



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

Bioimpresión 3D y sus aplicaciones en el campo  
de la salud

3D Bioprinting and its applications in health

Autor

**Diego Amigot Baldero**

Directora

**Dra. M<sup>a</sup> Pilar Alcalde Lapiedra**

Facultad de Medicina

Universidad de Zaragoza

Curso académico 2021 / 2022



## Índice

<b>1. Resumen y palabras clave.....</b>	<b>Pág. 2</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>Pág. 3</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>Pág. 4</b>
3.1. Diseño.....	Pág. 4
3.2. Estrategia de búsqueda.....	Pág. 4
3.3. Criterios de inclusión y exclusión.....	Pág. 5
<b>4. Introducción.....</b>	<b>Pág. 6</b>
<b>5. Bioimpresión 3D.....</b>	<b>Pág. 8</b>
5.1. Ingeniería de tejidos y concepto de bioimpresión 3D.....	Pág. 8
5.2. Breve historia de la bioimpresión 3D.....	Pág. 10
5.3. La revolución de la bioimpresión 3D.....	Pág. 11
5.4. Biotintas.....	Pág. 12
5.5. Proceso de bioimpresión.....	Pág. 14
5.5.1. Preprocesamiento.....	Pág. 14
5.5.2. Procesamiento.....	Pág. 14
5.5.3. Postprocesamiento.....	Pág. 15
5.6. Aplicaciones de la bioimpresión 3D.....	Pág. 16
5.6.1. Piel y tejidos blandos.....	Pág. 16
5.6.2. Aplicaciones cardiovasculares.....	Pág. 18
5.6.3. Aplicaciones en traumatología y ortopedia.....	Pág. 21
5.6.4. Otros campos.....	Pág. 22
5.6.5. Industria farmacéutica y nutrición.....	Pág. 24
5.6.6. Investigación.....	Pág. 27
5.6.7. Docencia.....	Pág. 28
5.7. Bioimpresión de órganos y trasplante.....	Pág. 29
5.8. Bioimpresión 4D.....	Pág. 32
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>Pág. 33</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>Pág. 34</b>

## 1. Resumen y palabras clave

### **Resumen**

La impresión en tres dimensiones (3D) es el proceso de manufactura de un objeto tridimensional con materiales que se disponen por capas. Dicho proceso, controlado informáticamente, se lleva a cabo mediante impresoras 3D. La bioimpresión 3D, por su parte, emplea como materia prima células y otros biomateriales a fin de crear tejido viable biológicamente. Desde 1988, este campo ha experimentado un crecimiento acelerado propiciado por el desarrollo tecnológico global. Actualmente, sus aplicaciones en el campo de la salud son múltiples: desde recambios para tejidos lesionados hasta prótesis específicas para un paciente, pasando por fármacos que se liberan en el organismo en respuesta a estímulos concretos. Con el objetivo de suponer una alternativa válida en el campo del trasplante de órganos, la investigación en bioimpresión 3D va encaminada a solventar las principales limitaciones que hoy por hoy presenta, principalmente relacionadas con la vascularización e inervación de los tejidos impresos. Con estos y otros retos por delante, la bioimpresión 3D se proyecta como una tecnología dispuesta a revolucionar la medicina tal y como la conocemos hoy en día.

### **Abstract**

Three-dimensional (3D) printing is the process of manufacturing a three-dimensional object with materials that are arranged in layers. Such process, which is computer-controlled, is carried out by 3D printers. As for 3D bioprinting, it uses cells and other biomaterials as a raw material to create biologically viable tissue. Since 1988, these topic has experienced an accelerated growth fueled by global technological development. Nowadays, its applications in the field of health are multiple: from replacements for damaged tissues to patient-specific prostheses, including drugs that are released in the body in response to specific stimuli. With the goal of representing a valid alternative in the field of organ transplantation, 3D bioprinting research is aimed at overcoming the main limitations that it presents today, mainly related to the vascularization and innervation of printed tissues. With these and other challenges ahead, 3D bioprinting is projected as a technology willing to revolutionize medicine as we know it today.

**Palabras clave:** bioimpresión 3D, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, medicina personalizada, trasplante de órganos.

**Keywords:** 3D bioprinting, tissue engineering, regenerative medicine, personalized medicine, organ transplantation.

## 2. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es realizar una investigación científica en base a la revisión de artículos actualizados sobre las técnicas de impresión 3D y sus múltiples aplicaciones en el campo de la salud. Esta tecnología, que lleva desarrollándose desde finales del siglo XX, ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, de forma que son cada vez más los usos que se le pueden conceder, en todos los ámbitos del desarrollo humano pero especialmente en el campo de la salud.

En este texto, se hará una breve presentación del funcionamiento de la impresión 3D y, más concretamente, la bioimpresión 3D, para, posteriormente, acabar revisando el uso que esta tecnología tiene a día de hoy en el campo de la medicina y la salud. Se comentarán las aplicaciones actuales, poniendo especial énfasis asimismo en lo que está por venir.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Diseño

Este texto comprende una búsqueda sistemática en torno a la bioimpresión 3D, la tecnología necesaria para llevarla a cabo, y sus implicaciones en el ámbito de la salud.

#### 3.2. Estrategia de búsqueda

Para el desarrollo de este trabajo, realizado entre los meses de febrero y mayo de 2022, se ha realizado una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos de acceso a través de internet, a saber, *Pubmed*, *Google Scholar*, *Dialnet* o la herramienta proporcionada por la Universidad de Zaragoza, *Alcorze*. Para garantizar una caracterización correcta de los índices de búsqueda, se ha hecho uso del buscador DeCS (Descriptores de Ciencias de la Salud) y su homólogo en inglés MeSH (*Medical Subject Headings*). Los términos de búsqueda principales han sido “Impresión Tridimensional” y “aplicaciones”, pero también “ingeniería de tejidos”, “ortopedia”, “historia”, “ética”, “farmacología”... La correspondencia entre términos DeCS y sus correspondientes términos MeSH se ilustra en la Tabla 1.

DeCS	MeSH
Impresión tridimensional	Printing, Three-Dimensional
Aplicaciones	Applications
Ingeniería de Tejidos	Tissue Engineering
Historia	History
Ética	Ethics
Farmacología	Pharmacology
Ortopedia	Orthopedics

Tabla 1. Términos de búsqueda. Fuente: elaboración propia.

Una vez seleccionados los términos, se diseñó un algoritmo de búsqueda combinando los mismos con ciertos operadores *booleanos* (especialmente “AND”). El algoritmo de búsqueda resultante, que se introdujo en *PubMed*, fue el siguiente:

**“(Printing, Three-Dimensional[MeSH Terms]) AND (applications)”**.

La búsqueda arrojó 3211 resultados, de forma que, a modo de acotación, se especificó que los términos debían aparecer específicamente en el título. El algoritmo resultante fue el siguiente:

**“(Printing, Three-Dimensional[MeSH Terms]) AND applications[Title)”**.

De esta forma, los resultados de la búsqueda se redujeron a 391 artículos, que, posteriormente, se filtraron atendiendo a la fecha de publicación, para incluir específicamente los trabajos publicados entre los años 2019 y 2022. Una vez hecho esto, y resultando la búsqueda en 255 artículos, se seleccionaron los más relevantes para el trabajo, mediante la lectura de los títulos y resúmenes de cada uno de los artículos.

En otras bases de datos, como *Google Scholar*, *Dialnet* o *Alcorze*, se siguió una estrategia de búsqueda similar, atendiendo a las características específicas de cada motor de búsqueda. Asimismo, se realizaron consultas sucesivas a las diferentes bases de datos, con términos de búsqueda específicos según el interés de cada apartado de trabajo (biotintas, cardiología, nutrición...).

Por último, se han incluido trabajos disponibles en la bibliografía de los artículos principales, siempre y cuando estos fueran relevantes y añadieran información de interés no disponible en el artículo principal.

### **3.3. Criterios de inclusión y exclusión**

Se han incorporado todos los artículos a texto completo, siempre que la información estuviese actualizada. Se han excluido los artículos que ofrecieran información poco contrastada, así como aquellos menos relevantes para el objetivo de este trabajo. Las búsquedas se plantearon tanto en español como en inglés.

## 4. Introducción

El desarrollo científico está en constante evolución. En el campo de la medicina, los avances se han ido sucediendo de manera vertiginosa durante las últimas décadas. Patologías que en el siglo pasado suponían una condena a muerte, ahora están erradicadas o causan un impacto mínimo en la salud de los individuos. Tanto es así, que la esperanza de vida global ha aumentado en casi 15 años desde el siglo XX. La tecnología, clave en la consecución de este hito, ha experimentado por su parte un desarrollo acelerado, y muchos de los avances en medicina y salud se han podido dar gracias a ella.

Uno de los campos clave en el desarrollo tecnológico es la ingeniería de tejidos. Esta tecnología, que evoluciona del campo del desarrollo de biomateriales, se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. Su objetivo es restaurar, mantener o mejorar los tejidos u órganos dañados. Dentro del campo de la ingeniería de tejidos, encontramos la bioimpresión 3D. Mediante el uso de células, proteínas y otros biomateriales, la bioimpresión 3D permite la creación *de novo* de modelos y sistemas biológicos, con capacidad estructural y funcional. Esta tecnología, que dio sus primeros pasos en 1988, con la impresión por primera vez de células vivas sobre una matriz, ha evolucionado hasta lo que es hoy en día, y supone actualmente una alternativa muy válida para dar solución a múltiples problemas en todos los campos relacionados con la salud.

Las principales aplicaciones en salud de la bioimpresión 3D, que se expondrán más adelante, quedan esquematizadas en la Tabla 2.



Piel y tejido adiposo	<b>Medicina regenerativa</b>
Miocardio	
Válvulas cardíacas	
Redes de capilares	
Hueso, cartílago, tendones, músculo	
Células gliales y células ganglionares de la retina	
Riñón y parches de uretra	
Medicamentos con varios fármacos y dosificaciones específicas	<b>Industria farmacéutica</b>
Liberación programable y sujeta a estímulos	
Comidas con nutrientes específicos, y a partir de materias primas poco habituales como las algas marinas o los insectos	<b>Nutrición</b>
<i>Organ-on-a-chip</i> : parches de tejido sobre los que probar fármacos en ensayos clínicos, estudiar efectos teratógenos...	<b>Investigación</b>
Impresión de tejido tumoral para estudiar su comportamiento y comprobar respuesta a quimioterápicos u otras terapias	
Impresión de modelos 3D para facultades o asesorar al paciente	<b>Docencia</b>
Modelos anatómicos y guías quirúrgicas para entrenar diferentes procedimientos	
Primeros pasos en la impresión de corazón, hígado y riñones funcionales para trasplante	<b>Órganos y trasplante</b>
Stents y otros dispositivos cuyas características morfológicas y funcionales cambian con el paso del tiempo	<b>Bioimpresión 4D</b>
Fármacos que se liberan en respuesta a estímulos concretos	

Tabla 2. Aplicaciones principales de la bioimpresión 3D. Fuente: elaboración propia.

## 5. Bioimpresión 3D

### 5.1. Ingeniería de tejidos y concepto de bioimpresión 3D

La ingeniería de tejidos comprende la fabricación de tejido viable fuera de un organismo vivo (*ex vivo*), por ejemplo, en un medio de cultivo (*in vitro*). En la mayoría de casos, se requiere de una matriz, ya sea natural o sintética, que haga las veces de “andamio”. En dicha matriz se inocula una línea celular, que posteriormente se cultivará hasta que se complete la maduración de tejido vivo. Para aplicar la ingeniería de tejidos al ámbito clínico, se requiere una matriz biodegradable, que actúe como soporte temporal para la proliferación de células, pero que luego involucre y permita al tejido en desarrollo seguir creciendo incluso después de la implantación. En contraste con las técnicas tradicionales en ingeniería de tejidos (que clásicamente sólo permitían utilizar una línea celular en cada procedimiento, debido a las limitaciones propias de la técnica), la bioimpresión 3D ofrece la posibilidad de fabricar tejidos u órganos, tanto autólogos como alogénicos, equivalentes a los humanos, esto es, con múltiples líneas celulares implicadas a la vez. (1)

La impresión 3D, también conocida como manufactura aditiva, es el proceso de fabricación, controlado por programas informáticos, de piezas tridimensionales con materiales que se disponen capa por capa. Dichas piezas se pueden obtener directamente mediante modelos de Diseño Asistido por Ordenador -CAD, por sus siglas en inglés, o, más específicamente en el caso de la biomedicina, mediante modelos anatómicos obtenidos por medio de imágenes 3D de tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética nuclear (RMN). (1)

Esta tecnología, que lleva desarrollándose de manera acelerada desde 1988, ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, tanto a nivel de perfeccionamiento de la técnica como a disponibilidad de la misma, no solo a nivel industrial sino también particular. Tanto es así, que la técnica de impresión 3D hoy en día se utiliza en incontables campos científicos, a saber: ingeniería mecánica y aeroespacial, arquitectura, industria alimentaria y textil... Además, resulta especialmente atractiva en el ámbito de la biomedicina, en la que cuenta con múltiples aplicaciones. Desde que en 2004 se produjera la primera impresión de tejido celular vivo, se han ido sentando las bases de lo que actualmente conocemos como bioimpresión 3D (1,2). La bioimpresión 3D utiliza células y otros biomateriales para formar nuevos tejidos y órganos que posteriormente se podrán utilizar en diversas aplicaciones biomédicas. Asimismo, el término engloba la impresión de implantes y prótesis a medida, modelos anatómicos, fármacos personalizados, e incluso *stents* u otros dispositivos utilizados en la práctica habitual. (3)

El proceso de bioimpresión 3D, que más adelante se comentará en profundidad, comprende tres etapas principales: preprocesamiento, procesamiento y postprocesamiento (3). Cada uno de estos pasos, que pueden ser subdivididos a su vez, requieren de un equipo, tanto tecnológico como de profesionales, altamente especializado. La Figura 1 expone, esquemáticamente, el proceso de bioimpresión 3D.

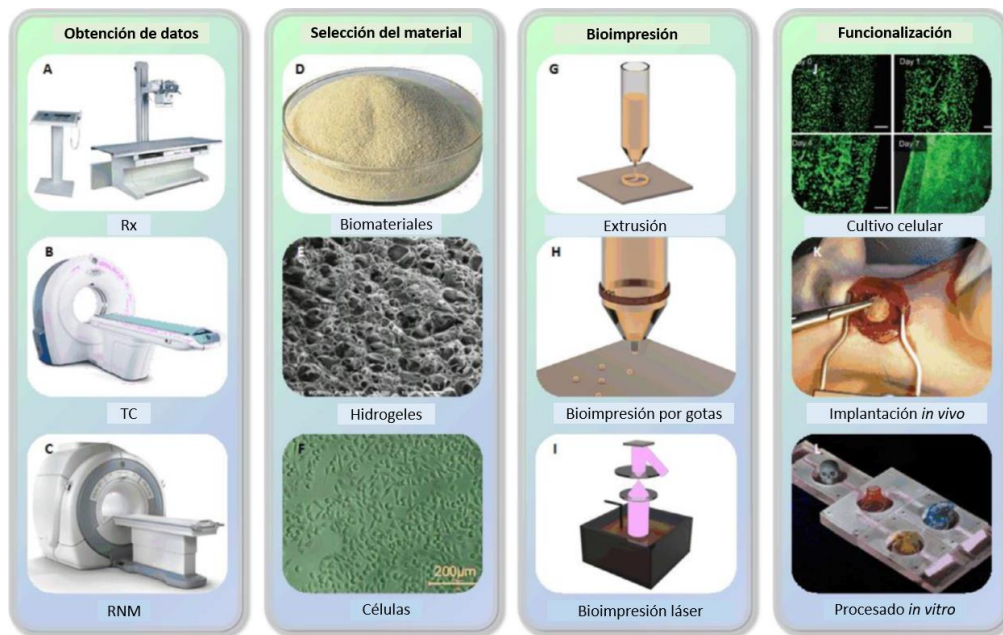


Figura 1. Proceso de bioimpresión 3D. Basado en el artículo de Gu Z et al (2), modificación propia.

## 5.2. Breve historia de la bioimpresión 3D

No se puede negar que las técnicas en bioimpresión 3D han evolucionado de forma significativa. A través de la Figura 2, haremos un repaso de los principales hitos que se han ido logrando en este campo.

En 1984, Charles Hull inventó la estereolitografía, técnica que permitía imprimir objetos 3D a partir de datos digitalizados. Este hecho puede constituirse como el nacimiento de la tecnología de impresión 3D. No sería hasta 1988 cuando se sentaron las bases de la bioimpresión 3D. Ese año, Klebe, usando una impresora HP (Hewlett-Packard®) fue capaz de depositar sobre una matriz las primeras células vivas, mediante tecnologías de citoscricción. En 1999, Odde y Renn utilizaron por primera vez la tecnología láser, que les permitió imprimir células vivas y disponerlas formando estructuras más complejas. En 2001, se dieron los primeros pasos en lo que a bioimpresión de órganos se refiere, cuando Karzynski sembró células uroteliales sobre un andamio al que había conferido forma de vejiga humana. En 2002 y 2003 se hicieron avances técnicos: se inventó la tecnología de bioimpresión 3D basada en la extrusión, y se comercializó por primera vez una impresora capaz de utilizar biotintas, respectivamente. En 2004 se imprimió tejido compuesto solo por células, sin necesidad de utilizar una matriz que hiciera las veces de andamio. Sería en 2009 cuando se pudiera imprimir tejido vascular sin necesidad de andamiaje. En 2012, se imprimió por primera vez *in situ*, es decir, sin necesidad de imprimir y cultivar el tejido previo a la implantación, sino haciendo que el receptor (en este caso, un ratón), hiciera las veces de biorreactor de forma que el tejido madurara una vez implantado. Durante los siguientes años, los avances se sucedieron de forma acelerada. En 2012 se imprimió cartílago articular e hígado, en 2014 tejido cardiaco...

En 2019 Noor et al imprimieron un corazón funcional a pequeña escala y, un año más tarde, en 2020, Lee et al, utilizando la tecnología FRESH, empezaron a imprimir recambios cardiacos de colágeno a escala humana. (1,2,4,5)

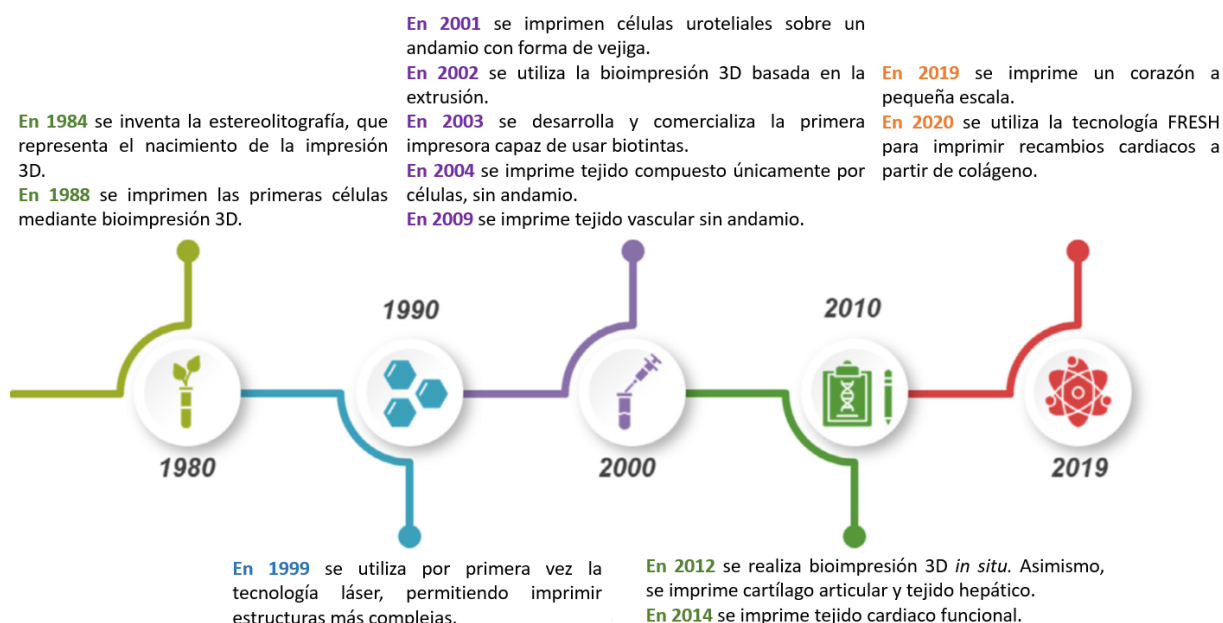


Figura 2. Breve historia de la bioimpresión 3D. Basada en el artículo de Gu Z et al (2), modificación propia.

### 5.3. La revolución de la bioimpresión 3D

Como se ha comentado anteriormente, una de las limitaciones tradicionales de la ingeniería de tejidos, es que sólo permite utilizar un tipo de célula para cada procedimiento. La bioimpresión 3D, que admite el uso simultáneo tanto de múltiples líneas celulares, como de otros biomateriales, supone un paso de gigante en la fabricación de tejidos complejos (y, por tanto, órganos) ya que estos están formados, precisamente, por la sinergia de diferentes tipos de células. Más concretamente, y en contra de lo que *a priori* se pudiera suponer, la bioimpresión 3D permite la inclusión de los diferentes tipos de células, tanto en la misma capa como en zonas de la pieza diametralmente opuestas. (1)

Si pensamos en la anatomofisiología de los tejidos humanos, podemos dilucidar cierto paralelismo. No solo es que en un mismo tejido se impliquen multitud de líneas celulares sino que, además, dichas células cumplen funciones totalmente diferentes. Por poner un ejemplo, en un corte histológico de un intestino delgado, podemos encontrar, desde tejido epitelial cilíndrico simple, hasta tejido conectivo, glandular, neuroendocrino, muscular, endotelial...

Es por todos conocido el impacto que ha supuesto internet sobre todos los ámbitos de la vida humana, desde que surgiera por primera vez en la década de 1960. A nivel científico, esta revolución ha permitido que diferentes investigadores en diversos puntos del mundo estuvieran conectados de manera casi instantánea, pudiendo trabajar de forma coordinada. Más concretamente, y hablando ya de bioimpresión 3D, el estar interconectado con diferentes partes del mundo es prácticamente imprescindible, de forma que diferentes equipos de investigación pueden estar concentrados en un mismo objetivo. Como se ha comentado previamente, el proceso de bioimpresión 3D recorre una serie de pasos, desde la obtención de las imágenes para diseñar el modelado 3D, hasta el tratamiento de dichas imágenes para adecuarlas a la pieza que se persigue imprimir. Es en este punto donde la riqueza de internet tiene su mayor impacto. Por poner un ejemplo: se obtienen imágenes a través de RMN de la válvula tricúspide de un paciente en un hospital de España. Dichas imágenes se envían de forma instantánea a un laboratorio en Japón, donde un equipo especializado las recibe y procesa, y diseña a partir de ellas el modelo CAD a imprimir mediante impresoras 3D. Una vez hecho esto, envía el modelo de forma telemática a un laboratorio en España donde, ahora sí, se imprime la pieza que va a parar al paciente.

#### 5.4. Biotintas

De forma análoga a las impresoras convencionales y a las impresoras 3D, que utilizan, respectivamente, tinta y termoplásticos, la bioimpresión 3D requiere de un material especial, que se amolde a las necesidades específicas de dicha técnica. Se acuña, de esta manera, el término de biotinta.

Una biotinta puede definirse como un polímero, principalmente compuesto por células, que se selecciona como materia prima para la bioimpresión por su biocompatibilidad y sus favorables propiedades reológicas. La reología, a su vez, es la rama de la física que estudia el modo en que los materiales se deforman o fluyen en respuesta a fuerzas o tensiones aplicadas (6). Dicha biotinta necesitará, asimismo, de un material que actúe como sustrato sobre el cual se fusionen las células. Este material recibe el nombre de biopapel, y los más comúnmente utilizados en la práctica habitual son el alginato, el colágeno, el ácido hialurónico y diferentes tipos de hidrogeles. Asimismo, se está investigando últimamente en el uso, como biopapel, de nanocelulosa y de policaprolactona. (3,7,8)

Es esencial, para el proceso de bioimpresión, el contar con biotintas altamente especializadas y adecuadamente formuladas. Algunas de las características que definen una buena biotinta son las siguientes (7,8):

- *Imprimibilidad*: es fundamental que el material empleado como biotinta tenga la capacidad de ser dispuesto capa por capa en el proceso de bioimpresión. Como se verá más adelante, durante la impresión se generan temperaturas altas, y las biotintas están sometidas, mientras dura el proceso, tanto a dichas temperaturas como a esfuerzos mecánicos. Por tanto, es esencial seleccionar células y materiales lo suficientemente resistentes como para soportar estos esfuerzos. (8)
- *Biocompatibilidad*: una biotinta no debe causar una respuesta inmunitaria o inflamatoria. Además, en ocasiones debe ser biodegradable, por lo que los productos de su biodegradación no pueden ser tóxicos o dañinos para el paciente.
- *Propiedades mecánicas favorables*: las biotintas deben proporcionar la fuerza y elasticidad requeridas, deformándose cuando sea necesario y volviendo a la posición original después; de esta forma, sirven como reemplazos útiles para los tejidos nativos del paciente. Son propiedades especialmente importantes la fuerza tensional y la rigidez, sobre todo en aplicaciones como la ortopedia.

Junto con el desarrollo de la bioimpresión 3D, también se ha ido evolucionando en la fabricación de biotintas. Las nuevas generaciones de biotintas, respecto de las utilizadas en el pasado, tienen una mayor fidelidad en la impresión, lo que resulta en una precisión micrométrica a la hora de plasmar sobre el sustrato el diseño generado por software. Además, tanto estas como el biopapel son capaces de soportar mayores esfuerzos mecánicos, gracias a las propiedades reológicas comentadas anteriormente. Esto es especialmente interesante en el uso aplicado al ámbito de la traumatología y la ortopedia, ya que se pueden generar prótesis y recambios tisulares con capacidades mecánicas análogas a las prótesis convencionales, y con la ventaja de que cuentan con una mayor biocompatibilidad (9). Las biotintas actuales, asimismo, son capaces de modificar sus propiedades en respuesta a estímulos externos (7,10). Este concepto, que se conoce como bioimpresión 4D, se desarrollará más adelante.

En la Tabla 3 se presentan algunos ejemplos de biotintas y sus aplicaciones.

<b>Biotinta</b>	<b>Aplicaciones</b>
Alginato	Múltiples
Ácido hialurónico	Múltiples
Gelatinas	Múltiples
Matriz extracelular descelularizada	Múltiples
Células madre mesenquimales	Piel y tejidos blandos
Tejido adiposo descelularizado	Piel y tejidos blandos
Tejido muscular liso	Cardiovasculares
Condrocitos	Regeneración osteocartilaginosa
Osteoblastos	Regeneración osteocartilaginosa
Hepatocitos	Trasplante hepático
Policaprolactona, alcohol polivinílico	Industria farmacéutica
Alimentos: frutas, verduras, carne, pescado, algas marinas, insectos...	Nutrición

*Tabla 3.* Algunas biotintas y sus aplicaciones. Fuente: elaboración propia.

### 5.5. Proceso de bioimpresión

La bioimpresión implica la disposición, capa por capa, de una biotinta de características especiales. Dicha biotinta, progresivamente, se reticulará y formará una matriz de hidrogel que brinde soporte estructural a las células y demás componentes no celulares que se irán incrustando en su interior. En contraposición con la impresión 3D tradicional, en estas técnicas tanto la matriz de soporte como las células se depositan de forma simultánea. (11,12)

Es conveniente señalar que un producto de bioimpresión no es un tejido o un órgano al uso. Por ello, requiere de un periodo de cultivo *in vitro*, que variará dependiendo del tipo de tejido generado. Dicho periodo es imprescindible para la diferenciación, remodelado y maduración del tejido, el cual, una vez superado este proceso, será potencialmente apto para la implantación en un ser vivo (1). La incubación del tejido se puede realizar, bien en un biorreactor *in vitro*, de forma que madure antes de ser implantado, bien en el propio cuerpo del sujeto, madurando de esta forma *in vivo*. (7)

A continuación se presentarán las tres etapas principales en el proceso de bioimpresión, comentando asimismo las diferentes técnicas disponibles actualmente, y sus principales ventajas e inconvenientes.

#### 5.5.1. Preprocesamiento

El preprocesamiento es la fusión de una bioimagen o imagen de la estructura anatómica y el modelado CAD para obtener un dibujo técnico conocido como plano cianotipo. Esta etapa requiere principalmente de un buen sistema de *software*, ya que el conseguir un buen resultado final depende de haber logrado primeramente un diseño detallado, preciso y completo en el ordenador. Todo esto implica tener la información espacial precisa y compatible con la computadora de la localización de células en el órgano 3D o la dirección de cada componente celular o extracelular del tejido u órgano que se desea construir. Requiere, asimismo, un diseño específico para cada determinado paciente (utilizándose para tal efecto técnicas de ultrasonidos y de bioimagen clínica del órgano). La principal limitación en este punto es que las imágenes biomédicas todavía no han alcanzado un nivel histológico y celular óptimo. (3)

#### 5.5.2. Procesamiento

En la etapa de procesamiento se combinan la biotinta y el biopapel siguiendo las indicaciones del ordenador (que, a su vez, se basa en el diseño de la pieza) mediante el uso de la impresora 3D. En esta etapa, es esencial contar con un buen *hardware*, con la capacidad de imprimir la pieza con la precisión requerida. Existen diversas técnicas de bioimpresión 3D, que se comentan a continuación: (3)



#### 5.5.2.1. Bioimpresión asistida por láser

Las bioimpresoras que utilizan esta técnica están constituidas por tres componentes: una fuente láser pulsada, un blanco o cinta sobre el que se imprimen las células, y un sustrato que recoge el material a imprimir. El material orgánico (moléculas o células) se prepara en un medio de cultivo (que suele ser una solución líquida), y se deposita en la superficie de la cinta, que suele estar constituida por una película metálica. El impulso láser induce la vaporización de dicha película, y da como resultado la producción de un chorro de solución líquida que se va depositando en gotas sobre una capa de revestimiento húmedo. Existe una modalidad de la bioimpresión láser, la estereolitografía, que utiliza luz ultravioleta. Las ventajas de esta técnica son la gran resolución de impresión (cuenta con una precisión nanométrica), así como que permite una mejor viabilidad de las células que otras técnicas. Su principal limitación es el tiempo de impresión, más largo que con el uso de otras técnicas; además, es más complejo imprimir materiales heterogéneos mediante la bioimpresión láser. (3,7)

#### 5.5.2.2. Impresión térmica por medio de cartuchos y biotinta

Esta técnica es muy similar al modo de trabajo de las impresoras convencionales de escritorio. Consiste en depositar pequeñas gotas de biotinta (de volúmenes de alrededor de un picolitro), en un plato de cultivo. Utilizando la impresión térmica, las gotas de tinta son producidas por una burbuja que fuerza la gota a salir hacia el sustrato. Como ventajas, esta técnica presenta un coste bajo, un tiempo de impresión corto y una alta resolución en la impresión. Por el contrario, es la técnica que más daña a las células (por las altas temperaturas alcanzadas), y solo permite trabajar con biotintas líquidas. (3,7)

#### 5.5.2.3. Extrusión

La técnica de extrusión es la más utilizada en bioimpresión 3D, gracias a su versatilidad y disponibilidad. En lugar de imprimir gota por gota, esta técnica deposita continuamente microfilamentos de biotinta, que puede ser tanto sólida como líquida o gelatinosa, constituyendo esto una gran ventaja sobre otras técnicas. Además, la extrusión es la técnica que mejor maneja la impresión de materiales heterogéneos. La Figura 3 esquematiza la técnica de extrusión. (2,3,7)

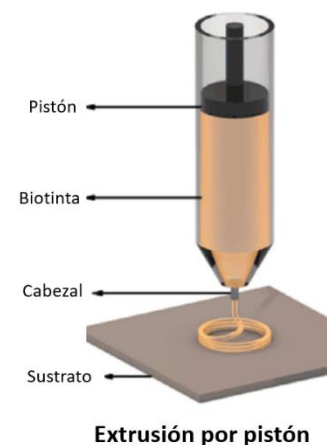


Figura 3. Técnica de extrusión mediante pistón. Basado en el artículo de Gu Z et al (2), modificación propia.

#### 5.5.3. Postprocesamiento

El postprocesamiento comprende los procesos de maduración del tejido impreso. Requiere de un biorreactor y un biomonitoreo constante del proceso, de forma que se asegure la viabilidad y la supervivencia del tejido. Esta etapa, como se ha comentado, se puede producir *in vivo* o *in vitro*. En el segundo caso, puede ser necesario exponer al tejido a estímulos que induzcan su maduración. (3)

## 5.6. Aplicaciones de la bioimpresión 3D

Las aplicaciones de la bioimpresión 3D pueden dividirse en cuatro categorías principales: biología celular, investigación farmacológica, investigación en oncología y medicina regenerativa. Se pueden emplear impresoras 3D para generar tejidos sobre los que luego estudiar fenómenos de crecimiento celular, transgénesis, comportamiento y toxicidad de diversos fármacos sobre los mismos, comportamiento de tumores y el efecto que sobre ellos provocan diferentes terapias oncológicas... Sin embargo, es quizás la medicina regenerativa donde mayor implicación tienen las impresoras 3D. Como se verá a continuación, ya se ha descrito la fabricación de tejido funcional nervioso, cardíaco, hepático, óseo y cartilaginoso...

A continuación, se presentarán las principales implicaciones que presenta la bioimpresión 3D en varios ámbitos de la salud. Los apartados principales corresponden a los campos donde más se ha investigado hasta la fecha; hay apartados menores cuya función es aproximar tangencialmente al lector a las aplicaciones que la técnica presenta en otros campos.

### 5.6.1. Piel y tejidos blandos

La bioimpresión 3D tiene especial relevancia en el ámbito de la medicina regenerativa de piel y tejidos blandos. Actualmente, la cirugía plástica emplea diversos tipos de injertos cutáneos y colgajos para cubrir defectos de la piel que hayan podido quedar dañados tras diferentes agresiones, como accidentes, quemaduras, cirugías, infecciones... La técnica de bioimpresión 3D ofrece la posibilidad de generar piel a partir de un cultivo de células cutáneas del propio sujeto que, a modo de “parche”, se establecen como una alternativa muy válida a los métodos que se emplean actualmente, especialmente teniendo en cuenta los riesgos e inconvenientes para el paciente que entrañan.

La piel es un tejido complejo compuesto por varios tipos de células y estructuras, como las glándulas sudoríparas o los vasos sanguíneos. El principal problema que entraña la bioimpresión de piel es su grosor, que en la mayoría de estudios realizados hasta la fecha es un factor limitante de cara a la vascularización del tejido. Sin embargo, en los últimos años se han realizado numerosos avances a este respecto, consiguiendo resultados satisfactorios tanto *in vivo* como *in vitro*. (2,7)

Concretamente, tanto Skardal et al (4) como Michael et al (13), implantaron en ratones, esto es, *in vivo*, sendos tejidos cutáneos bioimpresos para cubrir defectos congénitos en la piel de los ratones. Ambos estudios presentaron resultados significativos, ya que se comprobaron diferencias sustanciales entre los grupos de ratones en los que se había implantado el tejido impreso a partir de células madre mesenquimales o derivadas del fluido amniótico, con respecto al grupo control, que solo había recibido un gel de colágeno y fibrina, pero sin células (ver Figura 4). Además, en el segundo estudio, se advirtió que se había producido una proliferación de vasos sanguíneos desde el lecho de la herida hacia el nuevo tejido (ver Figura 5).

Lee et al (14) cultivaron *in vitro* piel impresa, morfológica y biológicamente similar a la piel humana, y con una altísima viabilidad celular. A los 14 días desde la siembra en el medio de cultivo, se observó una capa de epidermis muy densa con una capa de dermis escasamente poblada (ver Figura 6).

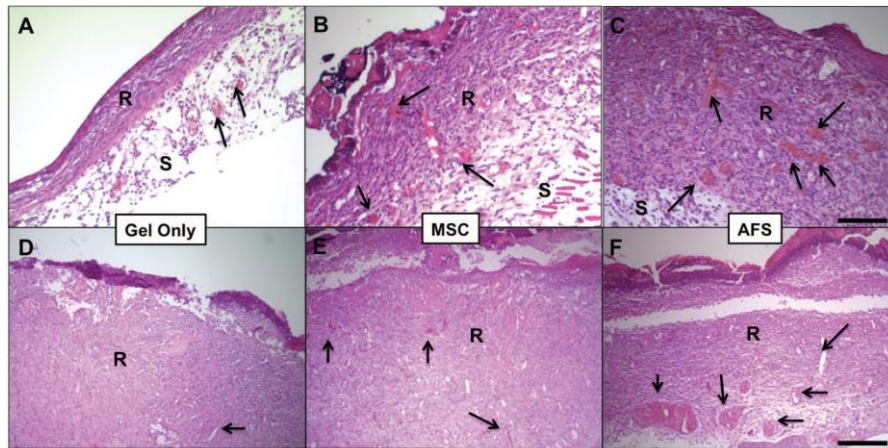


Figura 4. MSC (células madre mesenquimales); AFS (células madre de líquido amniótico). (4)

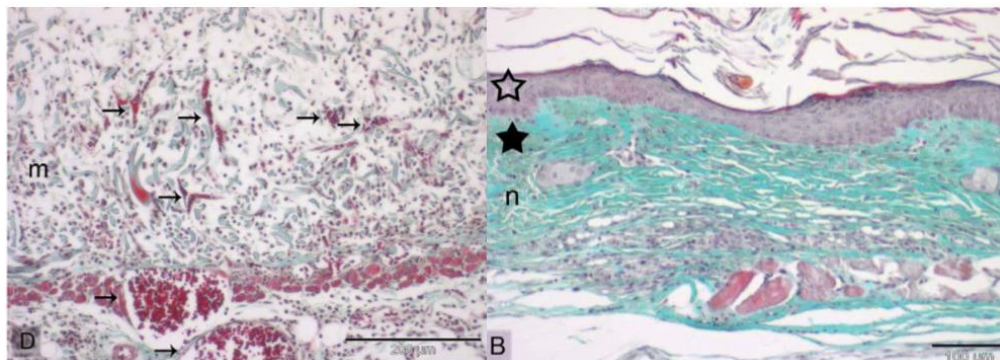


Figura 5. Epidermis (☆) con fibroblastos y fibras de colágeno (★). Proliferación de vasos sanguíneos (→). (13)

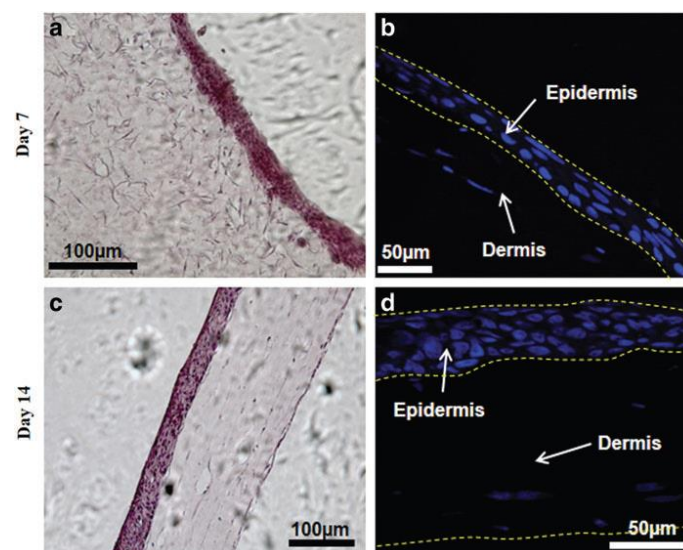


Figura 6. En las imágenes inferiores, se observa la proliferación epidérmica, dispuesta encima de una dermis menos densamente poblada. (14)

El tejido adiposo, clave para la reconstrucción de tejido blando en cirugía plástica, también ha sido investigado. En uno de los estudios más prometedores, Pati et al (15), utilizando una matriz de tejido adiposo descelularizado y una biotinta compuesta por células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, imprimieron estructuras que posteriormente implantaron en ratones. Dicho tejido, que no inducía inflamación o citotoxicidad en los ratones, demostró ser capaz de remodelarse y formar tejido adiposo propiamente dicho en torno a él.

#### 5.6.2. Aplicaciones cardiovasculares

La medicina cardiovascular es una de las áreas donde la bioimpresión 3D ha experimentado un mayor crecimiento. Las implicaciones de la técnica en este ámbito incluyen principalmente el miocardio, las válvulas cardíacas y los grandes vasos. Por otra parte, recientemente se está avanzando en el desarrollo de parches de tejido cardíaco que permitan monitorizar niveles de fármacos en el torrente sanguíneo, y evaluar la toxicidad de fármacos involucrados en ensayos clínicos. Además, en otras aplicaciones, como en el trasplante de órganos, se requiere de la creación de sistemas de vascularización que permitan la viabilidad de los mismos. (8,16)

Como en el resto de aplicaciones de la bioimpresión 3D, el primer paso a realizar es la obtención de imágenes que sirvan como modelo. En el sector cardiovascular, las principales pruebas de imagen que se emplean a tal efecto son la TC y la RMN pero también, y de forma más específica, la ecocardiografía transtorácica y transesofágica (17). La elección de una u otra prueba de imagen depende de la situación concreta, por ejemplo, se ha visto que la RMN es superior al resto en la obtención de imágenes de tejidos blandos. Es por ello que es utilizada principalmente para la creación de cámaras cardíacas y modelos de grandes vasos, así como para la reconstrucción de tumores intracardíacos (8,16). Otro paso clave en el preprocesado es, una vez obtenidas las imágenes, discriminar entre estructuras propiamente cardiovasculares y tejido circundante, excluyendo por tanto tejido irrelevante a tal efecto, como hueso o pulmón.

A continuación se resumirán las implicaciones directas de la bioimpresión 3D en medicina cardiovascular:

#### **Bioimpresión 3D de miocardio funcional**

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en todo el mundo, y no solo como consecuencia del evento agudo, sino también por las secuelas producidas por el mismo. La mayoría de causas de insuficiencia cardíaca pueden atribuirse al déficit o disfunción de cardiomiocitos, las células musculares que, en conjunto con tejido conectivo, componen el miocardio. Se ha propuesto que el propio envejecimiento está asociado con el deterioro de tejido miocárdico, con una estimación de 1 gramo de pérdida de cardiomiocitos al año. La capacidad de regeneración del tejido miocárdico es escasa; además, en el progreso de la enfermedad cardíaca, la matriz

conectiva que estructura el miocardio se va sustituyendo paulatinamente por tejido cicatricial hipofuncionante. (8,16,18,19)

La ingeniería de tejidos y, por supuesto, la bioimpresión 3D, persigue ser capaz de regenerar tanto los cardiomiocitos como el tejido conectivo miocárdico. Los resultados de los diferentes trabajos publicados en este campo son muy prometedores, ya que varios de ellos ya han demostrado la capacidad de generar tejido miocárdico viable. (20–24)

Zhu et al (20) desarrollaron una biotinta que contaba entre sus componentes con nanovarillas de oro, confiriendo a la estructura propiedades conductivas eléctricas, de manera análoga al funcionamiento fisiológico de un miocardio. Una vez cultivado el tejido, se comparó la capacidad de transmitir el impulso eléctrico entre este y otros que no contaban con el componente de oro, y se obtuvieron resultados mejores en el primer caso.

Gaebel et al (21) investigaron el desarrollo de un parche cardiaco mediante bioimpresión 3D que fue capaz de generar una red vascular en corazones de rata infartados, mejorando la vascularización incluso en la zona infartada. Park et al (22) obtuvieron resultados similares, combinando dos poblaciones de células madre diferentes.

Bejleri et al (23) centraron su estudio en la bioimpresión de un parche cardiaco que pudiera ser utilizado en pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas, especialmente por fallo derecho.

Chachques et al (24), quizá han mostrado los resultados más esperanzadores hasta la fecha. Mediante la combinación de parches cardíacos y bandas helicoidales protésicas dispuestas alrededor del miocardio, consiguieron reducir el área de fibrosis de miocardio infartado, limitando asimismo la dilatación patológica del ventrículo y recuperando en cierta medida la forma elíptica funcional ventricular. Esta remodelación cardiaca permite mejorar tanto el llenado diastólico como la función sistólica cardiaca.

### **Bioimpresión 3D de válvulas cardíacas**

La disfunción de las válvulas cardíacas es otra de las causas más frecuentes de insuficiencia cardíaca. Dichas válvulas, que están sometidas continuamente a fenómenos de estrés mecánico, son especialmente sensibles a la degeneración con el paso de los años. Actualmente, las cirugías de reemplazo valvular (ya sea por una prótesis biológica o mecánica) son la alternativa más extendida en el tratamiento de estos pacientes. (8,16,19)

De nuevo, la técnica de bioimpresión 3D se propone como una opción de tratamiento más que válida en el manejo de esta patología. La principal ventaja que ofrece, frente a las técnicas de ingeniería de tejidos convencionales, es la posibilidad de generar un reemplazo lo más parecido posible a las válvulas cardíacas humanas. Se utilizan



hidrogeles como andamio, y, al igual que en otras aplicaciones, dichos hidrogeles, que mimetizan de forma muy eficaz las propiedades biológicas del tejido blando cardíaco, se siembran con diferentes tipos celulares (principalmente, células intersticiales valvulares, tanto humanas como porcinas, y células madre mesenquimales) (16). La técnica de bioimpresión más utilizada para esta indicación es la de extrusión. (25,26)

Múltiples estudios han mostrado resultados favorables para la utilización de bioimpresoras 3D en la patología valvular cardíaca (16).

Duan et al (25) utilizaron diferentes tipos de hidrogeles como biotinta, llegando incluso a imprimir válvulas trivalvas completamente funcionales. Su análisis histológico y biomolecular demostró, tras la maduración del tejido, la presencia organizada y funcional de moléculas normalmente encontradas en las válvulas cardíacas (vimentina, periostina, colágeno tipo I...).

Van der Valk et al (26) se centraron en la patología valvular aórtica por calcificación. Utilizaron tejido valvular generado por impresoras 3D para estudiar cómo se comportaban las células en respuesta a diferentes estímulos osteogénicos. Además, analizando los resultados, encontraron que la calcificación valvular no estaba relacionada con la muerte celular por apoptosis.

Lee et al (5), en 2019, utilizando la técnica FRESH, imprimieron, a partir de colágeno, recambios para el corazón humano a todas las escalas, desde capilares y válvulas hasta el órgano completo (ver Figura 7).

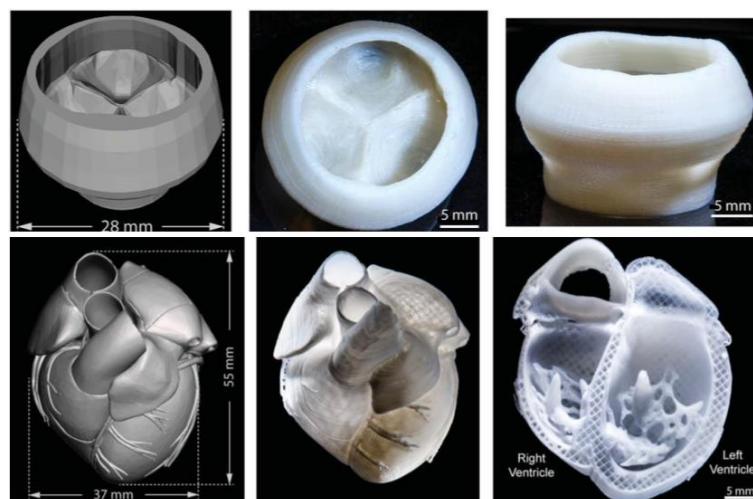


Figura 7. Arriba: válvula trivalva. Abajo: corazón humano. Las dos imágenes de la izquierda corresponden al modelo 3D digitalizado; las imágenes centrales y a la derecha corresponden a los modelos impresos. (5)

### **Bioimpresión 3D de tejido cardiaco para monitorización de fármacos**

Como se verá más adelante, la técnica de bioimpresión 3D tiene especial interés en el ámbito farmacéutico, sobre todo en lo que concierne al desarrollo de nuevos fármacos. La cardiotoxicidad de los fármacos a estudio, durante las fases preclínica y clínica del desarrollo, sigue siendo una de las causas principales de retirada del medicamento (27). La bioimpresión 3D, por tanto, ofrece la posibilidad de producir tejido cardiaco funcional a partir de células humanas, que reproduzca de manera fidedigna el comportamiento que los fármacos puedan tener en un paciente. Varios estudios se han centrado, por tanto, en generar microtejido de ventrículo izquierdo, lugar donde se desarrollan la mayoría de las patologías cardíacas, para posteriormente evaluar la toxicidad cardiovascular de distintos fármacos mediante el uso de biorreactores. Se ha estudiado la toxicidad de, entre otros, doxorubicina, verapamilo, isoproterenol, epinefrina o carbacol (16,28–30). En uno de los estudios, además, se demostró el carácter reversible de la toxicidad cardíaca, esto es, se observó que, al retirar el fármaco del tejido, este fue recuperando progresivamente su función. (30)

Asimismo, se ha propuesto el uso de las impresoras 3D para fabricar implantes, prótesis y otros dispositivos (*stents*, catéteres...) modificados para liberar progresivamente distintos tipos de fármacos que interactúen de forma sinérgica con los mismos. (16)

#### **5.6.3. Aplicaciones en traumatología y ortopedia**

La patología traumatológica y ortopédica es uno de los principales motivos de consulta tanto en atención primaria como en atención especializada. La bioimpresión 3D, como no podía ser de otra manera, tiene una especial implicación también en este campo.

El tejido óseo es el tejido duro sobre el que más se investiga en el área de la bioimpresión 3D. Fabricar un tejido cuyas propiedades mecánicas puedan compararse a las del hueso nativo es clave, y los resultados publicados hasta la fecha son favorables. Es especialmente importante, de forma análoga a la fisiología del hueso, que el tejido impreso tenga poros que permitan la adecuada vascularización, así como la proliferación en el tiempo. (2,7)

A partir de células madre amnióticas y una matriz de colágeno y alginato, de Coppi et al (31) desarrollaron un tejido que, tras el cultivo, se diferenció en tejido osteoblástico maduro capaz incluso de secretar fosfatasa alcalina. Para probar sus aplicaciones *in vivo*, se sometió al tejido a un ambiente osteogénico y se implantó de forma subcutánea en ratones inmunodeprimidos. 18 semanas después, se comprobó que el tejido había madurado lo suficiente como para presentar una densidad ósea mayor incluso que el fémur del ratón. Keriquel et al (32), por su parte, fueron capaces de, mediante bioimpresoras 3D, reparar defectos congénitos en la calota de ratones. En 3 meses desde la implantación del tejido, los ratones habían recuperado totalmente la forma normal de su calota.

La traumatología se beneficia especialmente de la capacidad que tiene la técnica de bioimpresión 3D de imprimir diferentes tipos de tejidos al mismo tiempo, empleando dos o más líneas celulares. Más concretamente, algunos estudios han sido capaces de imprimir a la vez tanto el tejido óseo propiamente dicho, como el tejido osteocondral de grandes articulaciones como la rodilla (7). Shim et al (33) publicaron uno de los estudios, a este respecto, más prometedores hasta la fecha. Utilizaron dos cabezales en el proceso de impresión, empleando uno para generar tejido cartilaginoso (a partir de condrocitos y una matriz de alginato), y el otro para generar tejido óseo (a partir de una línea celular osteoblástica). Kang et al (34), también en esta línea de investigación, generaron tejido óseo de la calota y el hueso mandibular, así como cartílago auricular.

También se ha podido generar tejido muscular y tendones funcionales. Merceron et al (35), valiéndose de la tecnología de la bioimpresión 3D, fabricaron unidades músculo-tendinosas muy similares a las humanas, elásticas en la parte muscular y rígidas en la parte tendinosa.

#### 5.6.4. Otros campos

En este apartado, se resumirán los avances más destacados que ha conseguido la bioimpresión 3D en otros campos de la medicina.

#### **Sistema nervioso**

La función principal del sistema nervioso es controlar el cuerpo conectando el cerebro al resto de tejidos y órganos. Por tanto, la fabricación de redes nerviosas es esencial en el proceso de regeneración tisular. Para ello, se genera un andamio nervioso fabricado *in vitro* en el lugar adecuado; dicho andamio proporciona un entorno óptimo para la proliferación de neuronas, y promueve la secreción de factores celulares que inducen la elongación axonal. (8,36)

La principal implicación de la impresión 3D en este campo, sin embargo, se da en el campo de la neurocirugía. Se pueden construir modelos 3D para, preoperatoriamente, entrenar en la anatomía del paciente al equipo quirúrgico. Esto se ha asociado con una reducción del tiempo de la cirugía, pérdidas de sangre, uso de anestesia y una mejora en la precisión intraoperatoria. Por ejemplo, en la cirugía de columna, se pueden diseñar modelos anatómicos del raquis del paciente, para estudiar y practicar los lugares de inserción de los tornillos en cirugías de artrodesis. (36)

Por otro lado, se pueden fabricar con impresoras 3D implantes personalizados para cada paciente; por ejemplo, en el caso de las discectomías, se pueden diseñar dispositivos intervertebrales que se ajusten específicamente al hueco que queda entre los dos cuerpos vertebrales intervenidos (ver Figura 8) (37). Asimismo, ya se ha descrito la fabricación de vértebras completas: Xu et al (38) imprimieron una vértebra C2 para reemplazar la de un paciente afectado de sarcoma de Ewing vertebral.



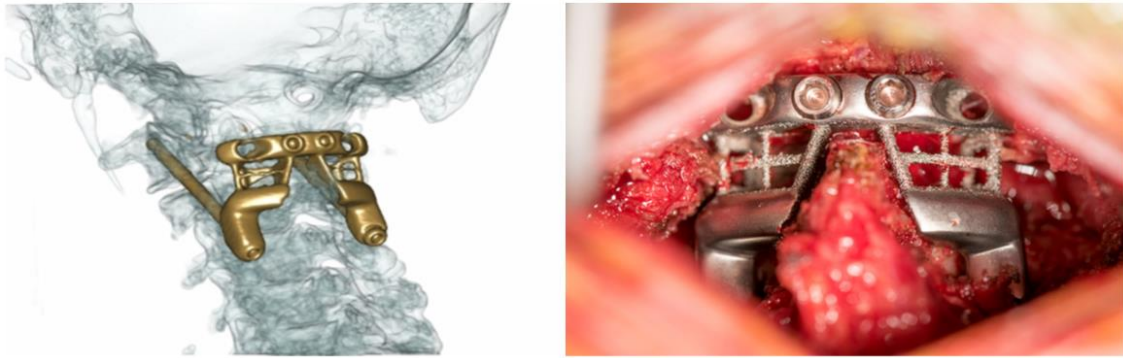


Figura 8. Izquierda: modelo computarizado de dispositivo intervertebral C1-C2.  
Derecha: implantación del dispositivo. (37)

### **Oftalmología**

En un estudio reciente, se ha podido imprimir células de la glía y células ganglionares de la retina de ratas. Se comprobó que las células que habían atravesado el proceso de impresión presentaban tasas de supervivencia y regeneración similares a las no impresas, sugiriendo así que el proceso no afectaba a la viabilidad de las mismas. Aunque pequeño, es un primer paso prometedor; sin embargo, la tecnología debe evolucionar si se pretende imprimir estructuras oculares complejas. (39)

### **Urología**

Como en otros campos quirúrgicos, una de las implicaciones principales de la impresión 3D en urología es la de la planificación preoperatoria. Se pueden fabricar modelos 3D de diferentes órganos, como la próstata, el riñón o la vejiga, que estén ajustados según la anatomía concreta del paciente. De esta forma, la planificación de la cirugía se puede realizar de forma más adecuada. (40)

Por otro lado, se investiga en la bioimpresión 3D de reemplazos para diferentes órganos relacionados con la urología, como los riñones. Little et al (40) crearon un riñón en miniatura, y demostraron su funcionalidad y supervivencia a lo largo de los días. Por su parte, Raya-Rivera et al (41) imprimieron parches biocompatibles para corregir defectos en la uretra de 5 pacientes con defectos estructurales en el órgano.

### **Oncología**

En este campo, varios estudios han demostrado que se pueden emplear las impresoras 3D para fabricar tejidos con invasión tumoral. Una vez impresos, se puede investigar el comportamiento de los mismos, y su respuesta ante diferentes estímulos (radiación, fármacos quimioterápicos, hormonas y otras moléculas de señalización celular...). (7,42)

Asimismo, se pueden imprimir modelos 3D de tumores de pacientes, obtenidos a través de técnicas de imagen, para planificar una posible cirugía y comprobar el compromiso de estructuras importantes (grandes vasos, plexos nerviosos...), ayudando así a la estadificación del paciente. (42)

#### 5.6.5. Industria farmacéutica y nutrición

##### **Industria farmacéutica**

El efecto de un medicamento sobre un individuo varía atendiendo a factores tanto fisionómicos como a otros (sexo, genética, hormonas...). Actualmente, las posibilidades para ofrecer fármacos personalizados son limitadas, principalmente por las dosis y combinaciones disponibles en el mercado. Las impresoras 3D se postulan como una tecnología revolucionaria en este sentido, ya que permiten combinar varios principios activos y excipientes en un mismo preparado, utilizando las dosis según convenga en cada caso. Varios estudios ya han avalado la eficacia y la seguridad de los fármacos diseñados con impresoras 3D, en contraparte a los producidos por métodos tradicionales. Además de permitir ajustar de forma precisa las dosis de cada medicamento, las impresoras 3D permiten combinar en un solo comprimido varios fármacos diferentes, incluso con perfiles de liberación distintos. (2,43–45)

En esta técnica, se emplean una gran variedad de polímeros biodegradables y biocompatibles, como la hipromelosa, la policaprolactona o el alcohol polivinílico. Dichos componentes, junto con el resto de excipientes y los principios activos, componen el fármaco, cuya forma farmacéutica puede variar según la indicación. Hasta la fecha, se han logrado imprimir con éxito multitud de formas farmacéuticas, desde comprimidos, cápsulas y tabletas hasta implantes liberadores de fármacos, parches transdérmicos, supositorios e incluso dispositivos intrauterinos. Como en el resto de implicaciones de las impresoras 3D, multitud de técnicas se pueden aplicar al ámbito farmacéutico; sin embargo, quizás la que mayor utilidad tenga sean las técnicas de extrusión y estereolitografía. (43,44)

Las ventajas que implica la utilización de impresoras 3D en la industria farmacéutica son múltiples. A continuación se detallarán las más importantes (43–45):

- Titulación personalizable de dosis: utilización exacta de la cantidad de principio activo que se precise. Esto tiene un interés especial en medicamentos propensos a generar efectos secundarios con la primera toma o con incrementos de dosis (por ejemplo, efectos serotoninérgicos en los inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina). Las impresoras 3D permiten fabricar comprimidos que liberen de forma paulatina las dosis de inicio, y las vayan incrementando menos súbitamente que los fármacos actualmente comercializados.
- Mejora de adherencia al tratamiento. Quizás la principal ventaja de este tipo de fármacos, es la capacidad de combinar múltiples dosis de múltiples principios activos en un solo comprimido. Esto es especialmente interesante en el caso de ancianos o personas con algún tipo de limitación, en las cuales la polifarmacia implica una baja adherencia al tratamiento, principalmente por la dificultad que entraña manejar varios fármacos al mismo tiempo.

El mejor ejemplo lo ofrece la recientemente diseñada pastilla *5 en 1*, que combina, en un solo comprimido, 5 fármacos dispuestos en compartimentos diferentes, y con 2 perfiles de liberación independientes. Está compuesto por un

compartimento de liberación inmediata de aspirina e hidroclorotiazida, y tres compartimentos adicionales para la liberación sostenida de pravastatina, atenolol y ramipril. Esta presentación podría ser válida en la práctica habitual para pacientes cardiopatas seleccionados, que podrían tomar una sola pastilla en lugar de las cuatro o cinco habituales. (46)

- Liberación programable. Mediante el uso de ciertos materiales, como el PLGA (ácido poli(láctico-co-glicónico)), en la fabricación de la cápsula externa del medicamento, se puede inducir la liberación de los fármacos en respuesta a estímulos externos. Esto puede tener interés en patologías donde es clave que el fármaco actúe en el momento justo, por ejemplo, la hemicránea paroxística. Además, de forma análoga a los medicamentos tradicionales, se puede imprimir un fármaco diseñándolo para que se libere en un lugar específico del tracto digestivo, por ejemplo, el estómago o el colon, manteniéndose intacto hasta llegar a ese punto. Goyanes et al (47) diseñaron mediante impresoras 3D un fármaco a base de budesonida, que se liberaba específicamente en el colon, para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- Diseño de dispositivos e implantes. Se pueden fabricar diferentes dispositivos, como los parches transdérmicos o los implantes uterinos que, imbuidos de un fármaco, actúan de forma local. Ya se ha descrito, por ejemplo, el uso de impresoras 3D en la fabricación de anillos vaginales liberadores de progesterona que, con diferentes formas (de O, de Y, de M...) se adaptan mejor a la anatomía de cada paciente. (48)
- Mejoras estéticas de los medicamentos. Las impresoras 3D ofrecen la posibilidad de imprimir fármacos con formas especiales, o incluso grabar marcas en su superficie. Esto es interesante en el caso de personas invidentes, que podrían reconocer los fármacos al tacto. Asimismo, se pueden diseñar medicamentos con formas adaptadas a los niños, mejorando así su adherencia al tratamiento.
- Menor dependencia de excipientes y aditivos. Se ha demostrado que es posible imprimir fármacos sin necesidad de incluir excipientes; así, se reducen los costes en la producción, permitiendo asimismo la fabricación de comprimidos de menor tamaño, más fáciles por tanto de tragar.

La tecnología actual ya permite la fabricación de medicinas mediante impresoras 3D; sin embargo, la producción está limitada por aspectos técnicos, requiriéndose un tiempo significativo en la fabricación de una sola dosis de fármaco. Además, aunque las materias primas de las que están hechas los fármacos son relativamente baratas, el coste adicional que supone contar con un equipo de impresoras 3D implica que, hoy por hoy, esta no sea una tecnología rentable para un hospital o farmacia. (43)

Con todo ello, y mientras la tecnología se siga desarrollando, está previsto que la productividad mejore y los costes caigan, de forma que la fabricación en masa de fármacos con impresoras 3D pueda ser una realidad esta misma década. El primer hito ya se ha conseguido, con la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration*), agencia estadounidense de regulación de fármacos, del *Spritam*, un comprimido bucodispersable de levetiracetam que ya se comercializa en dicho país. (43,45)

## Nutrición

Desde 2007, en que se presentó la primera comida fabricada mediante impresoras 3D, esta tecnología ha ido evolucionando y ganando cada vez más adeptos en el campo de la investigación en nutrición. Se pueden imprimir, a partir de multitud de materias primas (carne, fruta, verdura, algas marinas, insectos...) una gran variedad de alimentos en diferentes presentaciones (en polvo, líquido, masa...). En el proceso de impresión 3D de comida, se empieza procesando las materias primas de forma que puedan pasar por los cabezales de las impresoras posteriormente (esto implica someterlas a procesos de molido, cocción, mezclado...). Una vez impresa, se realiza un postprocesado (horneado, congelado...) para dar la forma final al producto. Como tintas, se utilizan productos habituales de la cocina, es decir, lácteos, carne, verdura, fruta... siendo las más populares las patatas y el chocolate, por sus favorables características reológicas. (49)

Entre las ventajas que esta técnica entraña, encontramos principalmente las siguientes (49):

- Nutrición personalizada, pudiendo imprimir comida para cubrir las necesidades nutricionales específicas de un individuo o grupo de pacientes concreto (especialmente para aquellos que presentan disfagia o algún tipo de problema en la deglución).
- Nutrientes enriquecidos, con indicación en diversas enfermedades o como suplemento para pacientes desnutridos. Además, se puede añadir a la comida impresa probióticos o prebióticos, especialmente en el caso de pacientes con algún tipo de trastorno en el tracto digestivo.
- Reducción del desperdicio de alimentos, utilizando grupos de alimentos subestimados pero con gran capacidad nutricional (algas, insectos, sobras de la industria piscícola o cárnica...). De esta manera, se pueden crear alimentos hiperproteicos a partir de materias primas *a priori* poco demandadas en la industria culinaria.
- Mejora en la estética de los alimentos, haciéndolos más atractivos para grupos específicos de población, como los niños. En la Figura 9 se observa este concepto de forma más visual.



Figura 9. Chocolate impreso, utilizado como vehículo para fármacos en pacientes pediátricos. (49)

Por otra parte, se pueden diseñar alimentos aptos para pacientes con algún tipo de intolerancia (a la lactosa, al gluten, a frutos secos...). Como curiosidad, en 2017 la compañía WASP desarrolló una impresora 3D capaz de imprimir repostería sin gluten para personas celiacas, aprendiendo de un libro de recetas electrónico y utilizando toda la materia prima inicial, sin producir residuos en el proceso. Asimismo, se pueden utilizar estos alimentos como vehículos para fármacos, aprovechando sus capacidades biodegradables y biocompatibles, y suponiendo esto una mejora sustancial frente al uso de materiales sintéticos (de los que se componen la mayoría de fármacos habituales). Por ejemplo, en el estudio de Karavasili et al (50), se ha comprobado que combinar chocolate con paracetamol o ibuprofeno, para administrarlo a pacientes pediátricos, mejora su adherencia al tratamiento (ver Figura 9). (49)

Por último, merece un comentario especial el uso de la impresión 4D en la industria alimentaria. Como hemos visto anteriormente, la impresión 4D añade la dimensión temporal, de forma que el producto impreso cambia en respuesta a diferentes estímulos. Esto, aplicado al ámbito de la alimentación, permite crear productos que cambien de color, forma o sabor atendiendo a estímulos como el calor. (49,51)

Aún quedan muchos retos por delante en este ámbito, por ejemplo, imprimir comidas complejas con varios ingredientes, partes o texturas (por ejemplo, las hamburguesas), que requieran un procesado más sofisticado que el que actualmente pueden ofrecer las impresoras 3D. Además, existen limitaciones en las materias primas que se pueden utilizar, ya que tienen que tener unas propiedades fisicoquímicas específicas para ser impresas (viscosidad, conductividad térmica...). De esta forma, el rango de alimentos que se pueden imprimir se ve limitado. Aun con todo, parece que los avances en esta materia se suceden cada vez con mayor velocidad, de forma que en el futuro podamos contar con esta tecnología de forma habitual. (49)

#### 5.6.6. Investigación

La técnica de bioimpresión 3D también tiene un gran potencial en el ámbito de la investigación farmacéutica. Habitualmente, la eficacia y toxicidad de los fármacos se evalúan en estudios llevados a cabo en animales, los cuales no siempre predicen la respuesta que dichos fármacos van a tener en pacientes humanos. (16)

Como respuesta a ello, surge el denominado *organ-on-a-chip* (en castellano podría traducirse como “órgano en una placa”), que consiste en generar, a partir de cultivos celulares, una estructura que simule la funcionalidad de un órgano, y la respuesta que presenta al ser expuesto a diferentes estímulos. Así, se puede generar tejido hepático, cardíaco, pulmonar, renal... para someterlo a la exposición de fármacos, radiación ionizante, moléculas carcinógenas... (52). Con otro objetivo, un grupo de investigación desarrolló una placenta, para estudiar sobre ella cómo reaccionaban sus vasos sanguíneos en respuesta a diferentes estímulos, estudiando de esta manera la etiopatogenia de la preeclampsia del embarazo. (53)

#### 5.6.7. Docencia

Los modelos 3D son muy útiles en la educación y entrenamiento médico. Como hemos comentado previamente, se imprimen estructuras 3D para el entrenamiento quirúrgico, ya que permiten reproducir la anatomía de un paciente a intervenir, pudiendo así planificar mejor la cirugía. Además, se pueden ensayar intervenciones concretas: Von-Rundstedt (54) describió la creación de un modelo de silicona idéntico al de la cirugía real sobre el cual un grupo de cirujanos pudieron trabajar, entrenando así nuevas técnicas quirúrgicas. (55)

Por otro lado, se pueden fabricar una gran variedad de modelos 3D para dotar a los aprendices (estudiantes, residentes...) de un material de calidad sobre el que trabajar y practicar. Por ejemplo, el grupo de Hakmin Lee (56) creó modelos 3D de tumores renales que fueron entregados a un grupo de estudiantes de medicina para evaluar su utilidad como herramienta para reconocer el sitio en donde se asentaba la lesión. Los estudiantes, sorprendentemente, fueron capaces de determinar la ubicación exacta del tumor con la ayuda de los modelos 3D en un 70% de las ocasiones, frente al 47% de acierto que presentaban cuando sólo se les ofrecían las imágenes computarizadas. (55)

En cuanto al asesoramiento médico, se pueden imprimir modelos personalizados para explicar a los pacientes el procedimiento al que van a ser sometidos. En un estudio, se comparó mediante una encuesta el grado de entendimiento que presentaban dos grupos de pacientes en relación a la intervención que se les iba a realizar: a un grupo se les explicó mediante el uso de imágenes, para el otro grupo se emplearon modelos 3D. El análisis de los resultados del cuestionario reflejó diferencias significativas en el entendimiento del proceso a favor del grupo de los modelos 3D. (55,57)

### 5.7. Bioimpresión de órganos y trasplante

En las últimas décadas, la brecha entre donantes y receptores de órganos se ha ido incrementando, siendo cada vez más alto el número de pacientes que necesitan, ya sea de forma urgente o diferida, someterse a un trasplante para sobrevivir. En aras de solucionar esta situación, investigadores en diferentes áreas científicas han aunado esfuerzos para obtener órganos y tejidos equivalentes a los humanos, que sean apropiados para la implantación en un sujeto vivo. Esta necesidad sentó las bases de lo que hoy día conocemos como ingeniería de tejidos. No obstante, como introducción a este apartado, es preciso recalcar que la bioimpresión de órganos completos continúa siendo un reto, ya que aún no se ha conseguido imprimir un órgano que sobreviva el tiempo necesario *in vivo*. Los resultados conseguidos hasta la fecha, son, sin embargo, esperanzadores, especialmente en órganos como el corazón o el hígado. (1,8,16)

Los dos objetivos principales, por tanto, de la bioimpresión 3D de órganos son, por una parte, reproducir las características fisiológicas de los mismos, y por otra, conferirles la capacidad de sobrevivir y proliferar de forma controlada en el paciente una vez implantados, como si del órgano propio se tratase.

Como hemos ido viendo, la ingeniería de tejidos ha sido estudiada ampliamente con aplicaciones como el cartílago, hueso, piel o tejido vascular. La bioimpresión de órganos funcionales, sin embargo, requiere de la participación de múltiples líneas celulares componiendo diversas estructuras que, además, deben estar vascularizadas e innervadas. Los tejidos humanos, además de contar con células funcionales primarias, contienen otros tipos de células que brindan funciones de apoyo, estructurales o de otro tipo, están involucradas en la vascularización, o brindan un entorno esencial para el mantenimiento y desarrollo de las células primarias del tejido. Es, por tanto, mucho más complejo cumplir estos requisitos, por lo que se requiere de técnicas más sofisticadas que las vistas hasta ahora. Quizás sea esta una de las razones por las que, hasta la fecha, aún no se haya conseguido la supervivencia *in vivo* de un órgano bioimpreso. (8)

En la bioimpresión de órganos, es preciso un concienzudo preprocesamiento. Para ello, se empieza obteniendo imágenes mediante TAC, RMN o ecografía. Una vez digitalizadas, se construye el modelo CAD de la pieza a imprimir. En el postprocesado, es fundamental proporcionar un entorno biológico adecuado para la proliferación del órgano, de forma que este se vea sometido a señales mecánicas, químicas y biológicas que lo hagan madurar de forma adecuada para cumplir con su función. Los nuevos biorreactores de los que se dispone permiten a los tejidos una rápida maduración y un mejor desarrollo de la vascularización y de la innervación. Aún con todo, la irrigación sanguínea de las piezas impresas continúa siendo la mayor limitación hasta la fecha. (8,9)

Se ha establecido en 200  $\mu\text{m}$  la distancia máxima entre capilares y células, a partir de la cual estas empiezan a desarrollar fenómenos de apoptosis y muerte celular derivados de la hipoxia. Aunque, como hemos visto, los injertos impresos tienen capacidad intrínseca de angiogénesis (siendo sometidos, eso sí, a los estímulos indicados), este fenómeno *in vivo* es demasiado lento cuando se pretende escalar a la impresión de un



órgano. Si bien no es necesario fabricar directamente los capilares en el tejido, puesto que estos brotan autónomamente desde los vasos más grandes, el ritmo de angiogénesis se establece en alrededor de 1 milímetro a la semana *in vivo* lo que, como se ha comentado, es insuficiente para satisfacer la demanda del tejido (8,58). Por ello, ciertas líneas de investigación han optado por generar alternativamente canales “perfundibles” en el propio tejido, ya sea a escala micrométrica o superior, imitando una red vascular. Esto ha demostrado facilitar el flujo sanguíneo del injerto, permitiendo una mayor supervivencia del mismo. Con todo ello, se han desarrollado tres estrategias principales para favorecer la vascularización del órgano impreso: (8,59,60)

- Uso de *sacrificial templates*: se imprime, entretejido en el injerto, una matriz de tinta fugitiva (esto es, de un material que, expuesto al estímulo adecuado, se disuelve) que posteriormente, quedando hueca, será rellenada por sangre. Este concepto se ilustra de forma más visual en la Figura 10.
- Impresión directa de canales interconectados. Estos canales serán posteriormente colonizados por tejido vascular desde el pedículo más próximo.
- Impresión directa de redes vasculares. Método más utilizado, principalmente en lo que a tejidos de pequeño tamaño se refiere. Como se ha comentado, esta técnica tiene menor cabida en la impresión de órganos.

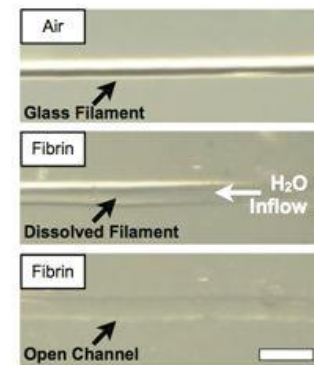


Figura 10. Se observa un filamento imbuido en la matriz, que posteriormente se disuelve y queda hueco. (59)

Con todo, parece que la vascularización constituye la principal limitación a día de hoy para la bioimpresión 3D de órganos para trasplante. Se debe seguir investigando en este apartado, si bien los resultados son prometedores.

A continuación, se presentará una breve exposición de los dos órganos sobre los que más se ha investigado en materia de bioimpresión, corazón e hígado:

### Corazón

Como se ha comentado en apartados anteriores, la bioimpresión 3D ofrece la posibilidad de crear parches de tejido cardíaco para reparar defectos congénitos o adquiridos en el mismo, ya sea compitiendo al miocardio o a las válvulas del corazón. Aun así, la impresión de un corazón 3D totalmente funcional sigue siendo un objetivo incumplido. El mayor avance en este campo hasta la fecha se ha realizado utilizando la técnica FRESH (*Freeform reversible embedding of suspended hydrogels*). Mediante este novedoso procedimiento, se ha podido imprimir un corazón funcional para un embrión de pollo de 5 días. Este avance, que *a priori* pudiera parecer poco relevante, es sin embargo un hito en este campo, ya que demuestra la capacidad de replicar las complejas estructuras trabeculares del corazón a través del modelado 3D. (61)



## Hígado

El hígado es el otro gran órgano donde se han realizado avances prometedores. Debido a su localización anatómica y a sus múltiples funciones (metabolismo, producción de hormonas, detoxificación...), el hígado es un órgano propenso a desarrollar múltiples enfermedades. Es, después del riñón, el segundo órgano más trasplantado a nivel mundial y, por ello, la ingeniería de tejidos juega un papel muy importante, en tanto que se puede postular como una alternativa válida de cara al futuro. (19)

De por sí, el hígado tiene una gran capacidad de regeneración autónoma, debido a la alta capacidad proliferativa de los hepatocitos. Es por ello especialmente interesante en materia de ingeniería de tejidos. Se han realizado numerosos ensayos, tanto *in vivo* como *in vitro*, con resultados favorables (8). Wang et al (62) desarrollaron uno de los primeros estudios a este respecto, generando tejido hepático a partir de hepatocitos y una matriz de gelatina y consiguiendo una viabilidad de 2 meses, durante los cuales el tejido desarrolló las funciones normales del hígado. Por otro lado, Shengjie et al (63), utilizando células estromales derivadas de tejido adiposo, hepatocitos y un hidrogel compuesto por gelatinas, alginato y fibrinógeno, consiguieron tejido hepático capaz de secretar albúmina, observando asimismo variaciones en los niveles de urea y aspartato aminotransferasa (ALT), que primero aumentaron y después disminuyeron progresivamente.

Además de generar tejido hepático con el fin último de utilizarlo *in vivo*, la bioimpresión 3D es útil en materia de investigación. Así, se puede imprimir tejido hepático para valorar la toxicidad que presentan sobre el mismo diferentes tipos de fármacos con metabolismo a este nivel. En dos estudios (64,65), además de evaluar en el tejido hepático impreso los niveles de albúmina,  $\alpha$ -1 antitripsina, transferrina y ceruloplasmina, se estudió la respuesta tóxica que ejercía en el mismo la exposición a acetaminofén (paracetamol). Por último, Zhang et al (66) generaron, sobre tejido previamente sano, áreas de carcinoma hepatocelular, investigando aspectos relevantes sobre el mismo.

Por concluir este apartado, y aunque la bioimpresión 3D de órganos completos funcionales continúa suponiendo un reto, ya se han hallado resultados prometedores en este ámbito, especialmente en lo concerniente a la fabricación de “órganos en miniatura” que tienen las mismas funciones que sus homólogos “de tamaño normal”. Se puede considerar que se han dado los primeros pasos en este campo y, aunque hay que seguir investigando, el camino parece ser el correcto. (8,66)

### 5.8. Bioimpresión 4D

La bioimpresión 4D incorpora, como cuarta dimensión, el tiempo. Mediante esta técnica, se pueden imprimir dispositivos o tejidos capaces de cambiar su forma o función en el tiempo al ser sometidos a diferentes estímulos, ya sean internos o externos. Dicho método, que requiere de un equipo muy similar al empleado en la bioimpresión 3D, sólo se diferencia de este en la necesidad de utilizar materiales “inteligentes”, esto es, que respondan ante los mencionados estímulos. La bioimpresión 4D ha demostrado un gran potencial en varias aplicaciones, que se detallarán a continuación. (67)

Los principales estímulos que se emplean en esta técnica son físicos (humedad, temperatura, luz, campos eléctricos o magnéticos...), químicos (variaciones en el pH o en la concentración de iones determinados...), y biológicos (variaciones en la concentración de glucosa, enzimas...). Una vez aparecido el estímulo, los objetos impresos pueden cambiar de forma (expandiéndose, contrayéndose, adaptando formas específicas...) y de función (en el caso de los tejidos, sometiéndose a fenómenos de fusión y maduración celular; en el caso de dispositivos, variando sus capacidades, por ejemplo, liberando un fármaco en un momento determinado). La principal ventaja de esta técnica es que permite generar, a partir de la impresión de objetos simples, estructuras que con el tiempo se volverán más complejas, y que no se habrían podido imprimir directamente mediante técnicas tradicionales de bioimpresión 3D. (67)

A continuación, se resumirán las principales aplicaciones de esta técnica (67):

- *Stents*: mediante la bioimpresión 4D, se pueden fabricar *stents* de tamaños muy reducidos para que su colocación quirúrgica sea menos invasiva. Una vez insertado, y en respuesta a estímulos como la temperatura o la concentración de ciertos iones, el *stent* recupera un tamaño normal para cumplir con su función. La principal implicación de este tipo de dispositivos es en la medicina cardiovascular, sin embargo, también se han desarrollado *stents* que se pueden colocar en la tráquea de pacientes con alguna patología a este nivel. Dichos *stents* se expanden para asegurar el paso del aire cuando detectan determinado nivel de estenosis. (68,69)
- *Fármacos*: se han desarrollado cápsulas que liberan el fármaco que contienen únicamente cuando son sometidas a determinados estímulos. Por ejemplo, Akbari et al (70) desarrollaron un medicamento compuesto por gentamicina, con una membrana que sólo se abría cuando el pH descendía a partir de un determinado rango. De esta forma, se liberaba el antibiótico cuando el dispositivo predecía que se había producido un crecimiento de bacterias en la zona.
- *Vasos sanguíneos*: como hemos visto en apartados anteriores, una de las principales limitaciones en bioimpresión 3D es la fabricación de vasos sanguíneos adecuados para vascularizar grandes cantidades de tejido. Con esta técnica, se puede imprimir una estructura vascular inicialmente plana, que en respuesta a temperatura o presión se pliegue sobre sí misma, generando una estructura tubular que permita el paso de sangre.

## 6. Conclusiones

La bioimpresión 3D ha emergido como una técnica capaz de revolucionar el mundo de la medicina y la salud, principalmente gracias a sus incontables aplicaciones en este campo. Tras la revisión de diversos artículos, se puede llegar a distintas conclusiones:

1. Desde que se describieran por primera vez, las técnicas en bioimpresión 3D han experimentado una gran evolución, permitiendo a múltiples grupos de investigación indagar en nuevas aplicaciones en el campo de la salud.
2. La gran variedad de biotintas de la que se dispone implica la posibilidad de imprimir prácticamente cualquier tejido humano. La investigación en materia de células madre y nuevas biotintas, asimismo, propicia este hecho.
3. Hasta la fecha, se han publicado múltiples estudios que presentan resultados prometedores, especialmente en lo que respecta a bioimpresión *in vitro*; también en la industria farmacéutica y en el campo de la nutrición.
4. En cuanto a la bioimpresión *in vivo*, y a la fabricación de órganos para trasplantes, los pasos dados hasta la fecha son adecuados, si bien aún queda mucho camino por recorrer. Las principales limitaciones en este aspecto son las características anatomofisiológicas vinculadas con la vascularización y la inervación tisular.
5. Otro de los inconvenientes que presenta la bioimpresión 3D es el elevado coste que estas técnicas entrañan. Si se pretende generalizar su uso, habrá que trabajar para abaratar los costes, de forma que las impresoras 3D se establezcan, también en el ámbito económico, como una alternativa competitiva frente a las técnicas habituales.
6. El desarrollo logrado hasta la fecha es prometedor. Aún con todo, se requiere más investigación en este campo, de forma que se puedan ir resolviendo los retos que la técnica de bioimpresión 3D aún plantea.

## 7. Referencias

1. Cubo N. Design and development of new bioinks and bioprinting strategies to produce simplified equivalents of human tissues, for earth and space exploration applications [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2020.
2. Gu Z, Fu J, Lin H, He Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian J Pharm Sci*. 2020;15(5):529–57.
3. Yang-Lee I, Salas-Sánchez F, Pomares-Wauters G, Ramos-Gamboa MF, Godfrey-Lewis M, Mora-Román JJ. Bioimpresión de órganos y tejidos en tercera dimensión: técnicas, aplicaciones y limitaciones. *Tecnol Marcha*. 2018;31(3):41–51.
4. Skardal A, Mack D, Kapetanovic E, Atala A, Jackson JD, Yoo J, et al. Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(11):792–802.
5. Lee A, Hudson AR, Shiwardski DJ, Tashman JW, Hinton TJ, Yerneni S, et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science*. 2019;365(6452):482–7.
6. Mueller S, Llewellyn EW, Mader HM. The rheology of suspensions of solid particles. *Proc Math Phys Eng Sci*. 2010;466(2116):1201–28.
7. Hong N, Yang GH, Lee JH, Kim GH. 3D bioprinting and its in vivo applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(1):444–59.
8. Cui H, Nowicki M, Fisher JP, Zhang LG. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(1):10.1002.
9. Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR, Gaharwar AK. Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(6):2090–102.
10. Lui YS, Sow WT, Tan LP, Wu Y, Lai Y, Li H. 4D printing and stimuli-responsive materials in biomedical aspects. *Acta Biomater*. 2019;92:19–36.
11. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJA, et al. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater*. 2013;25(36):5011–28.
12. Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, Hennink WE, Verbout ABJ, Dhert WJA. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: State-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng*. 2007;13(8):1905–25.
13. Michael S, Sorg H, Peck CT, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, et al. Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e57741.
14. Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, Tran TN, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;20(6):473–84.
15. Pati F, Ha DH, Jang J, Han HH, Rhie JW, Cho DW. Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration. *Biomaterials*. 2015 Sep 1;62:164–75.

16. Gardin C, Ferroni L, Latremouille C, Chachques JC, Mitrečić D, Zavan B. Recent Applications of Three Dimensional Printing in Cardiovascular Medicine. *Cells*. 2020;9(3):742.
17. Giannopoulos AA, Mitsouras D, Yoo SJ, Liu PP, Chatzizisis YS, Rybicki FJ. Applications of 3D printing in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Dec 1;13(12):701–18.
18. Gaetani R, Doevendans PA, Metz CHG, Alblas J, Messina E, Giacomello A, et al. Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials*. 2012;33(6):1782–90.
19. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res*. 1991;68(6):1560–8.
20. Zhu K, Shin SR, van Kempen T, Li YC, Ponraj V, Nasajpour A, et al. Gold Nanocomposite Bioink for Printing 3D Cardiac Constructs. *Adv Funct Mater*. 2017;27(12).
21. Gaebel R, Ma N, Liu J, Guan J, Koch L, Klopsch C, et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(35):9218–30.
22. Park SJ, Kim RY, Park BW, Lee S, Choi SW, Park JH, et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction. *Nat Commun*. 2019;10(1):3123.
23. Bejleri D, Streeter BW, Nachlas ALY, Brown ME, Gaetani R, Christman KL, et al. A Bioprinted Cardiac Patch Composed of Cardiac-Specific Extracellular Matrix and Progenitor Cells for Heart Repair. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(23):e1800672.
24. Chachques JC, Trainini JC, Lago N, Masoli OH, Barisani JL, Cortes-Morichetti M, et al. Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM Clinical Trial): One Year Follow-Up. *Cell Transplant*. 2007;16(9):927–34.
25. 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.
26. van der Valk DC, van der Ven CFT, Blaser MC, Grolman JM, Wu PJ, Fenton OS, et al. Engineering a 3d-bioprinted model of human heart valve disease using nanoindentation-based biomechanics. *Nanomaterials*. 2018;8(5):296.
27. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153–639.
28. Zhang YS, Arneri A, Bersini S, Shin SR, Zhu K, Goli-Malekabadi Z, et al. Bioprinting 3D microfibrous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials*. 2016;110:45–59.
29. Lind JU, Busbee TA, Valentine AD, Pasqualini FS, Yuan H, Yadid M, et al. Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater*. 2017;16(3):303–8.
30. Wang Z, Lee SJ, Cheng HJ, Yoo JJ, Atala A. 3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs. *Acta Biomater*. 2018;70:48–56.

31. de Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25(1):100–6.
32. Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amédée J, et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: Preliminary study in mice. *Biofabrication.* 2010;2(1):014101.
33. Shim JH, Lee JS, Kim JY, Cho DW. Bioprinting of a mechanically enhanced three-dimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system. *J Micromech Microeng.* 2012;22(8).
34. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):312–9.
35. Merceron TK, Burt M, Seol YJ, Kang HW, Lee SJ, Yoo JJ, et al. A 3D bioprinted complex structure for engineering the muscle-tendon unit. *Biofabrication.* 2015;7(3):035003.
36. Tong Y, Kaplan DJ, Spivak JM, Bendo JA. Three-dimensional printing in spine surgery: a review of current applications. *Spine J.* 2020;20(6):833–46.
37. Phan K, Sgro A, Maharaj MM, D’Urso P, Mobbs RJ. Application of a 3D custom printed patient specific spinal implant for C1/2 arthrodesis. *Journal of Spine Surgery.* 2016;2(4):314–8.
38. Xu N, Wei F, Liu X, Jiang L, Cai H, Li Z, et al. Reconstruction of the upper cervical spine using a personalized 3D-printed vertebral body in an adolescent with ewing sarcoma. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016;41(1):E50–4.
39. Lorber B, Hsiao WK, Martin KR. Three-dimensional printing of the retina. *Curr Opin Ophthalmol.* 2016;27(3):262–7.
40. Little MH, Hale LJ, Howden SE, Kumar S v. Generating Kidney from Stem Cells. *Annu Rev Physiol.* 2018;81:335–57.
41. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: An observational study. *Lancet.* 2011;377(9772):1175–82.
42. Shafiee A, Atala A. Printing Technologies for Medical Applications. *Trends Mol Med.* 2016 Mar 1;22(3):254–65.
43. Krueger L, Miles JA, Steadman KJ, Kumeria T, Freeman CR, Popat A. 3D printing: potential clinical applications for personalised solid dose medications. *Med J Aust.* 2022;216(2):64–7.
44. Jacob S, Nair AB, Patel V, Shah J. 3D Printing Technologies: Recent Development and Emerging Applications in Various Drug Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech.* 2020;21(6):220.
45. Kassem T, Sarkar T, Nguyen T, Saha D, Ahsan F. 3D Printing in Solid Dosage Forms and Organ-on-Chip Applications. *Biosensors (Basel).* 2022;12(4):186.

46. Khaled SA, Burley JC, Alexander MR, Yang J, Roberts CJ. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *J Control Release*. 2015;217:308–14.
47. Goyanes A, Chang H, Sedough D, Hatton GB, Wang J, Buanz A, et al. Fabrication of controlled-release budesonide tablets via desktop (FDM) 3D printing. *Int J Pharm*. 2015;496(2):414–20.
48. Fu J, Yu X, Jin Y. 3D printing of vaginal rings with personalized shapes for controlled release of progesterone. *Int J Pharm*. 2018 Mar 25;539(1–2):75–82.
49. Escalante-Aburto A, Trujillo-de Santiago G, Álvarez MM, Chuck-Hernández C. Advances and prospective applications of 3D food printing for health improvement and personalized nutrition. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2021;20(6):5722–41.
50. Karavasili C, Gkaragkounis A, Moschakis T, Ritzoulis C, Fatouros DG. Pediatric-friendly chocolate-based dosage forms for the oral administration of both hydrophilic and lipophilic drugs fabricated with extrusion-based 3D printing. *Eur J Pharm Sci*. 2020;147:105291.
51. Teng X, Zhang M, Mujumdar AS. 4D printing: Recent advances and proposals in the food sector. *Trends Food Sci Technol*. 2021;110:349-63.
52. Carvalho V, Gonçalves I, Lage T, Rodrigues RO, Minas G, Teixeira SFCF, et al. 3d printing techniques and their applications to organ-on-a-chip platforms: A systematic review. *Sensors*. 2021 May 1;21(9):3304.
53. Kuo CY, Shevchuk M, Opfermann J, Guo T, Santoro M, Fisher JP, et al. Trophoblast–endothelium signaling involves angiogenesis and apoptosis in a dynamic bioprinted placenta model. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(1):181–92.
54. von Rundstedt FC, Scovell JM, Agrawal S, Zaneveld J, Link RE. Utility of patient-specific silicone renal models for planning and rehearsal of complex tumour resections prior to robot-assisted laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int*. 2017;119(4):598–604.
55. Heinze A, Basulto-Martinez M, Suárez-Ibarrola R. Impresión 3D y sus beneficios en el campo de la educación médica, entrenamiento y asesoría del paciente. *Rev Esp Edu Med*. 2020;1(1):1–8.
56. Lee H, Nguyen NH, Hwang S il, Lee HJ, Hong SK, Byun SS. Personalized 3D kidney model produced by rapid prototyping method and its usefulness in clinical applications. *Int Braz J Urol*. 2018;44(5):952–7.
57. Atalay HA, Canat HL, Ülker V, Alkan I, Özkuvanci Ü, Altunrende F. Impact of personalized three-dimensional (3D) printed pelvicalyceal system models on patient information in percutaneous nephrolithotripsy surgery: A pilot study. *Int Braz J Urol*. 2017;43(3):470–5.
58. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(7):410–21.
59. Miller JS, Stevens KR, Yang MT, Baker BM, Nguyen DHT, Cohen DM, et al. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater*. 2012;11(9):768–74.

60. Lin H, Zhang D, Alexander PG, Yang G, Tan J, Cheng AWM, et al. Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture. *Biomaterials*. 2013;34(2):331–9.
61. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, Park JH, Grodzicki MS, Shue HJ, et al. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci Adv*. 2015;1(9):e1500758.
62. Wang Xiaohong, Yan Yongnian, Pan Yuqiong, Xiong Xhuo, Liu Haixia, Cheng Jie, et al. Generation of three-dimensional hepatocyte-gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng*. 2006;12(1):83–90.
63. Shengjie L, Xiong Z, Wang X, Yan Y, Liu H, Zhang R. Direct fabrication of a hybrid cell/hydrogel construct by a double-nozzle assembling technology. *J Bioact Compat Polym*. 2009;24(3):249–65.
64. Bhise NS, Manoharan V, Massa S, Tamayol A, Ghaderi M, Miscuglio M, et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*. 2016;8(1):014101.
65. Chang R, Emami K, Wu H, Sun W. Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model. *Biofabrication*. 2010;2(4):045004.
66. Zhang YS, Yue K, Aleman J, Mollazadeh-Moghaddam K, Bakht SM, Yang J, et al. 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(1):148–63.
67. Yang Q, Gao B, Xu F. Recent Advances in 4D Bioprinting. *Biotechnol J*. 2020;15(1):e1900086.
68. Mirani B, Pagan E, Currie B, Siddiqui MA, Hosseinzadeh R, Mostafalu P, et al. An Advanced Multifunctional Hydrogel-Based Dressing for Wound Monitoring and Drug Delivery. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(19):10.1002.
69. Kirillova A, Maxson R, Stoychev G, Gomillion CT, Ionov L. 4D Biofabrication Using Shape-Morphing Hydrogels. *Adv Mater*. 2017;29(46).
70. Zarek M, Mansour N, Shapira S, Cohn D. 4D Printing of Shape Memory-Based Personalized Endoluminal Medical Devices. *Macromol Rapid Commun*. 2017;38(2).