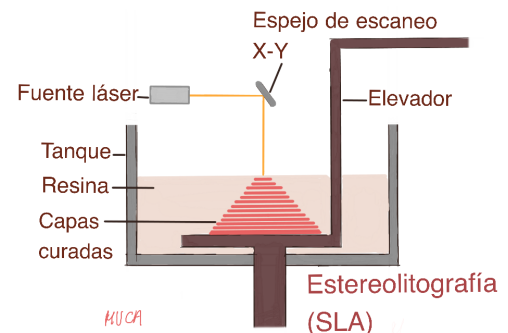


Figura 4. Esquema de la técnica de impresión asistida por láser (2).

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de la revisión es entender el concepto de bioimpresión 3D, así como analizar las diferentes técnicas existentes y sus potenciales aplicaciones en el campo de la medicina.

4 METODOLOGÍA

Se trata de un estudio analítico, objetivo y descriptivo. Para la realización de este trabajo de revisión, se ha utilizado la base de datos PubMed para la búsqueda de los artículos que han servido como referencia bibliográfica, preferentemente los publicados en el año 2018, 2019 y 2020.

Las palabras clave o criterios de búsqueda seleccionados han sido: *3D bioprinting, bioprinting applications, bioinks, extrusion, inkjet, laser-assisted*.

Los documentos recuperados se han revisado y de ellos se ha seleccionado aquella información de mayor actualidad y relevancia.

Las figuras y tablas han sido elaboradas por la autora usando el software Autodesk Sketchbook (Mill Valley, California, EEUU). El manejo de las referencias bibliográficas se ha llevado a cabo con el programa EndNote X9 desarrollado por Thomson Reuters (Toronto, Canadá) que posteriormente pasó a formar parte de Clarivate Analytics (Filadelfia, Pensilvania, EEUU).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Concepto de bioimpresión

La bioimpresión es una técnica basada en la adición de capas sucesivas de materiales biológicos, bioquímicos y células vivas, que conforman las biotintas, para la obtención de estructuras con propiedades similares a los tejidos humanos. En este proceso, pueden usarse o no materiales de soporte. Uno de los puntos fuertes de la bioimpresión es la capacidad de imprimir estructuras muy complejas con una elevada precisión (1). Al igual que en la impresión 3D, hay unos pasos comunes en la fabricación mediante bioimpresión 3D:

1. Obtención de las imágenes del órgano o tejido de interés (mediante tomografía computarizada o resonancia magnética, por ejemplo).
2. Segmentación para obtener la geometría en 3D del tejido u órgano.
3. Obtención del formato de archivo listo para imprimir.
4. Selección del material y la bioimpresora más adecuados.
5. Impresión de la estructura 3D, postprocesamiento y comprobación de propiedades (4).

De manera general, estos 5 pasos se resumen en tres fases: **pre-bioimpresión**, **bioimpresión** y **post-bioimpresión** (Figura 5).

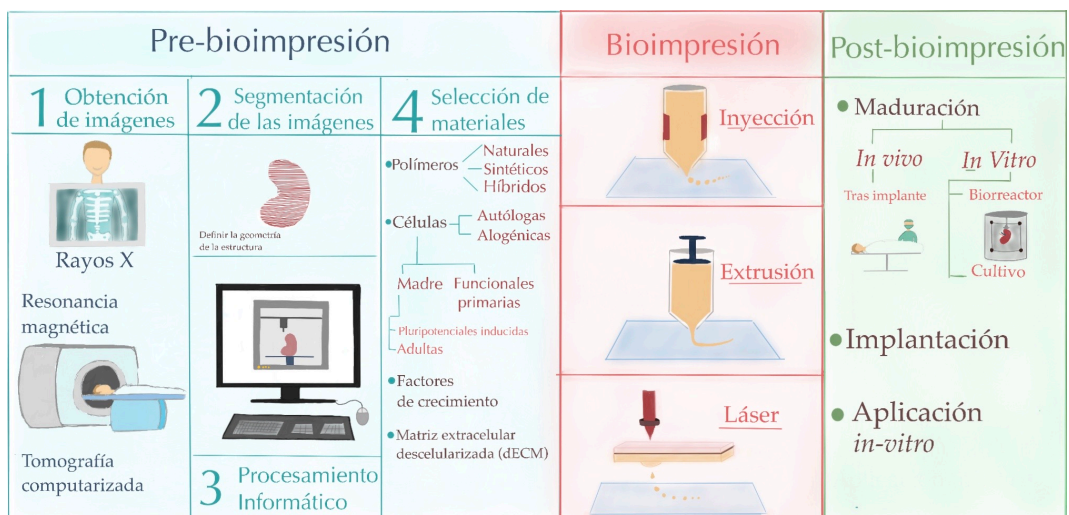


Figura 5. Adaptación del esquema general del proceso de bioimpresión 3D (1).

Uno de los objetivos principales de la bioimpresión es la fabricación de tejidos y órganos para suplir la falta de **donaciones**. Además, también es posible utilizar las estructuras para reemplazar partes del organismo que estén dañadas como por ejemplo, la piel quemada. Por otro lado, se utiliza para imprimir estructuras que sirvan de base para **probar medicamentos u otros productos en investigación**, de manera que los

resultados sean más precisos y satisfactorios que los obtenidos con las técnicas actuales. Esto también permite reducir el número de animales utilizados en investigación. La bioimpresión posibilita el avance en el estudio de **nuevas terapias y enfoques para las operaciones quirúrgicas** usando **modelos** bioimpresos, lo que permite personalizar la medicina y hacerla más eficiente(1).

5.2 Biotintas

Las biotintas son el material utilizado en la bioimpresión en 3D de estructuras formadas por células. Dentro de las biotintas, por lo tanto, se distingue el componente celular, factores de crecimiento, moléculas, proteínas, sustancias bioactivas y componentes extracelulares, entre otros (Figura 6).

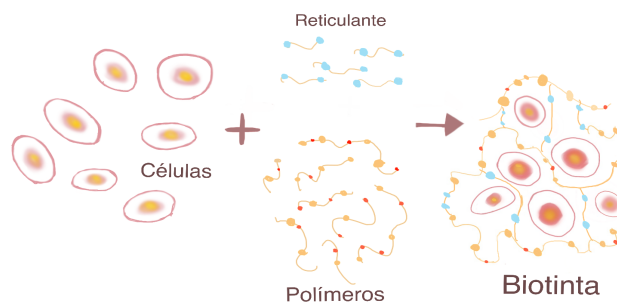


Figura 6. Adaptación del esquema de la composición de una biotinta (1).

Las biotintas han de cumplir numerosos requisitos para poder ser usadas como material de impresión, ya que el objetivo es obtener estructuras similares a los tejidos y órganos del cuerpo. Lo primero que deben de cumplir es que sean **imprimibles**, deben de soportar las condiciones de impresión y permitir la viabilidad de las células que contienen. Deben presentar **resistencia mecánica a la degradación** y **capacidad de funcionalización**. Dentro de los requisitos biológicos, la **biocompatibilidad**, **citocompatibilidad** y **bioactividad** son imprescindibles y si es necesario, **biodegradabilidad**. Estas biotintas **no** pueden ser **tóxicas** ni reactivas desde el punto de vista inmunogénico, pues su localización final pretende ser el cuerpo humano. La biotinta debe permitir que la estructura final sea **permeable** a nutrientes y gases, además debe de poder ser **esterilizada** (5-8).

El componente indispensable de las biotintas son las células, pudiendo ser **células madre o células funcionales primarias**.

- Las células funcionales primarias son de elección en la bioimpresión de tejidos individuales, sobre todo con la técnica de impresión basada en extrusión, ya que las células madre no resisten la presión generada en el proceso.
- Las células madre son una buena opción para imprimir tejidos u órganos complejos, ya que se elimina la necesidad de tener una impresora con múltiples cabezales para los diferentes tipos celulares, gracias a la capacidad de diferenciación de las células madre.

Existen dos tipos de células madre, las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) y las células adultas de tejidos. Las cantidades que se obtienen de las últimas son limitadas, lo que hace de las pluripotenciales inducidas una buena opción. No obstante, este proceso no está exento de riesgo ya que estas células podrían convertirse en células cancerígenas.

Es posible clasificar estas células según la procedencia celular. Si las células utilizadas para la bioimpresión son propias, es decir **autólogas**, las posibilidades de rechazo serán mucho menores que si proceden de un donante (**allogénicas**). Sin embargo, el número de células autólogas que es posible obtener de una biopsia es bajo lo que puede suponer un problema en la impresión de un órgano que requiera miles de ellas (1, 9).

Otro componente a destacar en las biotintas son los hidrogeles naturales. En este grupo están incluidas las proteínas de la matriz extracelular, como son el colágeno, el ácido hialurónico o la gelatina, que conforman los **polímeros naturales** (Figura 7). Estos polímeros desempeñan distintas funciones en las biotintas. Destaca la función de proveer los agentes bioactivos a las células para favorecer su acomodación, la capacidad para guiar la histogénesis y organogénesis o promover la maduración tras bioimpresión. Sin embargo, también son necesarios los **polímeros sintéticos**, dentro de los cuales destacan el polietilenglicol o el poliuretano. Estos polímeros consiguen mejorar el manejo multicelular, las propiedades mecánicas y completan funciones adicionales (5, 6).

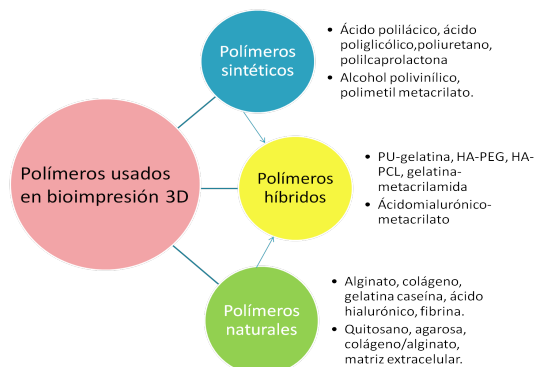


Figura 7. Clasificación de los polímeros que conforman las biotintas utilizadas en la bioimpresión 3D (6). **PU**: poliuretano; **HA**: ácido hialurónico; **PEG**: polietilenglicol; **PCL**: policaprolactona.

Por lo tanto, es posible dividir las biotintas en 4 grupos generales según sus funciones:

1. **Biotintas de carácter estructural**: favorecen la proliferación y la diferenciación celular imitando a la matriz extracelular. Se encargan de mantener la integridad de la construcción.
2. **Biotintas fugaces**: son temporales, puede ser eliminadas para formar huecos o canales internos en la estructura impresa.
3. **Biotintas de soporte**: son biotintas formadas por materiales no biológicos con fuerza mecánica cuyo objetivo es el de resistir cargas.
4. **Biotintas funcionales**: son aquellas que proporcionan señales mecánicas, bioquímicas y eléctricas para modificar el comportamiento celular postimpresión (9).

Las biotintas más usadas son tres, los hidrogeles cargados de células, las suspensiones celulares y las soluciones basadas en matriz extracelular descelularizada (dECM).

1. Los **hidrogeles cargados de células** son redes tridimensionales hidrofílicas que retienen elevadas cantidades de agua lo que les permite reestablecer el microambiente celular además de ser manejables y biodegradables. Pueden estar formados por polímeros naturales o sintéticos. Sin embargo, debido a su

baja viscosidad no son aptos para formar tejidos que requieran fuerza mecánica. Los hidrogeles se utilizan en las tres técnicas de bioimpresión, la basada en extrusión, la de inyección y la basada en láser.

2. **Biotintas basadas en agregados celulares.** Son una buena opción cuando no se quiere usar un andamio en la impresión, en estos casos se utilizan estos agregados celulares en forma de esferoides mono o multicelulares como biotinta. Esta técnica se basa en la capacidad de autoensamblaje y fusión gracias a las interacciones célula-célula.
3. **Biotintas basadas en dECM.** Estas biotintas se obtienen descelularizando el tejido de interés para obtener la matriz extracelular y posteriormente, triturarla y disolverla en una solución tampón. Se usan cada vez más por su bioactividad y facilidad de formulación(5-7).

Los **hidrogeles peptídicos de autoensamblaje** es un nuevo tipo de biotinta en desarrollo. Son oligopéptidos de 8 a 32 aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas e hidrofóbicas que pueden autoensamblarse mediante enlaces de tipo Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, formando estructuras tipo alfa hélice y beta laminal. Los estímulos externos como la temperatura o el pH pueden activar estas estructuras para obtener micelas, nanofibras y nanotubos que incrementan la estabilidad de la estructura. Estos hidrogeles se caracterizan por su elevado contenido en agua y una gran biocompatibilidad. Además tienen la capacidad de imprimir estructuras con mecánica ajustable y mayor integridad. Gracias a la funcionalización de las cadenas laterales de los péptidos, los hidrogeles pueden presentar memoria de forma, autocuración o bioactividad (9).

5.3 Bioimpresoras

Las técnicas disponibles para la bioimpresión 3D no son tan numerosas como en la impresión 3D, ya que son necesarias unas condiciones de impresión muy estrictas para favorecer la supervivencia celular. Hay que tener en cuenta que las propiedades de la biotinta van a condicionar el tipo de bioimpresión utilizada (7).

5.3.1 Bioimpresión basada en inyección

Esta tecnología se basa en la descomposición de la biotinta en pequeñas gotas que se depositan sobre una superficie para formar la estructura deseada. Existen diferentes enfoques en la bioimpresión por inyección, que son el térmico, el piezoeléctrico y el electromagnético (Figura 8).

- El **térmico** es el más usado gracias a su bajo coste, a la alta viabilidad celular tras la impresión y su diseño de fácil uso. Para generar la gota se aplica un pulso eléctrico a una fina resistencia que genera calor formando una burbuja. Cuando esta colapsa, se favorece la salida de las gotas de biotinta de diferentes volúmenes. La temperatura alcanzada llega hasta los 300°C durante unos microsegundos, al ser un tiempo tan breve, la viabilidad celular no se ve condicionada.
- En el **piezoeléctrico**, el pulso de presión lo generan los cristales piezoeléctricos que hacen vibrar la cámara. Esta técnica se usa menos porque la estabilidad de las membranas celulares se ve comprometida por las vibraciones.

- La impresión **electromagnética** se basa en el electromagnetismo. Las gotas formadas con esta técnica son más grandes que con las anteriores.

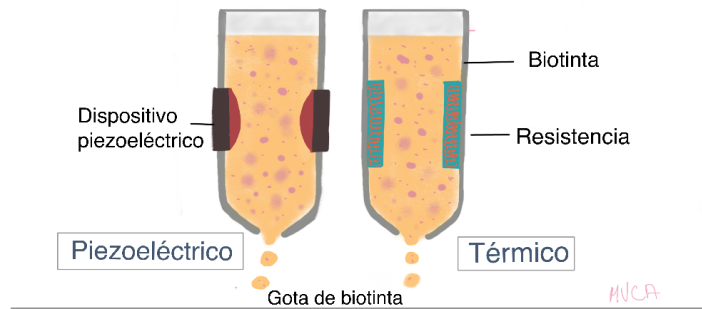


Figura 8. Principales técnicas de bioimpresión basada en inyección. Impresora con dispositivo piezoeléctrico a la izquierda e impresora con dispositivo térmico a la derecha. Estos dispositivos son los sistemas que permiten generar la gota de biotinta en el proceso de bioimpresión (10).

Las gotas de tinta se forman mediante dos estrategias, **CIP**, continuos inkjet printing y **DOD**, drop on demand.

La resolución obtenida depende de las propiedades de la biotinta y de la boquilla. A menor tamaño de boquilla, mayor resolución pero a su vez, mayor posibilidad de obturación. Dentro de las ventajas, esta técnica es flexible y económica. Permite adaptar las impresoras a un sistema de múltiples cabezales. Además, la superficie de destino de impresión no tiene por qué ser plana lo que es importante para perspectivas futuras como la impresión *in situ* (4, 7, 9-11). Sin embargo, el número de biotintas que se pueden utilizar es reducido ya que tienen que ser líquidas pero con la viscosidad suficiente para mantener la estructura y sin obturar la boquilla (10).

5.3.2 Bioimpresión basada en extrusión

Técnica que imprime la biotinta en forma de filamentos continuos mediante extrusión. Las biotintas se encuentran en jeringuillas de plástico desechables que se dispensan neumática o mecánicamente con un pistón o un tornillo giratorio sobre sustratos estériles.

El sistema neumático utiliza aire comprimido para forzar la salida de la biotinta a través de la boquilla, teniendo una estructura más simple que el sistema de extrusión mecánico. Este último, permite tener un mayor control espacial en la impresión del material gracias al uso del tornillo o pistón que pueden ser controlados robóticamente. Los de pistón permiten controlar el desbordamiento de la biotinta mientras que el sistema de tornillo permite un control espacial y usar biotintas de elevada viscosidad. El sistema neumático es útil para depositar biotintas de varios tipos y viscosidades ya que es posible modular la presión y el tiempo de apertura de la válvula (Figura 9). Al aplicarles presión, estas biotintas fluyen como filamentos cilíndricos que se reticulan con luz UV, enzimas, productos químicos o calor formando estructuras más duraderas (7, 9-11).

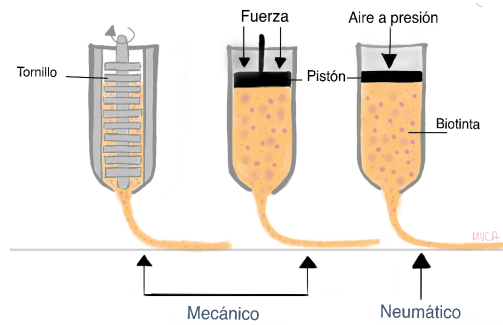


Figura 9. Esquema de los diferentes sistemas de bioimpresión basados en extrusión. El tornillo, el aire a presión o la fuerza permiten la salida de la biotinta a través de la boquilla para ser bioimpresa (10).

Las impresoras actuales poseen múltiples boquillas de forma que evitan la contaminación cruzada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la baja velocidad de impresión de la técnica, puede hacer que las células estén mucho tiempo sometidas a condiciones extremas de presión y de bajas concentraciones de oxígeno, repercutiendo en la viabilidad celular. Las resoluciones que se pueden obtener son menores que con otras técnicas (7, 9-11).

5.3.3 Bioimpresión asistida por láser

El sistema de impresión está formado por un láser pulsátil (generalmente infrarrojo) y un sistema de enfoque para dirigirlo sobre una cinta donadora formada por material de cuarzo o vidrio transparente al láser y una capa de metal. Esta última capa puede absorber la radiación del láser transformando la energía para generar una burbuja en la capa de biomaterial y gracias a la presión obtener la gota de biotinta que se deposita sobre la superficie colectora. El sustrato receptor contiene un biopolímero o medio de cultivo celular para preservar la adhesión y el crecimiento celular (Figura 10) (10).

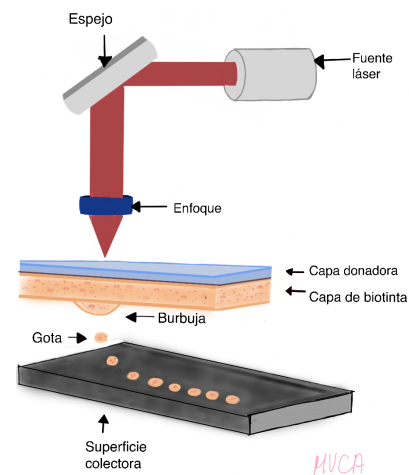


Figura 10. Esquema general de la técnica de bioimpresión asistida por láser (LAB) (10)

Es posible trabajar con materiales de diferentes viscosidades. Por ello, se pueden imprimir tejidos de diferentes densidades celulares y tamaños con mucha resolución. El problema son los elevados tiempos de impresión que condicionan la viabilidad celular por la exposición al láser, especialmente si es ultravioleta. Dentro de las ventajas es de resaltar la automatización, la reproducibilidad y el alto rendimiento, que hacen que la bioimpresión asistida por láser sea cada vez más popular (9,10). Esta técnica, a diferencia de las anteriores, no es selectiva porque necesitan pasos de lavado si hay un cambio de material o de tipo celular. Además, la biotinta suele encontrarse en un depósito para que sea polimerizada, lo que puede conducir su desperdicio y afectar al proceso si las cantidades son limitadas(11).

5.3.4. Bioelectrospray y electrospinning celular.

Estos métodos se basan en la utilización de un campo eléctrico, entre dos electrodos cargados, para expulsar el material en forma de gotas o de manera continua. Usando una corriente continua de alto voltaje entre la aguja cargada y un electrodo de tierra, se acelera la biotinta de manera que se obtiene una forma de cono que favorece la salida del material. Una modificación ha permitido usar este sistema como técnica de bioimpresión, al permitir colocar la biotinta en un sitio específico.

Esta nueva técnica tiene una serie de ventajas, como la capacidad de formar gotas o filamentos de tamaño nano, obtener una elevada densidad celular, no ser necesario el contacto en el proceso de impresión, presentar un enfoque más simple y permitir controlar la liberación. Se plantea su uso para la bioimpresión *in situ* pero es necesario investigar más la técnica para validar su seguridad en situaciones clínicas e intentar disminuir el voltaje usado (10).

5.4 Aplicaciones

Como se ha mencionado previamente, uno de los objetivos principales de la bioimpresión 3D es conseguir estructuras lo más similares a órganos y tejidos para poder suplir la falta de donaciones. Este es un reto ambicioso que aún no se ha conseguido. Sin embargo, se están desarrollando numerosas pruebas de concepto que están permitiendo avanzar en esta dirección. En esta revisión, se han incorporado los avances más actuales en cuanto a la impresión de algunos órganos y tejidos.

Primero, se describen los avances en la bioimpresión de tejidos poco perfundidos como hueso, cartílago y la piel (Tabla 1).

El hueso se caracteriza por sus propiedades mecánicas, por ello, los biomateriales usados deben de tener elevada viscosidad y estar en concentraciones altas. En la bioimpresión del hueso, se utilizan las células madre mesenquimales y los osteoblastos, y junto con ellas, el factor de crecimiento endotelial vascular y la proteína morfogenética ósea para mejorar la formación del hueso (12).

Los tejidos cartilagosos se caracterizan por tener una densidad de células relativamente baja, lo que provoca que las alteraciones a este nivel sean difíciles de reparar, y por ello, que la bioimpresión se utilice como alternativa en la regeneración del tejido (13).

La piel obtenida por bioimpresión en 3D tiene un potencial muy grande para ser usada como injerto en la cicatrización de heridas, reemplazo de piel quemada o como sustrato para probar cosméticos y fármacos (9). Los queratinocitos y los fibroblastos son las células que conforman la epidermis y dermis de la piel, estas células son las constitutivas de los hidrogeles (14).

En segundo lugar, se describen los avances de la bioimpresión de tejidos y órganos altamente perfundidos como las válvulas del corazón, los vasos sanguíneos, el tejido cardíaco y nervioso, el hígado y el páncreas (Tabla 2).

Las válvulas del corazón sólo se pueden reemplazar mediante una prótesis, el problema es su falta de mimetización, al no ser capaces de crecer o de responder a los estímulos, lo que conlleva a múltiples cirugías a lo largo de la vida del paciente. La bioimpresión en

3D permite diseñar la válvula de manera individualizada y con capacidad para crecer e integrarse (12).

La vascularización es una de las limitaciones de la bioimpresión y de la ingeniería de tejidos. A pesar de esto, se espera poder conseguir una solución con la bioimpresión 3D ya que estas redes vasculares son necesarias en el transporte de nutrientes y la eliminación de desechos, lo que condiciona la viabilidad celular (12,14).

Las enfermedades del corazón son un problema creciente en la sociedad y la falta de órganos para la donación hace necesario el desarrollo de técnicas que permitan reproducir el corazón humano. Mediante la bioimpresión 3D se están desarrollando alternativas terapéuticas que permiten la regeneración o el reemplazo de tejido cardíaco dañado (12).

En cuanto al tejido neuronal, la bioimpresión 3D se centra en obtener modelos para el estudio de las enfermedades neurológicas que no pueden ser estudiadas en modelos animales (12). La bioimpresión 3D permite formar geometrías de manera muy controlada y con una localización muy precisa. Gracias a esto es posible mimetizar el ambiente neuronal que se caracteriza por las comunicaciones célula a célula gracias a la distribución morfológica de las células (10). La reparación de zonas neuronales dañadas y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas son las futuras aplicaciones en este campo (12).

Los trasplantes hepáticos son la última alternativa de tratamiento en enfermedades como hepatitis, cirrosis, etc. No obstante, no es una solución exenta de riesgos ya que puede haber complicaciones quirúrgicas, rechazo, etc. Además, del problema añadido de la falta de donantes. La bioimpresión 3D no ha desarrollado aún un hígado artificial, sobre todo por la incapacidad de cultivar los hepatocitos durante muchos días. Una de las aplicaciones ha sido el desarrollo de micro-hígados como dispositivos para el estudio de fármacos etc (9).

Otra enfermedad crónica de gran prevalencia es la diabetes, principalmente la diabetes de tipo 2. Estos pacientes terminan necesitando insulina como tratamiento. Por esto, el nuevo enfoque en la investigación se centra en obtener células madre pluripotenciales que se puedan diferenciar a células beta (células secretoras de insulina). Mediante la bioimpresión 3D se ha conseguido generar, *in vitro*, millones de células beta sensibles a glucosa para su implante en ratones diabéticos (9).

Tabla 1. Avances en la bioimpresión de tejidos poco perfundidos, como el hueso, cartílago y piel. Los avances se encuentran enumerados en orden de descubrimiento, siendo los últimos los más recientes. Se informa de la técnica de bioimpresión utilizada, los componentes de la biotinta, los hechos más relevantes del proceso y el resultado obtenido tras la bioimpresión.

AFS: células madre derivadas de líquido amniótico. **ALP:** fosfato de alcalina. **BMP2:** proteína morfogénica ósea. **GAGS:** glucosaminoglicanos. **GelMa:** gelatina metacrilato. **HUVEC:** células endoteliales humanas de las venas del cordón umbilical. **LAB:** bioimpresión asistida por láser. **MHDS:** sistema de extrusión con múltiples cabezales. **hMSCs:** células madre mesenquimales. **MtoBS:** sistema de extrusión denominado construcción de tejido/órgano de cabeza múltiple. **PCL:** policaprolactona. **PLGA:** ácido poli DL láctico-glicólico. **VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular. **Saos-2:** línea celular derivada de osteosarcoma humano.

Tejido Órgano	Tipo de bioimpresión	Componentes de la biotinta	Proceso	Resultado	Ref
Hueso	1. Micro-estereolitografía.	Microesferas de PLGA cargadas con BMP-2.	Implantación de andamios 3D en ratas con defectos craneales.	Alta expresión de ALP y osteocalcina. Capacidad de diferenciación celular.	(9).
	2. Síntesis por microondas seguido de impresión láser/metal.	Fosfato tricálcico y osteoblastos humanos.	Estudios in vitro e in vivo en ratas con defectos femorales.	Alta resistencia a la compresión, aumento de la densidad celular, biocompatibilidad y osteogénesis.	(9).
	3. Síntesis por microondas seguido de impresión láser/metal.	Fosfato tricálcico con estroncio y magnesio.	Comparación con los andamios de fosfato tricálcico puros.	Aumento de la formación de hueso, mineralización, porosidad y de los niveles de colágeno tipo I y osteocalcina en suero de rata en comparación a los anteriores.	(9).
	4. Modelo de deposición fundida (FDM).	Policaprolactona.	Andamios de PCL con poros nanoestructurados mediante FDM y liofilización.	Osteoconductividad y osteointegración buena tras implantación.	(9).
	5. Inyección.	Ácido fosfórico con colágeno tipo I.	Se probó el potencial osteogénico in vivo. Fabricar andamios de colágeno-fosfato cálcico.	Hueso sintético prometedor, biocompatible y mecánicamente estable como sustituto de injerto.	(9).
	6. Extrusión.	2 tipos de hidrogeles: - GelMA al 5% conjugado con VEGF y HUVEC y hMSC, (GelMA LOW). - GelMa HIGH (10%) + VEGF+ nanoplaquetas de silicato.	Impresión de fibra vascular central de GelMA LOW-VEGF y alrededor, la biotinta del GelmMA HIGH + VEGF.	HUVEC y hMSC cuando se cultivan conjuntamente en las fibras bioimpresas, son viables y con capacidad de proliferación celular y vasculogénesis. Nuevo enfoque en la reparación de grandes defectos óseos.	(9).
	7. Extrusión.		CNF modificaba los hidrogeles favoreciendo la impresión. Los Saos-2	Desarrollo de tinta multicomponente en impresión de hueso. Importancia de la	

		Hidrogeles de alginato de gelatina con nanocelulosa a base de madera (CNF) y vidrio bioactivo (BaG).	eran más viables en geles con poco BaG y baja viscosidad.	viscosidad para la bioimpresión por extrusión y la viabilidad celular.	(9).
Cartilago	1. Híbrido: inyección-electrohilado.	PCL/ plurónico y gel de condrocitos.	Construcción de cinco capas alternas (3 de PCL/plurónico y 2 de condrocitos). Implante en ratones inmunodeficientes.	Formación densa de colágeno rodeada de condrocitos.	(10)
	2. Fotopolimerización	Hidrogel condrocitos humanos impreso en tapón osteocondral.	Implantado en espacio dorsal subcutáneo de ratón (1-2 meses).	Resistencia cercana a la del cartilago. Viabilidad 91%. Crece el contenido en GAGs y la vascularización periférica.	(10).
	3. Extrusión con múltiples cabezales.	Marco PCL, alginato y condrocitos.	Implantado en región dorsal subcutánea de ratones.	Viabilidad 85%. PCL aporta estabilidad mecánica. Se forma cartilago y fibrillas de colágeno tipo II y GaGs.	(10).
	4. MtoBS con múltiples cabezales.	Solución de atelocolágeno, hidrogel DAH-HA, células mesenquimales derivadas de cornete humano, células estromales y factor de crecimiento.	Implantación en la articulación de la rodilla de conejo durante ocho semanas.	Se obtuvo una construcción con tejido recién generado e integrado con los tejidos nativos cercanos.	(10).
Piel	1. Extrusión.	Las MSC o AFS suspendidas en geles de fibrina/colágeno.	Implantado en herida de ratón inmunodeficiente.	Mayor regeneración tisular y formación vascular los tratados con AFS y MSC vs control.	(10).
	2. Láser.	Capas de fibroblastos/colágeno y queratinocitos/colágeno en una hoja de Matriderm.	Incubación sumergido una noche e implantación subcutánea posterior en ratón.	Vascularización en los bordes de las heridas. Diferenciación de queratinocitos.	(10).
	3. Extrusión	Hidrogel de PGC con HFF1. Quitosano es hemostático y antimicrobiano.	Fabricar una estructura similar a la piel con la dermis y la epidermis.	Hidrogel con buena fidelidad de forma y compatibilidad con aplicación de bioimpresión.	(9).
	4. Combinación de extrusión e inyección.	Fibroblastos dérmicos y queratinocitos.	Extrusión de fibroblastos dérmicos e inyección de queratinocitos epidérmicos.	Modelo compatible tras dos semanas. Nueva estrategia de impresión combinada.	(9).
	5. Bioimpresión <i>in situ</i> basada en inyección	Fibroblastos humanos y queratinocitos Fibroblastos y queratinocitos porcinos	Implantado en ratón desnudo (prueba). Implante en herida grande porcina	Cobertura inmediata y adecuada de las heridas. Cobertura rápida de las heridas.	(9).

Tabla 2. Avances en la bioimpresión de tejidos y órganos perfundidos, como las válvulas del corazón, vasos sanguíneos, tejido cardíaco, nervioso, hígado y páncreas. Los avances se encuentran enumerados por orden de descubrimiento, siendo los últimos los más recientes. Se informa de la técnica de bioimpresión utilizada, los componentes de la biotinta, hechos más relevantes del proceso y resultado obtenido tras bioimpresión.

AH: ácido hialurónico. **DA:** diacrilato. **GelMA:** gelatina metacrilato. **hCMPC :** células progenitoras de cardiomiocitos derivadas de corazón humano. **hMSC:** células madre mesenquimales. **HUVECS:** células del endotelio de las venas del cordón umbilical humano. **Matrigel:** nombre comercial de una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por las células de sarcoma de ratón. **MEC:** matriz extracelular. **NSCs:** células madres neuronales. **pdECM:** Matriz extracelular derivada de tejido pancreático. **PEG:** polietilenglicol. **PEGTA:** polietilenglicol tetracrilato de cuatro brazos. **PEO:** polióxido de etileno. **PPO :** polióxido de propileno. **RGD:** tripéptido Arginina-Glicina-Aspártico. **VGEF:** factor de crecimiento del endotelio vascular.

Tejido Órgano	Tipo de bioimpresión	Componentes de la biotinta	Proceso	Resultado	Ref
Válvulas corazón	1. Impresión 3D/fotorreticulación.	Hidrogeles de PEG-DA con alginato sembrados de células intersticiales de válvula aórtica porcina.	Las válvulas impresas tuvieron viabilidad casi del 100% durante 21 días.	Impresión de válvulas que permiten el crecimiento celular.	(12).
	2. Estereolitografía	Hidrogeles de gelatina y alginato con células del músculo liso sinusal (SMC) y células intersticiales de la válvula aórtica (VIC).	Impresión de conductos de la válvula aórtica con hidrogeles que incorporaran dos tipos de células.	SMC y VIC mostraron una alta tasa de supervivencia.	(14, 15).
Vasos sanguíneos	1. Extrusión	Esferoides celulares y agarosa junto con células del músculo liso y fibroblastos.	Barra de agarosa como platilla alrededor de la cual se depositaron los esferoides.	Estructuras tubulares de una o dos capas con múltiples tipos celulares.	(14, 17).
	2. Extrusión con jeringuilla.	Hidrogel de AH, PEG con cuatro brazos, células murinas.	Impresión del hidrogel alrededor de una plantilla de agarosa (material de sacrificio).	Estructuras tubulares con diámetro de 500 micras, elevada densidad celular y viabilidad.	(14, 18).
	3. Extrusión.	Cristales de carbohidrato en medio de cultivo con HUVECs. Alginato, PEG, fibrina y Matrigel para el andamio.	Los cristales se utilizan como material de sacrificio al disolverse en el medio de cultivo.	Control independiente de la geometría y estructura de la red vascular con microcanales perfundibles.	(19).
	4. Extrusión.	Modelo de agarosa. HUVECS. Andamio de GelMA.	La agarosa puede eliminarse por aspiración o manualmente.	Forma capas de endotelio, mejora el transporte y la viabilidad celular.	(20).
	5. Inyección.	Gelatina (material de sacrificio). HUVECs. Andamio de colágeno.	Calentar la gelatina a 37°C durante la bioimpresión.	Viabilidad celular superior al 90%.	(21).

	6.Extrusión coaxial multicapa.	GelMA, sodioalginato y PEGTA.	Sistema de extrusión avanzado	Bioimpresión directa de estructuras vasculares profundidas.	(12).
	7.Extrusión con múltiples cabezales. Impresión omnidireccional(ODP).	Biotinta fugitiva de Pluronic F127: PEO-PPO-PEO + HUVEC + andamio de GelMA.	Impresión de filamentos de tinta fugitiva dentro del gel fotocurable que actúa de soporte.	Obtención de redes microvasculares ramificadas, con microcanales de 200 a 600 um de diámetro, tras licuefacción de la biotinta.	(12, 16).
Tejido cardíaco	1. Inyección de tinta modificada.	Cardiomiocitos adultos felinos primarios y células musculares cardíacas (HL-1).	Impresión de las células en capas de alginato/gelatina reticuladas con cloruro cálcico.	Impresión de "medio corazón" con capacidad contráctil tras estímulo. Técnica que permite fabricar y jerarquizar tejidos cardíacos.	(9).
	2. Láser (LIFT).	HUVEC y hMSC sembradas en patrón de poliéster uretano urea.	Parche cardíaco implantado en ratas con infarto de miocardio.	Formación de vasos sanguíneos y mejora en corazones infartados. Estudio clave en este campo.	(9).
	3. Inyección.	Células progenitoras de cardiomiocitos de corazón humano en gel de alginato.	Demostrar que hCMPC pueden ser impresas y cultivadas sin alteraciones.	Primer paso hacia la creación in vitro de una construcción cardíaca bien diferenciada.	(9).
	4. Extrusión.	Células madre mesenquimales.	Parche cardíaco para inducir vascularización, remodelación y supervivencia celular tras trasplante.	Obtención de patrón celular que favorece la vascularización. Efectos terapéuticos de neovascularización.	(9).
	5.Impresión basada en microfluidos (MPH).	Cardiomiocitos derivados de iPSC y HUVEC.	Fabricación de modelos in vitro e in vivo de tejido cardíaco vascularizado.	Primer estudio que muestra desarrollo vascular en tejido trasplantado usando células endoteliales.	(9).
	6.Extrusión.	Hidrogel personalizado formado por MEC de tejido graso con CM-iPSC.	Procesamiento de la ECM obtenida de la biopsia con las células de impresión mediante extrusión.	Obtención de parches cardíacos grueso y perfusibles de células autólogas. Parches con las mismas propiedades celulares, inmunológicas y bioquímicas que las del paciente.	(9).

Nervioso	1. Inyección.	Hidrogel de colágeno y células madre neuronales murinas y gel de fibrina con VEGF.	Viabilidad celular del 92%. Con cambios morfológicos y proliferación celular.	Uso del método para evaluar comportamiento celular. Aplicación en regeneración neuronal.	(9).
	2. Extrusión.	Hidrogel de goma gellan modificada con péptido RGD(RGD-GG) con células neuronales corticales primarias.	Imprimir estructuras cerebrales en varias capas. Viabilidad 70%.	Obtención de modelo 3D in vitro para investigar la formación de circuitos neuronales, lesiones cerebrales y más.	(9).
	3. Extrusión.	Hidrogel de células madre neuronales sembradas en dispersión de PU2.	Impresión de ocho capas de células del SNC con PU2 e implantación en pez cebra con cerebelo lesionado.	Podría curar el daño neuronal del pez cebra. Método con potencial para mejorar la función del SNC en enfermedades neurodegenerativas.	(9, 10).
	4. Microextrusión.	Hidrogel de alginato con células corticales frontales del SNC, carboximetilquitosano y agarosa.	Formación de mini tejido neuronal.	Células viables y con diferenciación in situ a neuronas funcionales formando redes sinápticas.	(9).
	5. Láser.	Solución conductora de polietilendioxifeno , sulfonato de poliestireno para el hidrogel.	Hidrogel conductor para registrar señales biológicas y estimular tejidos para el tratamiento de trastornos neurológicos.	Hidrogel conductor para regular e inducir el comportamiento celular que es indispensable en la regeneración neuronal.	(9).
	6. Microextrusión.	Biotinta sin relleno formada por hidrogeles de HA y PU. Alginato para control.	Comparar HA y PU con alginato en impresión de tejidos neuronales blandos.	Los hidrogeles de HA y PU son biocompatibles en la impresión que se puede usar en ingeniería regenerativa.	(9).
	7. Reticulación sumergida.	Células de Schwann en hidrogeles de alginato modificado con RGD, HA y fibrina.	Buena viabilidad de los andamios cargados de células.	Posibilidad de apoyar la reparación de tejido nervioso periférico	(9).
Hígado	1. Inyección.	Células madre pluripotenciales inducidas y células madre embrionarias.	Las células madre se diferencian a hepatocitos post-impresión.	Resultado positivo para HNF4A y secreción de albúmina. Compatibles para generar mini-hígados para probar drogas.	(9).

	2.Extrusión con múltiples boquillas.	Hepatocitos de rata, HUVECS y fibroblastos humanos de pulmón (HLFs) en biotinta de colágeno con marco de PCL.	Impresión de la biotinta con los hepatocitos.	Los hepatocitos secretaban albúmina y sintetizaban urea. El entorno favorecía la funcionalidad y supervivencia.	(9, 10).
	3. Extrusión con múltiples boquillas.	Células madre derivadas de tejido adiposo y hepatocitos primarios.	Fabricación de precursores de órganos complejos con sistemas vasculares ramificados.	Fabricación de construcciones vascularizadas con canales internos predefinidos. Potencial uso en otros tejidos.	(9).
Páncreas	1. Extrusión.	Fibroblastos dérmicos de rata (RDF) con alginato y células insulino beta TC3 de ratón.	Fabricación de hebras de tejido sin andamio con potencial para regenerar el tejido pancreático.	Expresaron marcadores específicos, alta viabilidad, rápida capacidad de fusión y cilindridad.	(9).
	2.Extrusión.	PLGA y PCL con 5-fluorouracilo (5FU) (fármaco para el cáncer de páncreas).	Parches biodegradables implantados en ratones para liberar 5-FU.	Suprime el crecimiento del cáncer durante más de 4 semanas.	(9).
	3. Microextrusión.	Hidrogel de pdECM a partir de tejido pancreático porcino y alginato y colágeno.	Cultivo de células islote en la biotinta de pdECM para conseguir un ambiente óptimo.	Los niveles de insulina secretados por los islotes en medio con glucosa fueron mayores que en los medios sin glucosa.	(9).

5.5 Desafíos y Limitaciones

Para optimizar la técnica de bioimpresión hay que tener en cuenta unos parámetros que determinan todo el proceso. Uno de los más importantes es la **viscosidad** de la biotinta que es determinante en la bioimpresión basada en extrusión y por inyección ya que requieren cabezal. Si la viscosidad es muy elevada podría obturar la boquilla provocando que las presiones ejercidas afecten a la viabilidad celular, además de la incorrecta o imposibilidad de impresión. Por otro lado, viscosidades demasiado bajas podrían hacer que las estructuras colapsaran una vez bioimpresas. Esto se relaciona con la **concentración** de las biotintas. Concentraciones muy elevadas disminuyen la viabilidad celular, que también decrece cuanto mayor sea el **tiempo** de impresión, lo que afecta sobre todo a las células más activas metabólicamente como los hepatocitos y las células musculares.

De la biotinta también dependen aspectos como la fidelidad de la forma y la resolución obtenida tras impresión (9, 11). Para la aplicación clínica es necesario que las biotintas sean insolubles *in vivo* y en cultivo, que tengan una tasa de degradación congruente con la regeneración del tejido y que favorezcan el crecimiento celular (9).

Una vez superado esto, es necesario abordar puntos como:

- **Vascularización e inervación.** Para implantar los órganos y tejidos impresos, la bioimpresión debe ser capaz de mimetizar la red vascular del órgano o tejido en cuestión (6).
- Los **desafíos tecnológicos** con respecto a las bioimpresoras se incluye la necesidad de aumentar la resolución, la velocidad de impresión, la biocompatibilidad y la ampliación de escala. En la actualidad sólo la bioimpresión por láser puede logra resoluciones a escala micrométrica (11). La complejidad de los órganos hace necesaria la utilización de bioimpresoras con múltiples boquillas que ensamblen células homogéneas y heterogéneas con diferentes polímeros para que sean lo mas similares a estos (6).

La bioimpresión 3D a **gran escala** también presenta muchos desafíos. Para poder generar grandes cantidades de tejidos y órganos que tengan aplicaciones clínicas es necesario estandarizar todo el proceso de bioimpresión (11).

- Las células a utilizar deben de estar bien caracterizadas. Es decir, deben de ser compatibles con el donante, y en el caso de usar células alogénicas, es imprescindible utilizar lotes de las mismas características. El problema de utilizar células autólogas, es que puede que la cantidad disponible no sea suficiente y sea necesario recurrir a la expansión celular, lo que conlleva tiempo.
- Los tratamientos individualizados son más caros, lo que condiciona la promoción de la técnica tanto por la sanidad pública como por la privada. Además, se necesita personal altamente cualificado en diferentes materias (informática, biología, medicina, ingeniería..) para la producción pero también, para la conservación, transporte.. del órgano o tejido previo implante (1).
- Las consideraciones éticas necesitarán ser estudiadas para evitar la exposición de la información privada del paciente ya que la aplicación clínica sería multidisciplinar y muchos profesionales podrían manejar esa información. Junto con esto, sería necesario estudiar y definir el marco regulatorio en el que se encontraría el uso clínico de órganos y tejidos bioimpresos (9).

6 CONCLUSIÓN

El desarrollo de la bioimpresión 3D como una nueva técnica de fabricación por adición, ha permitido que la tecnología de impresión en tres dimensiones encuentre una nueva aplicación en el campo de la medicina. La posibilidad de imprimir estructuras similares a órganos y tejidos, depositando una biotinta formada por células capa por capa, ha demostrado tener un gran potencial de aplicación.

Con el objetivo de favorecer la supervivencia celular se han desarrollado diferentes tipos de biotintas y se han adaptado las técnicas de bioimpresión. El continuo estudio de los investigadores ha logrado un avance sin precedentes en las aplicaciones clínicas de las estructuras bioimpresas, logrando imprimir estructuras con una cierta complejidad como los parches cardíacos a partir de células madre o el desarrollo una bioimpresora de piel *in-situ*.

Sin embargo, el desarrollo de órganos y tejidos totalmente funcionales y listos para la implantación aún no se ha conseguido. Es determinante conseguir la optimización de la técnica teniendo en cuenta unos parámetros que condicionan todo el proceso, además de conseguir la correcta vascularización e inervación de las estructuras bioimpresas.

La aplicación clínica y personalizada a gran escala de los órganos y tejidos bioimpresos es un desafío que aún tiene por definir muchos aspectos técnicos, éticos y legales.

7 BIBLIOGRAFÍA

- 1.Roche FI. Bioimpresión en la medicina del futuro. 2019.
- 2.Serrano Lopez DRC, Jose R.; Fernandez-Garcia, Raquel ; Perez-Ballesteros, Luiz Fernando; Ballesteros Papantonakis, Maria Paloma; Lalatsa, Katerina. Market demands in 3D printing pharmaceuticals products. 2019.
- 3.Lau G-KS, M. Ink-Jet Printing of Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS). Micromachines (Basel). 2017.
- 4.Papaioannou TG, Manolesou D, Dimakakos E, Tsoucalas G, Vavuranakis M, Tousoulis D. 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication. Acta Cardiol Sin. 2019;35(3):284-9.
- 5.Dzobo K, Motaung K, Adesida A. Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review. Int J Mol Sci. 2019;20(18).
- 6.Wang X. Advanced Polymers for Three-Dimensional (3D) Organ Bioprinting. Micromachines (Basel). 2019;10(12).
- 7.Ji S, Guvendiren M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. Front Bioeng Biotechnol. 2017;5:23.
- 8.Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. Biomater Sci. 2018;6(5):915-46.
- 9.Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. Biomaterials. 2020;226:119536.
- 10.Hong N, Yang GH, Lee J, Kim G. 3D bioprinting and its in vivo applications. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018;106(1):444-59.
- 11.Ma X, Liu J, Zhu W, Tang M, Lawrence N, Yu C, et al. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. Adv Drug Deliv Rev. 2018;132:235-51.

- 12.Zhang S, Wang H. Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs. SLAS Technol. 2019;24(1):70-8.
- 13.Zhang YS, Yue K, Aleman J, Moghaddam KM, Bakht SM, Yang J, et al. 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. Ann Biomed Eng. 2017;45(1):148-63.
- 14.Xia Z, Jin S, Ye K. Tissue and Organ 3D Bioprinting. SLAS Technol. 2018;23(4):301-14.
- 15.Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. J Biomed Mater Res A. 2013;101(5):1255-64.
- 16.Wu W, DeConinck A, Lewis JA. Omnidirectional printing of 3D microvascular networks. Adv Mater. 2011;23(24):H178-83.
- 17.Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. Biomaterials. 2009;30(30):5910-7.
- 18.Skardal A, Zhang J, Prestwich GD. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. Biomaterials. 2010;31(24):6173-81.
- 19.Miller JS, Stevens KR, Yang MT, Baker BM, Nguyen DH, Cohen DM, et al. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. Nat Mater. 2012;11(9):768-74.
- 20.Bertassoni LE, Cecconi M, Manoharan V, Nikkhah M, Hjortnaes J, Cristino AL, et al. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. Lab Chip. 2014;14(13):2202-11.
- 21.Lee VK, Lanzi AM, Haygan N, Yoo SS, Vincent PA, Dai G. Generation of Multi-Scale Vascular Network System within 3D Hydrogel using 3D Bio-Printing Technology. Cell Mol Bioeng. 2014;7(3):460-72.