

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 779**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
B33Y 70/00 (2010.01)
B33Y 80/00 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2020** **PCT/IB2020/056856**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2021** **WO21014359**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2020** **E 20757665 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024** **EP 4003439**

54 Título: **Procedimiento de preparación de matriz extracelular descelularizada sin detergente y biotintas para impresión 3D**

30 Prioridad:

22.07.2019 EP 19461559
19.12.2019 EP 19218191

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2024

73 Titular/es:

POLBIONICA SP. Z O.O. (100.0%)
Aleja Prymasa Tysiaclecia 79A
01-242 Warszawa, PL

72 Inventor/es:

WSZOLA, MICHAL;
KLAK, MARTA;
BERMAN, ANDRZEJ;
KOSOWSKA, KATARZYNA;
BRYNIARSKI, TOMASZ;
DOBRZANSKI, TOMASZ;
TYMICKI, GRZEGORZ;
GOMOLKA, MAGDALENA;
KOWALSKA, PATRYCJA;
CYWONIUK, PIOTR;
TUROWSKI, PAWEL;
ZAMORA, IGOR;
OLENDER, EWA;
OLKOWSKI, RADOSLAW y
KAMINSKI, ARTUR

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 987 779 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de matriz extracelular descelularizada sin detergente y biotintas para impresión 3D

La invención se refiere a un método de preparación de ECM descelularizada sin detergente, un método de preparación de una biotinta primaria, la biotinta primaria, un método de preparación de una biotinta vascular, la biotinta vascular, una estructura tridimensional que comprende la biotinta primaria y la biotinta vascular y un procedimiento de preparación de la estructura tridimensional.

La bioimpresión permite la deposición automatizada de células vivas junto con otros componentes para el desarrollo de una construcción tisular tridimensional (3D). Las formulaciones de biotintas se crean a partir de diferentes fuentes, incluidos polímeros sintéticos y naturales tales como el colágeno, la gelatina, el alginato, el ácido hialurónico, la fibrina y el polietilenglicol. Se sabe que los materiales de matriz utilizados para la bioimpresión no pueden representar la complejidad de la matriz extracelular (ECM) natural, que constituye un microentorno para las células y puede modular los procedimientos celulares, como la migración, la diferenciación y otras funciones. Por lo tanto, la presencia de ECM en las biotintas se considera beneficiosa para recrear un microentorno con conexiones célula-célula.

La solicitud de Patente Internacional WO2017014582 revela una composición de biotinta que comprende 0,05-60×10⁶/ml de células, 0,1 a 10 % p/v de un material portador celular, 0,01 a 1 % p/v de un potenciador de la viscosidad, 1 a 30 % v/v de un lubricante y 0,1 a 10 % p/v de un material estructural. La composición de biotinta puede comprender además un material componente derivado de tejido. Preferentemente, el material portador celular es gelatina o colágeno, el potenciador de viscosidad es ácido hialurónico o dextrano, el lubricante es glicerol y el material estructural es fibrinógeno o gelatina metacrilada (GelMa).

La bibliografía incluye numerosas publicaciones sobre la cuestión de la selección de una composición de biotintas adecuada con propiedades óptimas para aplicaciones de ingeniería tisular. Mohamed Ali *et al.* realizaron trabajos sobre la producción de una biotinta basada en ECM descelularizada (dECM) derivada de un riñón [1]. Se obtuvo un hidrogel dECM de concentración relativamente baja (1 - 3 %) empleando un procedimiento de disolución, utilizando ácido acético 0,5M y pepsina 0,1 mg/ml. Además, se llevó a cabo un procedimiento de metacrilación de la dECM con adición de un fotoiniciador (Irgacure).

Grupos de investigación posteriores intentaron obtener una biotinta utilizando ECM agregando gelatina metacrilada (GelMa) y un fotoiniciador, es decir, LAP (fenil-2,4,6-trimetilbenzoyl fosfinato de litio) [2]. Otros utilizaron el hidrogel dECM obtenido con una concentración relativamente alta de pepsina con la adición de policaprolactona (PCL) como agente sintético conservante [3].

La descripción de la Patente KR20180125776 describe una composición de biotinta que comprende un polvo dECM y un hidrogel. El polvo dECM puede seleccionarse de tejido hepático, tejido cardíaco, tejido cartilaginoso, tejido óseo, tejido adiposo, tejido muscular, tejido cutáneo, tejido epitelial mucoso, tejido amniótico o tejido corneal. Preferentemente, el polvo dECM tiene un tamaño de partícula de 0,05 a 100 µm. El hidrogel puede contener uno o más seleccionados del grupo que consiste en gelatina, ácido hialurónico, dextrano y colágeno.

Falguni *et al.* (2014) desarrollaron biotintas dECM específicas de tejido, incluidos tejidos adiposo, cartilaginoso y cardíaco, capaces de proporcionar claves cruciales para el injerto, la supervivencia y la función a largo plazo de las células. El procedimiento de bioimpresión permitió reconstituir las morfologías y funciones celulares intrínsecas. Se observó un ensamblaje de orden superior de los constructos celulares impresos, con patrones espaciales organizados y expresión génica específica de cada tejido. Una ventaja clave de la metodología fue la aplicación de la ECM específica del tejido, que proporciona claves cruciales para el injerto, la supervivencia y la función a largo plazo de las células [3].

Los experimentos que implican la descelularización de un órgano para obtener la dECM como componente de la biotinta han sido estudiados por muchos grupos de investigación [4, 5, 7]. Se utilizaron diversas sustancias para la descelularización, principalmente Triton X-100 y/o detergentes de sulfato de dodecil (SDS). En el documento KR1020180011607A se describe un procedimiento de descelularización del hígado, en el que el tejido hepático se trata con una solución desaturada que contiene un tensioactivo y una solución hiperactiva. Como tensioactivo puede utilizarse un 0,5 % de Triton X-100 (Triton X-100).

Mohamed Ali y sus colegas construyeron un riñón fotoreticulable que comprende una biotinta derivada de ECM [1]. Los riñones enteros porcinos se descelularizaron mediante un procedimiento de perfusión, se disolvieron en una solución ácida y se modificaron químicamente mediante metacrilación. Los resultados mostraron que las células renales humanas bioimpresas eran muy viables y maduraban con el tiempo. Además, los constructos renales bioimpresos presentaban las características estructurales y funcionales del tejido renal nativo. La biotinta derivada de la ECM específica del tejido podría potenciar la maduración celular y, en última instancia, la formación de tejido.

Mirmalek-Sani *et al.* (2013) presentaron el procedimiento de descelularización del páncreas porcino para crear un andamio para células madre humanas e islotes pancreáticos porcinos. El material celular se eliminó eficazmente preservando las proteínas ECM y el sistema vascular nativo. Además, se ha demostrado que el páncreas descelularizado puede favorecer la adhesión celular y el mantenimiento de las funciones celulares [6].

El objetivo de la invención es proporcionar un dECM sin detergente que pueda utilizarse en bioimpresión. La bibliografía no proporciona resultados sobre el contenido residual de detergentes en la ECM obtenida por descelularización ni sobre los procedimientos de ensayo de su contenido. En los procedimientos publicados anteriormente para la descelularización de diversos tejidos, la fase de eliminación de los detergentes es relativamente corta. Se cree que la ausencia del detergente en la dECM afecta sustancialmente a la calidad de la dECM obtenida. El procedimiento desarrollado por el solicitante permite eliminar casi todo el detergente sin necesidad de agregar otros productos químicos. El segundo objetivo de la invención es obtener una biotinta de consistencia y viscosidad adecuadas, sin necesidad de agregar potenciadores de la viscosidad.

La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes se refieren a las realizaciones preferidas. Cualquier "realización" o "ejemplo" que se divulgue en la descripción pero que no esté cubierto por las reivindicaciones debe considerarse presentado únicamente a título ilustrativo.

En un primer aspecto, se proporciona un procedimiento de preparación de matriz extracelular descelularizada (dECM) sin detergente que comprende las siguientes etapas:

- fragmentación mecánica, preferentemente por extrusión mecánica, de un órgano de origen animal seleccionado entre páncreas, hígado, riñones, corazón, piel, pulmones, intestino grueso, intestino delgado, arterias y venas sanguíneas, tejido adiposo y placenta, estando el órgano separado del cuerpo del animal
- incubación del órgano fragmentado en una solución detergente tamponada, que comprende preferentemente solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X, en la que la solución detergente tamponada comprende 0,5 % - 1,5 %, preferentemente 1 % (v/v), octoxinol-9, en la que la solución detergente se complementa con un agente antimicrobiano, preferentemente estreptomicina, preferentemente a una concentración de 0,01 % (p/v), y la incubación se realiza a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferentemente a 4 °C, durante al menos 72 h con agitación, en la que se transfiere el órgano fragmentado a una solución detergente fresca cada 4 a 12 horas
- incubación del órgano fragmentado en una primera solución tamponada de lavado, preferentemente que comprenda 1XPBS, donde la primera solución tamponada de lavado comprenda un agente antimicrobiano, preferentemente estreptomicina, preferentemente a una concentración del 0,01 % (p/v), durante al menos 72 h a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferentemente a 4 °C con agitación, en la que el órgano fragmentado se transfiere a una nueva solución de lavado cada 4 a 12 horas
- incubación del órgano fragmentado en una solución de desoxirribonucleasa que comprende DNAsa, preferentemente a una concentración de 0,0001 a 0,0003 % (p/v), más preferentemente 0,0002 % (p/v), preferentemente durante al menos 8 horas a una temperatura adecuada para la actuación de la DNAsa
- incubación del órgano fragmentado en una segunda solución tamponada de lavado, preferentemente que comprenda 1XPBS, donde la segunda solución tamponada de lavado comprenda un agente antimicrobiano, preferentemente estreptomicina, preferentemente a una concentración del 0,01 % (p/v), durante al menos 72 h a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferentemente a 4 °C con agitación, en la que el órgano fragmentado se transfiere a una nueva solución de lavado cada 4 a 12 horas
- congelación del órgano fragmentado y trituración del órgano fragmentado congelado en fragmentos
- liofilización del órgano fragmentado congelado, preferentemente a -32 °C, preferentemente a una presión de 0,31 mbar (31 Pa).
- secado final opcional de 5 a 15 minutos a 0,0010 mbar (0,1 Pa) y -76 °C
- molienda del producto triturado y secado en polvo de 25 - 500 µm de dECM
- esterilización opcional del producto, preferentemente por radiación y/u óxido de etileno

La fragmentación mecánica del órgano potencia la eliminación del detergente del órgano y da lugar a un producto con menor contenido en grasa, lo que mejora las propiedades del producto final, es decir, aumenta la viscosidad y mejora la imprimibilidad. La adición de DNAsa es crucial para la eliminación del ADN del órgano de origen animal. Si la estructura tridimensional impresa resultante comprendía dECM con ADN, no podría seguir utilizándose en experimentos de trasplante.

Preferentemente, la etapa de molienda va seguida de una etapa de comprobación de la cantidad de octoxinol-9 en el polvo de dECM, en la que preferentemente antes de comprobar la presencia de octoxinol-9 en el polvo de dECM, se trata con colagenasa, preferentemente a una concentración de al menos 43.953 PZ/g de dECM.

Preferentemente, la etapa de molienda va seguida de las siguientes etapas:

- disolución del polvo de dECM en una solución de ácido clorhídrico, preferentemente 0,01 M, complementada con 0-10 mg/ml de pepsina
 - mezcla durante 48-72 h, preferentemente durante 72 h, a temperatura ambiente;
 - neutralización en hielo, preferentemente utilizando base sódica 0,1 M y solución de PBS.
- 5 En un segundo aspecto se proporciona un procedimiento de preparación de una biotinta primaria que comprende las siguientes etapas:
- preparación de una pasta que comprende 5-50 % (p/v), preferentemente 15-25 % (p/v), del polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2 de la presente invención, y 1-10 % (p/v), preferentemente 8-10 % (p/v), de la solución de dECM obtenible por el procedimiento definido en la
- 10 reivindicación 3 de la presente invención mediante mezcla
- incubación de la pasta a una temperatura de 7-10 °C durante al menos 24 horas
 - adición de 1,46 -7,32 % (p/v) de gelatina metacrilada, 0,15-1,10 % (p/v) de ácido hialurónico metacrilado, 5-10 % (p/v) de glicerol, y un fotoiniciador, preferentemente 0,03-0,17 % (p/v) de fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio, seguido de un mezclado suave.
- 15 Como el polvo dECM se prepara originalmente por liofilización y no se disuelve después, conserva toda la estructura cuaternaria de ECM. Por consiguiente, el uso de dECM en forma de pasta, que comprende tanto el polvo de dECM como la solución de dECM, proporciona a la biotinta primaria una consistencia adecuada y, dado que el polvo de dECM no se disuelve en la biotinta primaria, conserva toda la estructura cuaternaria de ECM.
- 20 En un tercer aspecto se proporciona la biotinta primaria que comprende una pasta de dECM y 1,46 -7,32 % (p/v) de gelatina metacrilada, 0,15-1,10 % (p/v) de ácido hialurónico metacrilado, 5-10 % (p/v) de glicerol y un fotoiniciador, preferentemente 0,03-0,17 % (p/v) de fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfina de litio. 17 % (p/v) fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio, en el que la pasta de dECM comprende 5-50 % (p/v), preferentemente 15-25 % (p/v), del polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2 de la presente invención, y 1-10 % (p/v), preferentemente 8-10 % (p/v), de la solución de dECM obtenible por el procedimiento definido
- 25 en la reivindicación 3 de la presente invención y en el que la viscosidad de la biotinta primaria es de al menos 5 Pa s, medida en un sistema de placa cónica, a una tasa de cizallamiento constante de 21/s y una temperatura de 37 °C.
- El uso de dECM permite reproducir las condiciones extracelulares del organismo, confiriendo de este modo a la bioimpresión las características del tejido nativo, lo que estimula la diferenciación de las células y mejora su tasa de supervivencia. Además, la matriz extracelular es necesaria para obtener una viscosidad adecuada de la biotinta y
- 30 mantener una estructura tridimensional estable del constructo impreso mediante la posibilidad adicional de reticulación térmica en el intervalo de temperaturas de 33 a 37 °C.
- El uso del fotoiniciador permite la reticulación, que no es tóxica para las células, en comparación con la reticulación química que utiliza productos químicos, que son tóxicos para las células contenidas en la biotinta primaria. La reticulación con el uso del fotoiniciador y la luz visible minimiza el daño del ADN celular en comparación con la
- 35 reticulación térmica. Tanto la temperatura como la luz tienen efectos negativos sobre las células, provocando daños en el ADN. Sin embargo, al reticular con luz visible, estos cambios se reducen al mínimo.
- Se utiliza gelatina metacrilada (GelMa) para dar forma al constructo impreso. Además, une los filamentos para evitar la deslaminación de los lobulillos y mejora la viabilidad de las células y los islotes. GelMa es estable a temperaturas más altas que la gelatina, lo que resulta beneficioso durante la reticulación térmica.
- 40 El ácido hialurónico metacrilado (HAMA) ayuda a mantener la estructura tridimensional mediante la reticulación. Además, el HAMA proporciona suavidad, sedosidad y homogeneidad al filamento impreso y favorece los cultivos celulares. Estas características no pueden obtenerse mediante la adición de ácido hialurónico, que no está metacrilado.
- El uso de glicerol mejora la funcionalidad de las células y los islotes. También mejora la lubricidad de la biotinta, permite
- 45 la formación de filamentos continuos, mejora la mezcla de los componentes de la biotinta en una jeringa o un mezclador y reduce el gasto de presión durante la impresión.
- Preferentemente, la biotinta primaria comprende al menos un aditivo seleccionado entre: ácido hialurónico a una concentración de 0,001 a 0,100 mg/ml de la biotinta, preferentemente, 0,007 mg/ml, laminina a una concentración de 0,005 a 0,100 mg/ml de la biotinta, preferentemente, 0,084 mg/ml, colágeno I a una concentración de 0,001 a 0,100
- 50 mg/ml de la biotinta, preferentemente, 0,041 mg/ml, colágeno IV a una concentración de 0,005 a 0,175 mg/ml de la biotinta, preferentemente 0,122 mg/ml, fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, fibrinógeno humano a una concentración de 10 a 100 mg/ml de la biotinta, aprotinina a una concentración de 1 a 2 EPU/ml de la biotinta, polisorbato a una concentración de 0,05 a 2 mg/ml de la biotinta, trombina humana a una

- concentración de 5 a 55 mg/ml de la biotinta, cloruro de calcio a una concentración de 20 a 60 mM/ml de la biotinta; vitaminas proangiogénicas: vitamina A a una concentración de 1nM a 500 μ M, preferentemente 100 μ M, vitamina B1 a una concentración de 50 a 100 μ M, preferentemente 100 μ M, vitamina B3 a una concentración de 1 a 10 μ M, preferentemente 10 μ M, vitamina B12 a una concentración de 10 a 100 mg/ml de la biotinta, vitamina D3 a una concentración de 0.1 a 10 nM, preferentemente 10 nM, factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis: VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml de la biotinta, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml de la biotinta, preferentemente 20 ng/ml, TGF- β a una concentración de 1 a 10 ng/ml de la biotinta, preferentemente 20 ng/ml, interleucina (IL)-8 a una concentración de 0 a 100 ng/ml de la biotinta, preferentemente 10 ng/ml, IL-17A a una concentración de 20 a 50 ng/ml de la biotinta, preferentemente 20 ng/ml.
- Los aditivos comerciales tales como el ácido hialurónico, el colágeno I y IV y la laminina mejoran aún más la funcionalidad de la estructura tridimensional impresa.
- Vitamina A - ATRA (ácido retinoico all trans) como uno de los metabolitos de la vitamina A tiene un efecto proangiogénico - mejora la expresión de los factores que están detrás de la angiogénesis (por ejemplo, ciclooxigenasa-2 (COX-2), factor inducido por hipoxia (HIF)-1, C-X-C, receptor de quimiocinas (CXCR)-4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiotensina (Ang)-2, -4. Además, se ha demostrado que el ATRA reduce la actividad pro-MMP2 (pro-matriz metaloproteínasa-2 - colagenasa tipo IV).
- La vitamina B1 - benfotiamina (un derivado de la tiamina) inhibe la apoptosis en la ruta B-quinasa dependiente de proteínas (PKB/Akt) y es responsable de inducir la proliferación de células endoteliales progenitoras.
- La vitamina B3 - niacina, a través de su receptor, es decir, el receptor 2 del ácido hidroxicarboxílico (GPR109A), potencia y promueve las funciones de las células endoteliales que favorecen la angiogénesis. Además, la vitamina B3 es un precursor de NAD(+), que mediante respuesta con un mediador de sirtuina (SIRT), induce y favorece la formación de vasos.
- La vitamina B12 (cobalamina) induce la producción de prostaglandinas E1, prostaciclina y óxido nítrico (NO). Todas estas sustancias tienen un efecto favorable sobre el inicio de la angiogénesis.
- La vitamina D3 está diseñada para estimular la angiogénesis *in vitro*. Induce un aumento de la expresión de VEGF y de la actividad pro-MMP2. También afecta a la función de las ECFC (células formadoras de colonias endoteliales).
- El VEGF induce la proliferación, migración, esporulación y formación de conexiones entre las células endoteliales y, además, al inducir la producción de diversas proteasas, afecta a la degradación de la matriz extracelular (ECM) y activa las integrinas de la superficie celular de las células endoteliales.
- El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) aumenta la migración de células endoteliales y promueve la morfogénesis capilar. También aumenta la producción endógena de VEGF.
- El factor de crecimiento transformante (TGF- β) promueve la formación de ECM (proteoglicanos, fibronectina, colágeno), regula la proliferación de células endoteliales, su migración y la formación de vasos sanguíneos. El TGF- β media en las interacciones de las células endoteliales y los pericitos.
- La interleucina (IL)-8 tiene un potente efecto proangiogénico sobre las células endoteliales al interactuar con los receptores CXCR1 y CXCR2. Estimula la formación de una red microvascular.
- IL-17A - Induce la angiogénesis, la migración celular y la reorganización del citoesqueleto.
- Preferentemente, la biotinta primaria comprende uno o más aditivos de origen animal o humano seleccionados entre células endoteliales a una densidad de 0,1-10 $\times$ 10⁵/ml de la biotinta, células endoteliales microvasculares primarias a una concentración de 01 a 10 $\times$ 10⁵/ml de la biotinta, células α de origen animal o humano a una concentración de 3 a 9 $\times$ 10⁶ /ml de la biotinta, células β de origen animal o humano a una concentración de 1,1 a 3,4 $\times$ 10⁷/ml de la biotinta, islotes pancreáticos de origen animal o humano, preferentemente en una cantidad de 20.000 iEq/ml de la biotinta.
- Los islotes pancreáticos son responsables de la producción de insulina. Se agregan células endoteliales para una formación más rápida de una red vascular en la estructura tridimensional impresa. Se utilizan células endoteliales microvasculares primarias para apoyar la formación y el crecimiento de microvasos en la estructura tridimensional bioimpresa.
- En un cuarto aspecto se proporciona un procedimiento de preparación de una biotinta vascular que comprende las etapas de:
- a) preparación opcional de una solución de gelatina microbiológica complementada con CMC que comprende la preparación de una solución al 1-2 % (p/v) de gelatina microbiológica en una solución tampón, preferentemente PBS, suspendiendo la gelatina microbiológica en la solución tampón con agitación a una temperatura comprendida entre 50 y 65 °C, preferentemente a 60 °C, adición de una solución acuosa de carboximetilcelulosa (CMC) al 2 - 5 % (v/v) para obtener una concentración final del 0.2-1 % (v/v) de CMC en la biotinta y enfriamiento de la solución a una temperatura igual o inferior a 40 °C

b) preparación de una solución de dECM al 5 -10 % (p/v) mediante la adición de polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2 de la presente invención, preferentemente esterilizado por radiación, a (i) la solución de gelatina microbiológica complementada con CMC obtenida en la etapa a) o (ii) una solución tampón o (iii) una solución de medio celular con agitación suave.

5 c) sonicación de la solución obtenida a una temperatura no superior a 37 °C durante 0,5 - 2,0 horas

d) adición opcional de al menos un aditivo de origen animal o humano seleccionado entre: fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml, preferentemente 20 ng/ml, PGE2 a una concentración entre 100 y 300 nM, preferentemente 100 nM, células endoteliales a una densidad entre 0,1 y 10×10⁷ células/ml de la biotinta, fibroblastos a una densidad entre 0,1 y 10×10⁶ células/ml de la biotinta.

En un quinto aspecto se proporciona un procedimiento de preparación de una biotinta vascular que comprende las etapas de:

- a) preparación opcional de una solución de gelatina microbiológica complementada con CMC que comprende la preparación de una solución al 1-5 % (p/v) de gelatina microbiológica en una solución tampón, preferentemente PBS, suspendiendo la gelatina microbiológica en la solución tampón con agitación a una temperatura entre 50 y 65 °C, preferentemente a 60 °C, adición de una solución acuosa de CMC al 2-5 % (v/v) para obtener una concentración final del 0,2-2 % (v/v) de CMC en la biotinta y enfriamiento de la solución a una temperatura igual o inferior a 40°C

b) preparación de una solución de dECM al 2 -10 % (p/v) mediante adición de polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2 de la presente invención, preferentemente esterilizado por radiación, preferentemente esterilizado por radiación, a (i) la solución de gelatina microbiológica complementada con CMC obtenida en la etapa a) o (ii) una solución tampón o (iii) una solución de medio celular a con agitación suave.

c) hervir la mezcla a 100 °C durante 15-30 minutos

d) adición opcional de al menos un aditivo de origen animal o humano seleccionado entre: fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml, preferentemente 20 ng/ml, PGE2 a una concentración entre 100 y 300 nM, preferentemente 100 nM, células endoteliales a una densidad entre 0,1 y 10×10⁷ células/ml de la biotinta, fibroblastos a una densidad entre 0,1 y 10×10⁶ células/ml de la biotinta.

En un sexto aspecto se proporciona la biotinta vascular que comprende solución de dECM sonicada o hervida obtenible por el procedimiento definido en la reivindicación 3 de la presente invención a una concentración de 2 - 10 % (p/v), preferentemente complementada con gelatina microbiológica a una concentración de 1 a 5 % (p/v) y/o CMC a una concentración de 0,2 a 2 % (v/v).

La dECM sonicada o hervida cambia sus propiedades físicas y químicas con los cambios de temperatura. Este componente está diseñado para garantizar una viscosidad adecuada de la biotinta durante la impresión a una temperatura relativamente baja (15-20 °C) y para preservar el conducto impreso hasta la infiltración de las células, así como una licuefacción lenta a la temperatura de cultivo de 37 °C.

La gelatina microbiológica proporciona una consistencia deseada y mejora la tasa de supervivencia celular. La CMC aumenta la viscosidad y estabiliza la consistencia de la biotinta. La fibronectina favorece la angiogénesis y, dependiendo de la dosis, estimula el alargamiento de los vasos formados sin afectar a la tasa de proliferación.

Preferentemente, la biotinta vascular comprende al menos un aditivo de origen animal o humano seleccionado entre: fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml, preferentemente 20 ng/ml, PGE2 a una concentración entre 100 y 300 nM, preferentemente 100 nM, células endoteliales a una densidad entre 0.1 y 10×10⁷ células/ml de la biotinta, fibroblastos a una densidad entre 0,1 y 10×10⁶ células/ml de la biotinta.

Las células endoteliales producen vasos sanguíneos. Los fibroblastos producen factores inductores de angiogénesis. El VEGF induce la proliferación, migración, esporulación y formación de conexiones entre las células endoteliales. Además, al inducir la producción de diversas proteasas, el VEGF afecta a la degradación de la ECM y activa las integrinas de la superficie celular de las células endoteliales. El FGF aumenta la migración de las células endoteliales y favorece la morfogénesis capilar. También aumenta la producción endógena de VEGF. PGE2 - prostaglandina E2, diseñada para inducir la migración, proliferación y formación de nuevos vasos mediante la activación (fosforilación) del FGF del receptor (R)-1.

En un séptimo aspecto se proporciona una estructura tridimensional que comprende al menos tres capas de biotinta adyacentes, en la que una capa de la biotinta vascular según el sexto aspecto de la invención está dispuesta entre dos capas de la biotinta primaria según el tercer aspecto de la invención.

En un octavo aspecto se proporciona un procedimiento de preparación de una estructura tridimensional, en el que la biotinta primaria según el tercer aspecto de la invención y la biotinta vascular según el sexto aspecto de la invención se depositan capa por capa en un procedimiento de bioimpresión 3D a una velocidad de impresión desde 5 a 50 mm/s, presión de 4 a 300 kPa y temperatura desde 4 a 37 °C y en el que durante o después de la deposición la biotinta primaria se expone a luz UV y/o luz visible, preferentemente de la forma de longitud de onda de 365 a 405 nm, más preferentemente a 405 nm, durante al menos 5 segundos. Se prefiere la reticulación a 405 nm, ya que no es tóxica para las células contenidas en la estructura tridimensional.

La invención permitió obtener un modelo de un lobulillo de 27x17x2,5 mm de tamaño. Se imprimió un lobulillo de 5 capas en 3-10 minutos. Además, se obtuvo un modelo 3D de un prototipo de órgano funcional de 30x40x20 mm de tamaño. El modelo constaba de 30 capas y se imprimió entre 20 y 60 minutos. También es importante señalar que es la primera vez que se informa del uso de dECM hervidas o sonicadas. La invención permite obtener un constructo en poco tiempo gracias a que la velocidad de impresión está adecuadamente correlacionada con la viscosidad de la biotinta (hasta 30 mm/s). Se puede obtener una estructura porosa tridimensional estable (30 capas), que se conserva a una temperatura de 37 °C durante 20 días. En una realización preferida, la biotinta primaria se basa en el uso de un fotoiniciador menos tóxico, es decir, LAP en lugar de Irgacure a una concentración relativamente baja. Además, se utiliza una cantidad de pepsina inferior a la encontrada en la bibliografía para obtener la solución dECM.

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1. Influencia de la concentración de pepsina en las propiedades del hidrogel dECM

Figura 2. Relación entre la concentración de soluciones de dECM y la viscosidad de A) solución de dECM al 5 % (p/v) complementada con polvo de dECM al 15 % (p/v), B) solución de dECM al 5 % (p/v) complementada con polvo de dECM al 25 % (p/v), C) solución de dECM al 8 % (p/v) complementada con polvo de dECM al 15 % (p/v), D) 8 % (p/v) de solución de dECM complementada con 25 % (p/v) de polvo de dECM, E) 10 % (p/v) de solución de dECM complementada con 15 % (p/v) de polvo de dECM, F) 10 % (p/v) de solución de dECM complementada con 25 % (p/v) de polvo de dECM.

Figura 3. Análisis de la cinética de las soluciones de dECM al 5 % (p/v) (A, B), al 8 % (p/v) (C, D) y al 10 % (p/v) (E, F) a temperatura predeterminada.

Figura 4. Análisis de la absorbencia de los lobulillos impresos: GelMa, HAMA, Mix.

Figura 5. Viscosidades de A) dECM(r) hervido y B) sonificado.

Figura 6. modelo 3D de A) un lobulillo vascularizado y B) una foto del constructo impreso.

Figura 7. Visualización del sistema vascular del modelo 3D (A, B) y del prototipo (C, D) del páncreas.

Figura 8. El efecto del glicerol sobre la funcionalidad de los islotes pancreáticos en A) el inicio del experimento y B) tras 24 h de incubación.

Figura 9. El efecto de los aditivos comerciales sobre la funcionalidad y viabilidad de los islotes pancreáticos en A) el inicio del experimento, B) tras 24 h de incubación y C) tras 48 h de incubación.

Figura 10. El efecto de la adición de gelatina metacrilada sobre la viabilidad de los islotes pancreáticos en A) el inicio del experimento, B) tras 24 h de incubación, C) tras 48 h de incubación y D) tras 48 h de incubación.

Figura 11. El efecto de la adición de ácido hialurónico metacrilado sobre la viabilidad de los islotes pancreáticos en A) el inicio del experimento, B) tras 24 h de incubación y C) tras 48 h de incubación.

Figura 12. El efecto de la adición de la mezcla de GelMa y HAMA en proporciones variables sobre la viabilidad de los islotes pancreáticos en A) el inicio del experimento, B) tras 24 h de incubación, C) tras 48 h de incubación y D) tras 48 h de incubación.

Figura 13. El efecto de la adición de polvo de ECM cortado o molido sobre la viabilidad de los islotes pancreáticos en A) el inicio del experimento, B) tras 24 h de incubación, C) tras 48 h de incubación y D) tras 48 h de incubación.

Figura 14. El efecto de la adición de GelMa y HAMA a la biotinta primaria sobre la viabilidad de los islotes pancreáticos tras la impresión en A) el inicio del experimento, B) tras 24 h de incubación.

Figura 15. Visualización desde un microscopio electrónico que presenta la estructura de las proteínas en las distintas fases de preparación de la dECM con el fin de utilizarlo como materia prima para la bioimpresión.

A)-C) - Imágenes SEM (microscopio electrónico de barrido); A) tejido nativo antes de la descelularización; B) tejido después de la descelularización; C) constructo impreso a partir de biotinta primaria.

D)-E) - Imágenes TEM (microscopio electrónico de transmisión); D) tejido tras la descelularización;

E), F) constructos impresos a partir de la biotinta primaria con estructura cuaternaria de colágeno preservada (fibras de colágeno visibles).

Realizaciones de la invención:

Realización 1: Preparación de la dECM sin detergente

5 A. Procedimiento para la descelerización del páncreas

10 Se preparó una solución de Triton X-100 al 1 % (v/v) con agua amoniacal al 0,1 % (v/v) en solución PBS concentrada 1x con estreptomycin al 0,01 % (p/v) para eliminar las estructuras celulares del órgano pancreático dejando la matriz extracelular (andamio). Tras la recolección, el material tisular se congeló a -80 °C. A continuación, tras la descongelación, se retiraron del órgano la capa externa de tejido adiposo y las membranas circundantes. Los páncreas preparados se trataron de dos formas: cortados en trozos pequeños (aproximadamente 1-1,5 cm) y triturados mecánicamente (utilizando un procedimiento de molienda por extrusión).

15 El tejido fragmentado se colocó en un frasco y se suspendió en una solución de Triton X-100 previamente preparada. Las muestras se colocaron en una incubadora a 4 °C con una agitación constante de 150 rpm. Cada 4 h a 12 h, se sustituía el detergente hasta la eliminación completa de la fracción celular (3-5 días). A continuación, se lavó el detergente del andamio obtenido. Para ello, se utilizó una solución de 1 × PBS con estreptomycin al 0,01 % (p/v). El procedimiento de lavado se llevó a cabo durante 72 h a 4 °C con agitación continua a 150 rpm.

20 La siguiente fase -descelerización- consistió en administrar una solución de desoxirribonucleasa (0,0002 % (p/v) de DNasa en 1x PBS, complementada con 0,12 mM de iones de calcio y magnesio). El andamio se incubó en la solución mencionada durante 8 horas a 37 °C con agitación a 150 rpm. La última etapa consistió en lavar de nuevo con una solución de 1 × PBS con estreptomycin al 0,01 % (p/v) en condiciones estándar (4 °C; 150 rpm; 72 h). Además, también se probó el lavado del detergente con agua amoniacal a una concentración del 0,1 % (v/v) en 1 × solución concentrada de PBS. Además, se estudió el efecto de un aumento de la temperatura a 20-24 °C en la fase de lavado.

25 Una vez finalizado el procedimiento de descelerización, el andamio obtenido se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en trozos de aproximadamente 0,5 cm de tamaño. El material se liofilizó durante 26 h a una temperatura de -32 °C y a una presión de 0,31 mbar (31 Pa). El procedimiento de secado final duró 10 minutos a una presión de 0,0010 mbar (0,1 Pa) y una temperatura de -76 °C. El andamio triturado y secado se pulverizó con un molino criogénico. El procedimiento de molienda consistió en 3 ciclos durante 1 minuto a 15 impactos por segundo.

30 Para caracterizar el producto obtenido, es decir, el polvo dECM abreviado como "dECM(p)", se probó la distribución del tamaño de grano del polvo en gradiente de flujo utilizando un espectrómetro de difracción láser Spraytec (Malvern, Reino Unido) equipado con una cámara de inhalación accesoria para el estudio de pulverizaciones de inhalación. En todos los casos estudiados, los valores de los parámetros que describen el polvo analizado tras la aerosolización eran comparables, lo que indica que no era necesario aportar energía adicional en forma de una mayor corriente de aire para descomponer el polvo en partículas individuales. La tabla 1 presenta los valores de los parámetros que describen los diámetros de las partículas de polvo, donde:

35 *Dv(50)* - mediana de la distribución granulométrica volumétrica: el diámetro de las partículas que divide la distribución volumétrica acumulativa por la mitad, es decir, todas las partículas tanto más pequeñas como más grandes que la mediana tienen el mismo volumen (las partículas por debajo de este diámetro constituyen el 50 % del volumen de la muestra).

Dv(10) - las partículas por debajo de este diámetro constituyen el 10 % del volumen de la muestra.

40 *Dv(90)* - las partículas por debajo de este diámetro constituyen el 90 % del volumen de la muestra.

D[3][2] - el diámetro de Sauter es el diámetro de una partícula cuya relación entre volumen y superficie es igual a la proporción entre el volumen de todas las partículas analizadas y la superficie del total de dichas partículas.

D[4][3] : diámetro definido como la proporción entre la suma de la cuarta potencia de los diámetros de las partículas y la suma de la tercera potencia de los diámetros de las partículas.

45

Tabla 1. Valores de los parámetros que describen los diámetros de las partículas de polvo

Caudal [l/min]	Parámetro	Diámetro [μm]	SD [μm]
100	Dv(10)	28,23	1,48
	Dv(50)	148,43	10,14
	Dv(90)	410,1	29,41
	D[3][2]	54,19	4,54
	D[4][3]	189,6	12,4
200	Dv(10)	27,7	5,7
	Dv(50)	139,7	27,2
	Dv(90)	474,4	123,8
	D[3][2]	43,4	5,2
	D[4][3]	202,1	40,1
270	Dv(10)	25,3	2,2
	Dv(50)	146,7	25,6
	Dv(90)	498,3	62,7
	D[3][2]	46,3	4,6
	D[4][3]	209,5	27,5

Los resultados de las mediciones tras la aerosolización del polvo dECM indican que el polvo era polidispersable. La mediana de la distribución del diámetro volumétrico de las partículas - $Dv(50)$ a un flujo de aire nominal para el inhalador tipo Cyclohaler fue igual a $148,43 \pm 10,14 \mu\text{m}$. Al mismo tiempo, las partículas más pequeñas cuyo volumen total no superaba el 10 % del volumen total de la muestra tenían un diámetro inferior a $28,23 \pm 1,48 \mu\text{m}$ ($Dv(10)$), mientras que el diámetro que distinguía las partículas con un volumen total inferior al 90 % del volumen total de la muestra era de $410,1 \pm 29,41 \mu\text{m}$. El aumento del caudal de aire alimentado al inhalador a 200 y 270 dm^3/min no afectó significativamente al valor de la mediana de la distribución del tamaño volumétrico de las partículas ni al valor $Dv(10)$. Sólo se observó un ligero aumento del tamaño de las partículas más grandes ($Dv(90)$), de aproximadamente $410,1 \pm 29,41 \mu\text{m}$ a $498,3 \pm 62,7 \mu\text{m}$. El resultado fue un aumento del intervalo de distribución de $2,57 \pm 0,04$ (para un caudal de 100 dm^3/min) a $3,3 \pm 0,4$ (para un caudal de 270 dm^3/min).

B. Eficacia del procedimiento de descelularización

- Características proteínicas del producto:

Utilizando la técnica de espectrometría de masas, se determinó la composición proteica de la ECM tras la descelularización del páncreas porcino. Los resultados obtenidos demostraron claramente el mayor porcentaje de colágenos en las muestras analizadas, siendo el colágeno tipo 1 (COL1) de la cadena alfa (A)-1, el denominado COL1A1, el que mostró los valores más altos en comparación con los demás tipos de colágeno detectados.

Tabla 2. Porcentaje de COL1A1 en las muestras analizadas. M18, M22, M23, M24s, M24, M25 indican el número de la muestra.

	control	M18	M22	M23	M24s	M24	M25
% (p/p) de COL1A1 en la muestra	0,001	99,5	91,4	99,5	94,3	92,6	99,3

También se encontraron cantidades significativas de colágeno tipo IV y tipo VI. Esto demuestra que el protocolo de descelularización utilizado permitió preservar los tipos de colágeno que tienen el mayor nivel de integración con los islotes pancreáticos y las células β . El colágeno de tipo I y de tipo IV es el más eficaz para favorecer la funcionalidad y viabilidad de los islotes pancreáticos y se utilizan habitualmente como suplementos en aplicaciones biomédicas que se basan en el funcionamiento de las células de los islotes pancreáticos. En particular, el colágeno VI y IV están presentes en la superficie extrasecretoria y en la membrana basal de los islotes pancreáticos y regulan la actividad de la fibronectina. El contenido porcentual de cualquiera de los otros tipos de colágeno analizados (COL1A2, COL3A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3 COL14A1) no superó el 3,5 % en todas las muestras examinadas.

- Concentración final de ADN

Para determinar la concentración residual de ADN, se realizaron tres análisis:

(a) PicoGreen para determinar la concentración residual de ADN.

(b) Electroforesis en gel de agarosa para determinar el tamaño de partícula del material genético restante.

(c) Imagen microscópica - tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

El procedimiento de descelularización se ha completado con éxito cuando la concentración de ADN residual no superaba los 50 ng de ADN de doble cadena (ADNbc) por mg de ECM de peso seco, y las moléculas del ADN restante no superaban los 200 pares de bases (pb). Además, se evaluó la imagen microscópica del andamio obtenido para detectar la presencia de núcleos celulares (tinción de hematoxilina & eosina).

La concentración de ADN residual en la materia seca fue en promedio de 0,077 ng/mg. En todas las muestras examinadas, el contenido residual de ADN era inferior a 0,15 ng/mg. El análisis se llevó a cabo utilizando los kits DNeasy Blood & Tissue Kit para aislar el ADN residual, y el reactivo Quant-iT PicoGreen dsDNA y Kits para determinar la concentración del material genético aislado.

No se encontró ninguna señal mediante electroforesis en gel de agarosa. Todas las muestras estaban por debajo del nivel de detección, lo que demuestra claramente que ECM no tenía ADN residual en forma de partículas de más de 200 pb.

El examen microscópico mostró que no había material genético ni núcleos celulares visibles tras el procedimiento de descelularización.

- Residuo de Tritón X-100 y procedimiento eficaz para la detección y eliminación del mismo

A modo de comparación, se llevó a cabo una descelularización con 0,5 % (p/v) de SDS. El resultado, sin embargo, no fue satisfactorio debido a las grandes cantidades de detergente que quedaban en el producto final. El polvo de ECM mostró un alto nivel de formación de espuma cuando se intentó disolverlo. Esto no se observó con el uso de Tritón X-100.

Para verificar la concentración de Tritón X-100 remanente después del procedimiento de descelularización, se determinó su residuo en el producto final.

Preparación de las muestras para el análisis:

Dado el color blanco de la dECM disuelta, las muestras se trataron con tres concentraciones de collagenasa: 4.3953 unidades de actividad PZ/g dECM(p), 43,953 PZ/g dECM(p) y 87,906 PZ/g dECM(p). La collagenasa se preparó en una solución especial que contenía 150 ml de solución Ringer de pH 7,2 a 7,4, 2,72 ml de Hepes (1M), 1,125 ml de NaBicarbonato (7,5 %) y 1,05 ml de CaCl_2 (1M).

Las muestras se agitaron durante 24 h a 37 °C con una función constante de agitación a 1000 rpm. Las soluciones obtenidas se analizaron para determinar la concentración residual del detergente no iónico Tritón X-100. La muestra A fue el resultado del tratamiento de dECM con una única concentración de collagenasa. La muestra B se trató con una concentración de collagenasa 10 veces mayor. La muestra C se trató con una concentración de collagenasa 20

veces mayor (A = 6,977 µg de Triton X-100/g dECM(p), B = 40,475 µg de Triton X-100/g dECM(p), C = 39,325 µg de Triton X-100/g dECM(p)).

5 Es importante destacar que la concentración más alta de Tritón X-100 restante se encontró en la solución de dECM tratada con collagenasa a una concentración de 43.953 PZ/g dECM. Un aumento de la concentración de collagenasa no se tradujo en una mayor cantidad de Triton X-100 obtenida, lo que indicaba que la concentración de 43.953 PZ/g de dECM era suficiente para la extracción de todo el Triton X-100 restante de la muestra.

Los anteriores intentos publicados de evaluar este detergente no dieron resultados tangibles por las siguientes razones:

- 10 – la evaluación del polvo de Triton X-100 era imposible, ya que esa forma de ECM absorbía el colorante y, de este modo, distorsionaba el resultado. Esta correlación se demostró analizando el polvo de ECM tras la descelularización con un detergente SDS, que indicaba la presencia de Triton X-100, lo que no fue posible debido al detergente utilizado.
- la dECM, disuelta en pepsina y neutralizada, debido a su color blanco, impedía la lectura de la concentración.

15 Por lo tanto, el tratamiento de dECM con collagenasa es hasta ahora el único procedimiento para evaluar los residuos de detergentes en el material biológico tras la descelularización. Esto es importante cuando tal material (dECM) se va a utilizar en el procedimiento de bioimpresión con células viables. Esto es crucial si tal material fuera a utilizarse para la implantación en seres humanos.

C. Resultados

20 En la primera etapa, se analizaron las diferencias en la composición de la grasa en la matriz descelularizada en función de la preparación del páncreas para la descelularización. En la siguiente etapa, se analizó el contenido de ADN residual, dependiendo del procedimiento de preparación pancreática, el contenido de colágeno y el contenido de detergente residual Triton X-100.

25 El uso del procedimiento de molienda por extrusión mecánica permitió reducir significativamente el contenido de grasa en la matriz extracelular obtenida. En el procedimiento de molienda por extrusión mecánica, el contenido de grasa era del 6,24±0,07 % (p/p), frente al 21,47±0,07 % (p/p) del contenido de grasa en el procedimiento de corte. La diferencia fue estadísticamente significativa (p<0,001). El bajo contenido en grasa de la dECM obtenido aumentó significativamente la viabilidad de las células y los islotes pancreáticos.

30 El contenido de ADN residual probado con Picogreen fue significativamente inferior cuando se utilizó la molienda por extrusión mecánica, concretamente 0,07±0,07 ng/mg en comparación con 0,13 ±0,06 ng/mg de tejido (p=0,027). En ambos casos, este valor era muy inferior al permitido de 50 ng/mg.

El uso del procedimiento de molienda por extrusión mecánica permitió reducir significativamente el contenido de Triton X-100 en la matriz extracelular obtenida. En el procedimiento de molienda por extrusión mecánica, el contenido de detergente fue de 3,79±2,33 µg/g frente a 6,53±2,34 µg/g en el procedimiento de corte. La diferencia fue estadísticamente significativa (p=0,008).

35 El contenido de colágenos en el material probado resultante del procedimiento de preparación no difirió en función del uso del procedimiento de corte y de molienda por extrusión mecánica.

40 El uso de agua con amoníaco para alcalinizar el medio para un mejor lavado de Triton no resultó en un mejor lavado de Triton. Sin embargo, provocó un cambio en la composición de los colágenos obtenidos. Del mismo modo, el lavado a 24 °C no mejoró el lavado de Triton, al tiempo que aumentó el daño a las estructuras de colágeno y dio lugar a la obtención de resultados más altos de contenido de ADN, lo que podría indicar el riesgo de infección del material. Por lo tanto, el procedimiento óptimo fue lavar el material descelularizado en PBS a una temperatura de 4 °C durante 72 horas.

Realización 2: Preparación de biotintas

A. disolución dECM(p)

45 Para obtener una solución de dECM (dECM(r)), se ha establecido un procedimiento de disolución de polvo de dECM (dECM(p)) que utiliza pepsina y ácido clorhídrico (HCl). El procedimiento para obtener la solución dECM se dividió en dos partes:

(a) Disolución de dECM.

50 Se disolvió pepsina (a una concentración de 0-10 mg/ml, preferentemente 1 mg/ml) en 50 ml de HCl 0,01 M, tras lo cual se agregó dECM(p) (0,5 -5 g). Este procedimiento dio lugar a una concentración de dECM(r) en el intervalo de 1-10 % (p/v). La solución preparada se colocó en un agitador magnético, utilizando las siguientes condiciones de

agitación: temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, tiempo de disolución de 72 h, en el que la solución se agitó cada hora durante las primeras 8 h de agitación.

(b) Neutralización de dECM(r).

5 La neutralización de 50 ml de dECM(r) se llevó a cabo en hielo (la temperatura deseada de la solución de dECM era de 4 a 4,5 °C) a pH 7,2 - 7,4 utilizando las siguientes sustancias:

- 5 ml de NaOH 0,1 M (el volumen de NaOH 0,1 M era igual a 1/10 del volumen de dECM(r) para la neutralización);
- 5.56 ml de 10xPBS (el volumen de 10xPBS era igual a 1/9 del volumen de dECM(r) para la neutralización);
- se utilizó un volumen adecuado de 1 × PBS (1-10 ml) para diluir la solución dECM.

10 Para identificar el procedimiento apropiado para la preparación de dECM(r), se analizaron soluciones con una concentración relativamente alta de dECM(p) molida después de la esterilización por radiación - 10 % (p/v) con contenido variable de pepsina.

15 Se prepararon soluciones de dECM con contenido variable de pepsina. La solución que contenía 1 mg/ml de pepsina presentaba una homogeneidad relativamente elevada: un pequeño intervalo de valores de viscosidad. Se observó un ligero cambio en la turbidez con el cambio de temperatura. Todos los procedimientos de disolución analizados con contenido variable de pepsina se utilizaron para la preparación de dECM(r), sin embargo, se demostró que la cantidad de 1 mg/ml utilizada era la óptima.

B. Preparación de las biotintas

(a) Condiciones de obtención de la biotinta primaria:

- 20 – Solución de dECM neutralizada con dECM(p) molida, cortada, con y sin esterilización por radiación o esterilización por óxido de etileno
- Polvo de dECM(p) molido, cortado, con y sin esterilización por radiación o esterilización por óxido de etileno
- GelMa estéril 10-20 % (p/v) con 0,2-0,5 % (p/v) LAP
- HAMA estéril 1-3 % (p/v) con 0,2-0,5 % (p/v) LAP
- Glicerol estéril
- 25 – Medio de cultivo 1:5-7 v/v, islotes pancreáticos 20.000 iEq/ml y líneas celulares: células endoteliales 1×10^5 /ml, células endoteliales microvasculares primarias 1×10^5 /ml, vitaminas: A - 100 µM, B1 - 100 µM, B3 - 10 µM, D3 - 10 nM, factores de crecimiento: VEGF - 30 ng/ml, FGF - 20 ng/ml, factor de necrosis tumoral (TNF)-α - 10 ng/ml, IL-8 - 10 ng/ml, IL-17A - 20 ng/ml.

30 En primer lugar, se preparó una pasta que contenía una cantidad apropiada de dECM(r) y dECM(p) neutralizados mezclándola a fondo con una espátula metálica estéril. Como la dECM(p) se preparó por liofilización y no se disolvió después, conservó la estructura cuaternaria del ECM. La pasta obtenida se dejó a una temperatura de 7-10 °C durante al menos 24h. Justo antes de utilizar la pasta para la producción de biotintas, se colocó en una jeringa estéril y se mezcló entre jeringas. Al mismo tiempo, se prepararon soluciones de GelMa (10-20 % (p/v)) y HAMA (1-3 % (p/v)) con LAP según un procedimiento comúnmente disponible. La jeringa que contenía la pasta se unió con un conector a otra

35 jeringa sin el pistón, que se desplazó boca abajo y se dispuso de forma estable en posición vertical. Se agregaron sucesivamente glicerol, medio de cultivo, factores de crecimiento, vitaminas y soluciones GelMa y HAMA. A continuación, se introdujo suavemente el pistón y se mezcló la pasta con los demás reactivos. Una vez mezclada, la biotinta preparada se colocó en la incubadora durante 5 minutos, se agregaron los islotes y las células, se volvió a mezclar y se introdujo en un cartucho. En la siguiente etapa, el cartucho lleno se centrifugó durante 2 minutos a 1500

40 rpm y se volvió a introducir antes de la impresión durante aprox. 5 minutos en la incubadora.

45 Las composiciones de las biotintas primarias obtenidas fueron las siguientes: 40-50 % (v/v) de dECM(r), 2,763 - 27,692 % (p/v) de dECM(p), 1,464-7,320 % (p/v) de GelMa, 0,146-1,098 % (p/v) de HAMA, 5,0-10,0 % (p/v) de glicerol, 0,03-0,17 % (p/v) de LAP, VEGF - 30 ng/ml, FGF - 20 ng/ml, TGF-β - 10 ng/ml, IL-8 - 10 ng/ml, IL-17A - 20 ng/ml, vitamina A - 100 µM, vitamina B1 - 100 µM, vitamina B3 - 10 µM, vitamina D3 - 10 nM, islotes pancreáticos - 20000 iEq/ml, células endoteliales - 1×10^5 /ml, células endoteliales microvasculares primarias - 1×10^5 /ml.

(b) Biotinta vascular

El procedimiento de producción de biotintas vasculares mediante sonicación se dividió en dos etapas:

- 5
 - Disolución preliminar - se suspendió una cantidad adecuada de gelatina microbiológica en PBS (1 a 2 % (p/v)) y se agitó con un agitador magnético durante aproximadamente 10 minutos a 60 °C. Luego, con agitación constante, se redujo la temperatura y se agregó dECM(p), molido y cortado después y sin esterilización por radiación o esterilización por óxido de etileno en lotes (5 a 10 % (p/v)) y se agitó adicionalmente la solución cada 2 minutos. Dependiendo de la variante, se agregó a la mezcla una solución de carboximetilcelulosa (CMC) previamente preparada a base de PBS (2 a 5 % (v/v)).
- 10
 - Sonicación: se introdujo un frasco con la solución de ECM preparada en un vaso de precipitados con hielo, tras lo cual se colocaron en él un cabezal sonicador y un sensor de temperatura y se realizó el procedimiento de sonicación siguiendo un procedimiento desarrollado mediante pulsos de 3s con una amplitud del 45 %, mientras que se dejaba de trabajar a una temperatura superior a 30 °C señalada por una alarma. La sonicación se realizó durante 0,5 a 2,0 h.
 - Alternativamente, se omitió la etapa de disolución preliminar y se preparó una solución de dECM al 5-10 % (p/v) agregando polvo de dECM a una solución tampón o a una solución de medio celular con agitación suave. A continuación, se realizó la etapa de sonicación como se ha descrito anteriormente.
- 15 El procedimiento de producción de la biotinta vascular por ebullición se dividió en dos etapas:
 - 20
 - Disolución preliminar - se suspendió una cantidad adecuada de gelatina microbiológica en PBS (1 a 5 % (p/v)) y se agitó con un agitador magnético durante aproximadamente 10 minutos a 60 °C. Luego, con agitación constante, se redujo la temperatura y se agregó dECM(p), molido y cortado después y sin esterilización por radiación o esterilización por óxido de etileno en lotes (2 a 10 % (p/v)), y la solución se agitó adicionalmente cada 2 minutos. Dependiendo de la variante, se agregó a la mezcla una solución de CMC previamente preparada a base de PBS (2 a 5 % (v/v)).
 - Ebullición: se colocó un frasco con la solución de ECM preparada o el polvo de ECM (5 a 10 % (p/v)) en solución de PBS en un agitador magnético equipado con una placa calefactora calentada a 100 °C, donde la mezcla se hirvió durante 15 a 30 minutos.
 - 25
 - Alternativamente, se omitió la etapa de disolución preliminar y se preparó una solución de dECM al 5-10 % (p/v) agregando polvo de dECM a una solución tampón o a una solución de medio celular con agitación suave. A continuación, se realizó la etapa de sonicación como se ha descrito anteriormente.
- Las bases de biotinta vascular preparadas de este modo se completaron con fibronectina, factores de crecimiento y células endoteliales.
- 30 La composición de la biotinta vascular sonicada obtenida fue la siguiente: 5-10 % (p/v), preferentemente 7,5 % (p/v) de dECM(p), 0,2-1 % (v/v) de CMC, 1 - 2 % (p/v), preferentemente 1 % (p/v) de gelatina microbiológica, fibronectina - 100 µg/ml, VEGF - 30 ng/ml, FGF -20 ng/ml, PGE2 - 100 nM, $1,5 \times 10^7$ /ml de células endoteliales y 3×10^6 /ml de fibroblastos.
- 35 La composición de la biotinta vascular hervida obtenida fue la siguiente: 2-10 % (p/v), preferentemente 5 % (p/v) de dECM(p), 0,2-2 % (v/v) de CMC, 1 - 5 % (p/v), preferentemente 1 % (p/v) de gelatina microbiológica, fibronectina - 100 µg/ml, VEGF - 30 ng/ml, FGF - 20 ng/ml, PGE2 - 100 nM, $1,5 \times 10^7$ /ml de células endoteliales y 3×10^6 /ml de fibroblastos.
- Alternativamente, la biotinta vascular consistía en 5-10 % (p/v), preferentemente 5 % (p/v) dECM(p) en una solución tampón o un medio celular.
- 40 Realización 3: Características de la biotinta primaria
 - A. Reología
- 45 Las pruebas realizadas sirvieron de base para determinar los valores de los parámetros característicos, que constituyen factores que limitan la posibilidad de utilizar un sistema determinado para imprimir un modelo de lobulillo de páncreas - valor de viscosidad superior a 5 Pa s. A continuación se presenta la influencia de la concentración de pepsina en las propiedades del hidrogel dECM.

Tabla 3. El efecto de la temperatura (25-37 °C) en la turbidez de dECM (r)

	Concentración de pepsina [mg/ml]		
	0	1	10
T [°C]	Absorbencia [-]		
25	2,241	2,3565	2,437
26	2,2415	2,356	2,4365
27	2,2415	2,356	2,4365
28	2,242	2,356	2,4355
29	2,2425	2,356	2,435
30	2,2425	2,3555	2,435
31	2,242	2,3555	2,434
32	2,242	2,3555	2,4325
33	2,2425	2,355	2,4315
34	2,2425	2,3545	2,4295
35	2,2425	2,3535	2,428
36	2,242	2,353	2,424
37	2,242	2,352	2,4215

Tabla 4. La influencia del tiempo de exposición a la temperatura de 37 °C en la turbidez de dECM (r)

	Concentración de pepsina [mg/ml]		
	0	1	10
t [min]	Absorbencia [-]		
0	2,2875	3,1455	2,8155
10	2,282	3,131	2,8075
20	2,2755	3,118	2,786
30	2,2695	3,1005	2,769
40	2,267	3,0885	2,7585
50	2,265	3,081	2,752
60	2,2635	3,0725	2,7455

(continuación)

	Concentración de pepsina [mg/ml]		
	0	1	10
t [min]	Absorbencia [-]		
70	2,2625	3,0685	2,7415
80	2,262	3,065	2,7365
90	2,261	3,0605	2,732
100	2,261	3,0585	2,7295
110	2,2595	3,0545	2,727
120	2,259	3,052	2,7225

Tabla 5. La influencia de la concentración de pepsina en la viscosidad de la dECM (η), medida durante 50 min para una velocidad de cizallamiento constante (2 1/s)

Concentración de pepsina [mg/ml]	η [mPa-s]
0	2109,7 < η < 5611,9
1	3026,9 < η < 4040,7
10	3287,6 < η < 4691,3

5

Con el fin de identificar la composición de la biotinta con propiedades óptimas, se probó la viscosidad de las soluciones y pastas de dECM utilizando el reómetro MCR 72 (Anton Paar) siguiendo un procedimiento especialmente desarrollado para representar las condiciones existentes durante la bioimpresión: sistema de placa cónica, tasa de cizallamiento constante de 21/s y temperatura de ensayo de 37 °C. Los resultados de las pruebas reológicas del sistema teniendo en cuenta las diferencias en las muestras por el tipo de polvo utilizado (MS - molido y esterilizado, CS - cortado y esterilizado, MNS - molido, no esterilizado, CNS - cortado, no esterilizado), y la concentración de los componentes utilizados se presentan en la figura 2.

10

Un aumento de la concentración de las soluciones de dECM produce un aumento de la viscosidad [Figura 2]. Los valores de viscosidad obtenidos parecen demasiado bajos para permitir la utilización de la dECM(r) como agente que confiera una consistencia adecuada a la biotinta. Las soluciones obtenidas con la dECM(p) sometida a esterilización en cada caso considerado presentaban valores de viscosidad inferiores a los de las soluciones en polvo no esterilizadas. Se observó una ligera diferencia en la consistencia de la solución para el uso de polvo molido y cortado en concentraciones más bajas de dECM(r). Para el 10 % (p/v), la dECM(r) en polvo molida era ligeramente más viscosa que la dECM(r) preparada a partir de dECM(p) cortada.

15

El resumen de los resultados muestra que el uso de la pasta de dECM fue necesario para obtener una base de biotinta con una consistencia adecuada. Todos los sistemas del resumen tienen una viscosidad dentro del intervalo aceptable para su uso durante la impresión. Además, parece conveniente utilizar para la bioimpresión una mezcla de componentes con células e islotes utilizando polvo estéril, previa esterilización.

20

La adición de glicerol en la biotinta primaria (pasta) causó una ligera disminución de la viscosidad de la biotinta primaria, contrariamente a los datos de la literatura, que informan de un aumento de la viscosidad de las biotintas tras la adición de glicerol. Cada uno de los agentes agregados a la pasta indujo un cambio en la viscosidad. La adición de sustancias que favorecen el mantenimiento del constructo o la viabilidad de las células y los islotes induce cambios en la fluidez de las pastas que son insignificantes hasta el punto de ser inapreciables. La pasta de dECM constituyó la base para producir la biotinta primaria y para determinar si una biotinta concreta podía utilizarse para la impresión.

25

B. Métodos de solidificación de las biotintas

- Reticulación de impresiones mediante agentes reticulantes

La tabla a continuación presenta las diferencias en la composición de los agentes reticulantes utilizados en la biotinta primaria [Tabla 6].

5 Tabla 6. Diversos agentes de reticulación utilizados en la biotinta primaria.

Agente de reticulación	GelMa	HAMA	GelMa/HAMA		LAP
			GelMa	HAMA	
Concentración [% (p/v)]	1,464 - 7,320	0,146 - 1,098	0,0732 - 5,490	0,0732 - 0,8235	0,03- 0,17

Se han realizado pruebas de capacidad de reticulación de los sistemas anteriores utilizando luz con una longitud de onda en el intervalo de 365 a 405 nm con un resultado positivo [Tabla 7].

Tabla 7. % de ADN dañado por exposición a luz de 365 y 405 nm de longitud de onda

Tiempo de exposición (s)	% de ADN dañado por exposición a luz de 365 nm de longitud de onda			% de ADN dañado por exposición a luz de 405 nm de longitud de onda		
	islotos pancreáticos	células alfa de los islotos pancreáticos	células beta de los islotos pancreáticos	islotos pancreáticos	células alfa de los islotos pancreáticos	células beta de los islotos pancreáticos
0 s		1,0 %	1,0 %		4,0 %	4,0 %
10 s	12,0 %	2,0 %	1,5 %	2,0 %	2,5 %	1,5 %
30 s	14,0 %			5,5 %		
60 s	45,0 %	5,0 %	1,5 %	2,0 %	3,5 %	2,0 %
90 s	18,0 %			9,5 %		
120 s	19,0 %	6,0 %	2,0 %	3,5 %	16,0 %	5,5 %
180 s	20,0 %			5,0 %		
300 s	50,0 %	7,5 %	2,0 %	6,0 %	9,5 %	3,0 %

El análisis de los resultados de la reticulación después del procedimiento o durante el procedimiento de bioimpresión mostró que tanto el uso de luz de longitud de onda de 365 nm como de 405 nm logró el efecto deseado, es decir, el cambio de la forma del hidrogel de líquida a sólida. Sin embargo, como la biotinta contiene células y microorganismos, sólo puede utilizarse luz visible. Por lo tanto, el procedimiento más preferible de reticulación es utilizar luz con una longitud de onda de 405 nm.

La adición de sustancias químicas suplementarias a la pasta de dECM dio como resultado una topografía suavizada de la superficie del filamento. Además, se identificó un aumento de la aireación de la biotinta al agregar GelMa y HAMA, siendo este efecto más potente con HAMA.

- Gelificación térmica

La intensidad del procedimiento de gelificación se comprobó mediante la identificación de la turbidez de la solución utilizando equipos especializados en un intervalo amplio de temperaturas y tiempo de exposición al efecto de las mismas. La figura 3 muestra ejemplos de resultados de la prueba de reticulación en solución dECM. Para el 5 % (p/v) se observó un ligero aumento de la absorbencia en todos los sistemas probados producido por el aumento de la temperatura dentro del intervalo de 25-37 °C. El uso de polvo molido y estéril reduce la turbidez de la solución de

dECM. En el caso de concentraciones más elevadas de dECM(r) (8 y 10 % (p/v)) para las soluciones de polvo cortado, se obtuvo la misma correlación de esterilización, mientras que fue lo contrario para el polvo molido. Tanto el 8 como el 10 % (p/v) de dECM(r) aumentaron ligeramente su turbidez con el incremento de temperatura. el 10 % de dECM(r) mostró una turbidez relativamente alta y fue estable en el intervalo de temperatura probado

- 5 Basándose en la cinética de gelificación a una temperatura constante de 37 °C, no se observaron cambios significativos en la turbidez al aumentar el tiempo de exposición a la temperatura de 37 °C. dECM(r) de polvo estéril molido tiene el valor de absorbencia más bajo, mientras que la solución de polvo no estéril cortado tiene la turbidez más alta para todas las concentraciones de dECM(r).

C. Permeabilidad de los componentes de la biotinta ejemplificada por la difusión de glucosa

- 10 Con el aumento de la llamada fuerza impulsora, es decir, la concentración de glucosa, el tiempo de retraso y de alcanzar el estado de equilibrio disminuye, con el correspondiente aumento de la difusividad. Los datos presentados en la tabla 8 muestran que la difusividad de las membranas obtenidas con la biotinta primaria era comparable a las obtenidas con alginato al 4 % (p/v) (Alg4).

- 15 Tabla 8. Difusividad de las membranas de la biotinta primaria complementada con diferentes aditivos. Se agregó alginato al 4 % para comparar.

	Glucosa [mM]					
	2,78			12,00		
parámetro	t retraso [min]	t meseta [min]	D [cm ² /s]	t retraso [min]	t meseta [min]	D [cm ² /s]
Alg4	110,0	175,0	0,26	10,0	35,0	1,62
HAMA	77,5	122,5	0,36	10,0	55,0	1,85
GelMa	170,0	195,0	0,16	20,0	28,0	2,78
HAMA/GelMa	85,0	145,0	0,34	7,5	45,0	0,87

D. Absorbencia

- 20 Para evaluar la capacidad de uso de la biotinta obtenida, se llevó a cabo un análisis de absorbencia de los lóbulos impresos utilizando un tampón especialmente preparado que imitaba el estado interno del cuerpo. Durante los primeros 15 minutos, se observó un ligero aumento del peso del constructo impreso, seguido de su disminución y estabilización en un nivel específico. En la siguiente etapa, se observaron los cambios de peso a lo largo del tiempo del lobulillo impreso para estudiar el fenómeno de degradación en el medio tampón SBF [Figura 4].

Realización 4: Características de la biotinta vascular

A. Reología

- 25 La dECM(r) hervida tiene un valor de viscosidad mucho mayor que la sonicada. Sin embargo, debido a la adecuada estabilidad de la biotinta vascular tras la sonicación, se determinó que este procedimiento era más preferible para la impresión del conducto vascular.

B. Gelificación

- 30 Un aumento de la temperatura en el intervalo de 25 a 37 °C y del tiempo de exposición a la temperatura de 37 °C produce una ligera disminución de la concentración de dECM hervida y sonicada.

Tabla 9. El efecto de la temperatura en la concentración de dECM utilizada para la producción de la biotinta vascular

T [°C]	Absorbencia de dECM hervida			Absorbencia de dECM sonicada		
	5 % (p/v)	7,5 % (p/v)	10 % (p/v)	5 % (p/v)	7,5 % (p/v)	10 % (p/v)
25,4	2,248	2,401	2,236	2,514	3,028	3,030

26	2,247	2,401	2,234	2,513	3,027	3,028
27	2,247	2,401	2,230	2,513	3,028	3,031
28	2,247	2,400	2,225	2,514	3,027	3,029
29	2,246	2,400	2,221	2,513	3,031	3,029
30	2,246	2,399	2,222	2,514	3,030	3,030
31	2,245	2,399	2,220	2,514	3,029	3,030
32	2,244	2,399	2,212	2,514	3,029	3,030
33	2,244	2,398	2,210	2,514	3,029	3,028
34	2,243	2,398	2,209	2,514	3,033	3,029
35	2,242	2,397	2,208	2,514	3,031	3,027
36	2,242	2,396	2,209	2,513	3,030	3,028
37	2,241	2,393	2,209	2,513	3,032	3,028

Tabla 10. El efecto del tiempo de exposición a la temperatura de 37 °C sobre la concentración de dECM utilizada para la producción de la biotinta vascular

t [min]	Absorbencia de dECM hervida			Absorbencia de dECM sonicada		
	5 % (p/v)	7,5 % (p/v)	10 % (p/v)	5 % (p/v)	7,5 % (p/v)	10 % (p/v)
0	2,267	2,446	2,251	2,750	2,684	2,762
10	2,276	2,439	2,239	2,748	2,691	2,768
20	2,272	2,428	2,251	2,740	2,691	2,764
30	2,269	2,416	2,243	2,730	2,690	2,759
40	2,270	2,412	2,240	2,721	2,690	2,757
50	2,275	2,412	2,238	2,714	2,686	2,754
60	2,279	2,412	2,230	2,707	2,685	2,751
70	2,274	2,413	2,228	2,703	2,684	2,749
80	2,277	2,415	2,227	2,698	2,683	2,746

(continuación)

t [min]	Absorbencia de dECM hervida			Absorbencia de dECM sonicada		
	5 % (p/v)	7,5 % (p/v)	10 % (p/v)	5 % (p/v)	7,5 % (p/v)	10 % (p/v)
90	2,273	2,416	2,220	2,694	2,681	2,745
100	2,271	2,416	2,216	2,690	2,680	2,742
110	2,271	2,417	2,219	2,686	2,678	2,741
120	2,270	2,417	2,213	2,684	2,676	2,740

Realización 5: Efecto de la presión utilizada durante la bioimpresión en la viabilidad de las células y los micro órganos

5 Se realizaron pruebas de viabilidad en fibroblastos (líneas celulares 3T3-L1 y HFF-1) e islotes pancreáticos. Para ello, se sometieron células/islotes pancreáticos a una presión en el intervalo desde 15 kPa a 100 kPa utilizando una aguja con un diámetro de 0,2 y 0,6 mm. Los resultados de las pruebas realizadas mostraron que las fuerzas de cizallamiento inducidas durante la bioimpresión 3D mediante el procedimiento de extrusión producen cambios significativos en la viabilidad de las células y los microorganismos.

Tabla 11. Porcentaje de células 3T3-L1 vivas y muertas tras aplicar presiones predeterminadas.

Aguja 0,6 mm							
	control	15 kPa	25 kPa	30 kPa	50 kPa	75 kPa	100 kPa
	99 %	100 %	99 %	98 %	98 %	97 %	98 %
p	--	0,0817	1	0,1771	0,4368	0,067	0,1102
Aguja 0,2 mm							
	97 %	97 %	95 %	94 %	87 %	89 %	97 %
p	--	0,0352	0,0247	0,0001	0	< 0,00001	< 0,00001

10

Tabla 12. El porcentaje de células HFF-1 vivas y muertas tras aplicar presiones predeterminadas.

Aguja 0,6 mm							
	control	15 kPa	25 kPa	30 kPa	50 kPa	75 kPa	100 kPa
	87 %	91 %	89 %	83 %	91 %	84 %	86 %
p	--	0,1947	0,6025	0,2606	0,1987	0,3478	0,6158

(continuación)

Aguja 0,2 mm							
	87 %	74 %	74 %	79 %	82 %	78 %	80 %
p	--	0,0001	0	0,0061	0,0463	0,0018	0,0114

Tabla 13. La viabilidad de los islotes pancreáticos sometidos a una presión determinada con una aguja de 0,6 mm. Para los islotes pancreáticos, es preferible no utilizar un diámetro de aguja menor, ya que el diámetro de los islotes pancreáticos varía entre 50 y 500 μm .

Islotes pancreáticos de porcino - aguja 0,6 mm							
	control	15 kPa	25 kPa	30 kPa	50 kPa	75 kPa	100 kPa
	100 %	78 %	92 %	71 %	64 %	86 %	75 %
p	--	0,22		0,83	0,042	0,019	0,037
Islotes pancreáticos de rata - aguja de 0,2 mm							
	86 %	95 %	-	56 %	66 %	35 %	22 %
p	-	1	-	0,001	0,019	0,002	0,0001

Para obtener una estructura biológica tridimensional viable y funcional, era necesario que la presión y el diámetro de la aguja se ajustaran al tipo celular concreto. Sin embargo, se aplicaron preferentemente presiones no superiores a 30 kPa.

Realización 5: Imprimibilidad

Las impresiones con biotinta primaria se realizaron con los siguientes parámetros: presión: 4 - 100 kPa, velocidad de impresión: 5 - 40 mm/s, temperatura: cabezal de impresión - 10-37 °C; lecho de impresión- 4-37 °C, diámetro de la aguja: 100 nm - 1 mm. Las impresiones con biotinta vascular se realizaron con los siguientes parámetros: presión: 5 - 100 kPa, velocidad de impresión: 5 - 40 mm/s, temperatura: cabezal de impresión - 10-37 °C; lecho de impresión- 4-37 °C, diámetro de la aguja: 100 nm - 1 mm.

- Lobulillo

Se tardó aproximadamente 3 minutos en imprimir un lobulillo pancreático provisto de un vaso. La figura 6 muestra un modelo 3D de un lobulillo vascularizado y una imagen del constructo impreso. Se utilizó el SEM para identificar la morfología de la superficie lateral y la sección transversal del lobulillo impreso. Se observó una disposición laxa de los filamentos de biotinta que estaba detrás de la considerable porosidad del lobulillo. Además, basándose en un análisis de la sección transversal, se identificó la estratificación de la estructura porosa tridimensional provista de conductos permeables que imitan vasos.

- Estructura tridimensional vascularizada

Se tardó aproximadamente 30 minutos en imprimir un prototipo de páncreas biónico provisto de una red de conductos permeables. Como en el caso del lobulillo, se observó una disposición suelta de los filamentos de biotinta en la estructura altamente porosa del constructo impreso abastecida por una red de conductos permeables.

El sistema vascular impreso se evaluó mediante resonancia magnética nuclear. Las reconstrucciones 3D realizadas muestran conductos permeables sin tendencia al colapso o a la disección.

Realización 5: Citotoxicidad del lobulillo impreso

Se realizó un ensayo MTT en una línea de fibroblastos (3T3) para evaluar la citotoxicidad de la biotinta primaria. El resultado se presenta como % del control a la concentración máxima de extracto [Tabla 14]. El tiempo de exposición

al extracto fue de 24 h y se sembraron células de densidad $1 \times 10^5/\text{ml}$. Ambos ensayos no mostraron citotoxicidad para la línea celular probada.

Tabla 14. Resultados del ensayo MTT de citotoxicidad de la biotinta primaria. Pruebas realizadas en la línea de fibroblastos 3T3.

MTT	Material	Forma de bioimpresión 3D (concentración máxima del extracto (100 %))
Tiempo de extracción (día)	3T3	% de control
1	% de control	106,59
	SD (%)	7,72
7	% de control	121,74
	SD (%)	9,29
14	% de control	117,17
	SD (%)	10,18
Control positivo	% de control	7,37
	SD (%)	9,49

5

Realización 6: Efecto de los componentes individuales de la biotinta en la funcionalidad y viabilidad de los islotes / células pancreáticas.

Para evaluar el efecto de los componentes individuales de la biotinta primaria sobre la vitalidad y funcionalidad de los islotes pancreáticos, se realizó una prueba de estimulación con glucosa.

10 - Glicerol

Debido a sus propiedades, la adición de 5 % (p/v) y 10 % (p/v) de glicerol a la biotinta mejoró la imprimibilidad de la biotinta primaria. Para evaluar su efecto sobre la funcionalidad de los islotes pancreáticos, se agregó glicerol al medio de cultivo a una concentración del 5 % o del 10 % y los islotes se incubaron en este durante 24 h [Figura 8]. En ambos casos, la funcionalidad de los islotes pancreáticos es muy superior a la de los islotes pancreáticos sólo en el medio de cultivo.

15

- Suplementos proteínicos disponibles en el mercado

Se probó el efecto de la adición de proteínas de matriz extracelular sobre la funcionalidad y viabilidad de los islotes pancreáticos. Para ello, se preparó una solución compuesta por 0,007 mg/ml de ácido hialurónico, 0,041 mg/ml de colágeno I, 0,122 mg/ml de colágeno IV y 0,084 mg/ml de laminina, que se agregó al medio de cultivo. El experimento se realizó con dos tipos de ácido hialurónico: de alto peso molecular o de bajo peso molecular, que se agregaron al medio de cultivo y en el que se incubaron los islotes durante 48 h [Figura 9]. Tanto en las variantes de ácido hialurónico de alto (H) como de bajo (L) peso molecular, los islotes pancreáticos eran funcionales a un nivel comparable al de los islotes no tratados con ningún suplemento.

20

- GelMA

Se probó cómo la viabilidad de los islotes puede verse afectada por la gelatina metacrilada que, como componente de la biotinta, debe garantizar la correcta reticulación de la impresión. Para ello, se agregó GelMA al 7,8 % v/v al medio de cultivo y los islotes se incubaron en este durante 72 h [Figura 10]. Los islotes cultivados en el medio con GelMA agregado secretaban cantidades similares o superiores de insulina en función del momento de la medición, lo que indicaba un efecto favorable de este compuesto a una concentración determinada sobre la viabilidad de los islotes.

25

30 - HAMA

Se probó cómo la viabilidad de los islotes puede verse afectada por el ácido hialurónico metacrilado que, como componente de la biotinta, debe garantizar la correcta reticulación de la impresión. Para ello, se agregó HAMA al 0,78

% v/v al medio de cultivo y los islotes se incubaron en este durante 48 h [Figura 11]. Los islotes cultivados en el medio con HAMA segregaron cantidades inferiores de insulina que los islotes de control, lo que puede indicar un efecto adverso del compuesto en la concentración probada sobre la viabilidad de los islotes.

- GelMA y HAMA

Se probó cómo la viabilidad de los islotes puede verse afectada por una mezcla de gelatina metacrilada y ácido hialurónico metacrilado que, como componente de la biotinta, debe garantizar la correcta reticulación de la impresión. Para ello, se agregaron al medio de cultivo GelMa al 4,68 % v/v y HAMA al 0,312 % v/v (G3:2H) o GelMa al 3,12 % v/v y HAMA al 0,468 % v/v (G2:3H) y los islotes se incubaron en este durante 72 h [Figura 12]. Los islotes cultivados en el medio con la adición de la mezcla en la proporción G3:2H segregaron cantidades mayores o menores de insulina en comparación con los islotes de control, dependiendo del momento de la medición. Esta variante de la mezcla parecía tener un efecto favorable sobre la viabilidad de los islotes. Los islotes cultivados en el medio con la adición de la mezcla en la proporción G2:3H secretaban significativamente menos insulina que los islotes de control, lo que indicaba un efecto adverso de la mezcla de GelMa y HAMA en las concentraciones dadas sobre la viabilidad de los islotes.

- Polvo de ECM

Se probó cómo la ECM obtenida mediante descelularización podía afectar a la viabilidad de los islotes. Para ello, se agregó al medio de cultivo 3,33 % v/v de ECM cortada o molida durante la descelularización y los islotes se incubaron en este durante 72 h [Figura 13]. Los islotes cultivados en el medio con adición de ECM molido tuvieron un efecto favorable sobre la secreción de insulina por los islotes durante 24 h. El medio con ECM cortada agregado redujo significativamente la secreción de insulina, lo que podría indicar un efecto adverso sobre la viabilidad de los islotes.

Realización 7: Viabilidad de los islotes pancreáticos tras la bioimpresión

Se seleccionaron tres biotintas para evaluar la viabilidad de los islotes pancreáticos tras la bioimpresión 3D: gelatina metacrilada, ácido hialurónico metacrilado, una mezcla de gelatina metacrilada y ácido hialurónico metacrilado. Para ello, se agregaron a la biotinta primaria 7,8 % v/v de GelMa o 0,78 % v/v de HAMA o una mezcla de 4,68 % v/v de GelMa y 0,312 % v/v de HAMA (MIX). Tras la impresión, los lobulillos con islotes se incubaron en medio de cultivo durante 24 h [Figura 14].

Los islotes del lobulillo impreso con la biotinta primaria, que contenía una adición de GelMa, mostraron el mayor nivel de insulina producida tras el procedimiento de impresión, indicando de este modo un efecto favorable de este componente sobre la viabilidad y funcionalidad de los islotes pancreáticos. Tanto la adición de HAMA como la mezcla de GelMa y HAMA a la biotinta indujeron una ligera disminución de los niveles de insulina producida por los islotes en comparación con los islotes de control cultivados en el medio (que no fueron bioimpresos en 3D). Aunque los resultados de la biotinta con la adición de GelMa solo mostraron la mayor actividad de los islotes a la concentración de glucosa dada, las estructuras impresas fueron las menos estables y las que más rápido se desintegraron en el medio de cultivo. Por lo tanto, la mejor solución fue utilizar una mezcla de gelatina metacrilada y ácido hialurónico metacrilado para el procedimiento de bioimpresión. Esta combinación permitió preservar islotes pancreáticos viables y funcionales al tiempo que se mantenían los parámetros de bioimpresión adecuados y la estabilidad del modelo impreso.

Realización 8: Confirmación de la estructura cuaternaria conservada de dECM en la biotinta primaria.

Con el fin de visualizar y confirmar la preservación de la estructura cuaternaria de la ECM en el constructo impreso que comprende la biotinta primaria, se realizó una visualización mediante microscopía electrónica de las estructuras proteicas en etapas individuales de la preparación de la dECM (con el fin de utilizarla en bioimpresión) (Figura 15). Los constructos impresos (E y F) con biotinta primaria presentaban una estructura cuaternaria de colágeno con fibras de colágeno visibles.

Referencias:

[1] Mohamed Ali, Anil Kumar PR, James J. Yoo, Faten Zahran, Anthony Atala and Sang Jin Lee (2019). A Photo-Crosslinkable Kidney ECM-Derived Bioink Accelerates Renal Tissue Formation, Adv. Healthcare Mater, 1800992, DOI: 10.1002/adhm.201800992

[2] Pengfei Chen, Lin Zheng, Yiyun Wang, Min Tao, Ziang Xie, Chen Xia, Chenhui Gu, Jiabin Chen, Pengcheng Qiu, Sheng Mei, Lei Ning, Yiling Shi, Chen Fang, Shunwu Fan and Xianfeng Lin (2019). Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration, Theranostics. 9(9): 2439-2459.

[3] Falguni Pati, Jinah Jang, Dong-Heon Ha, Sung Won Kim, Jong-Won Rhie, Jin-Hyung Shim, Deok-Ho Kim & Dong-Woo Cho (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink, Nature communications, 5:3935, DOI: DOI: 10.1038/ncomms4935 10.1038/ncomms4935

- [4] Lee, H., Han, W., Kim, H., Ha, D.-H., Jang, J., Kim, B. S. and Cho, D.-W. (2017). Development of Liver Decellularized Extracellular Matrix Bioink for Three-Dimensional Cell Printing-Based Liver Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 18(4), 1229-1237. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01908
- 5 [5] Sackett, S. D., Tremmel, D. M., Ma, F., Feeney, A. K., Maguire, R. M., Brown, M. E., ... Odorico, J. S. (2018). Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-28857-1
- [6] Mirmalek-Sani, S. H., Orlando, G., McQuilling, J. P., Pareta, R., Mack, D. L., Salvatori, M., ... & Soker, S. (2013). Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*, 34(22), 5488-5495.
- 10 [7] Brown, B. N., Freund, J. M., Han, L., Rubin, J. P., Reing, J. E., Jeffries, E. M., ... Badylak, S. F. (2011). Comparison of Three Methods for the Derivation of a Biologic Scaffold Composed of Adipose Tissue Extracellular Matrix. *Ingeniería de tejidos Parte C: Methods*, 17(4), 411-421. doi:10.1089/ten.tec.2010.0342

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de matriz extracelular descelularizada sin detergente (dECM) que comprende las siguientes etapas:

- 5 - fragmentación mecánica, preferentemente por extrusión mecánica, de un órgano de origen animal seleccionado entre páncreas, hígado, riñones, corazón, piel, pulmones, intestino grueso, intestino delgado, arterias y venas sanguíneas, tejido adiposo y placenta, en la que el órgano se separa del cuerpo del animal
- 10 - incubación del órgano fragmentado en una solución detergente tamponada, que comprende preferentemente 1XPBS, donde la solución detergente tamponada comprende 0,5 % - 1,5 %, preferentemente 1 % (v/v), octoxinol-9, en la que la solución detergente se complementa con un agente antimicrobiano, preferentemente estreptomicina, preferentemente a una concentración de 0.01 % (p/v), y la incubación se realiza a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferentemente a 4 °C, durante al menos 72 h con agitación, en la que el órgano fragmentado se transfiere a una solución detergente fresca cada 4 a 12 horas
- 15 - incubación del órgano fragmentado en una primera solución tamponada de lavado, que comprende preferentemente 1XPBS, donde la primera solución tamponada de lavado comprende un agente antimicrobiano, preferentemente estreptomicina, preferentemente a una concentración del 0,01% (p/v), durante al menos 72 h a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferentemente a 4 °C con agitación, en la que el órgano fragmentado se transfiere a una nueva solución de lavado cada 4 a 12 horas
- 20 - incubación del órgano fragmentado en una solución de desoxirribonucleasa que comprende DNAsa, preferentemente a una concentración de 0,0001 a 0,0003 % (p/v), más preferentemente 0,0002 % (p/v), preferentemente durante al menos 8 horas a una temperatura adecuada para la actuación de la DNAsa
- 25 - incubación del órgano fragmentado en una segunda solución tamponada de lavado, preferentemente que comprenda 1XPBS, donde la segunda solución tamponada de lavado comprenda un agente antimicrobiano, preferentemente estreptomicina, preferentemente a una concentración del 0,01 % (p/v), durante al menos 72 h a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferentemente a 4 °C con agitación, en la que el órgano fragmentado se transfiere a una nueva solución de lavado cada 4 a 12 horas
- 30 - congelación del órgano fragmentado y trituración del órgano fragmentado congelado en fragmentos
- liofilización del órgano fragmentado congelado, preferentemente a -32 °C, preferentemente a una presión de 0,31mbar (31 Pa).
- 35 - secado final opcional de 5 a 15 minutos a 0,0010 mbar (0,1 Pa) y -76 °C
- molienda del producto triturado y secado en polvo de 25 - 500 µm de dECM
- esterilización opcional del producto, preferentemente por radiación y/u óxido de etileno

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de molienda va seguida de una etapa de comprobación de la cantidad de octoxinol-9 en el polvo de dECM, en la que preferentemente antes de comprobar la presencia de octoxinol-9 en el polvo de dECM, se trata con colagenasa, preferentemente a una concentración de 43,953 PZ/g de dECM.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de molienda va seguida de las siguientes etapas:

- 40 - disolución del polvo de dECM en una solución de ácido clorhídrico, preferentemente 0,01 M, complementada con 0-10 mg/ml de pepsina
- mezcla durante 48-72 h, preferentemente durante 72 h, a temperatura ambiente;
- neutralizar en hielo, preferentemente utilizando base sódica 0,1 M y solución PBS.

4. Un procedimiento de preparación de una biotinta primaria que comprende las siguientes etapas:

- 45 - preparación de una pasta que comprenda 5-50 % (p/v), preferentemente 15-25 % (p/v), del polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2, y 1-10 % (p/v), preferentemente 8-10 % (p/v), de la solución de dECM obtenible por el procedimiento definido en la reivindicación 3, mediante mezcla
- incubación de la pasta a una temperatura de 7-10 °C durante al menos 24 horas
- 50 - adición de 1,46 -7,32 % (p/v) de gelatina metacrilada, 0,15-1,10 % (p/v) de ácido hialurónico metacrilado y 5 a 10 % (p/v) de glicerol, y un fotoiniciador, preferentemente 0,03 -0,17 % (p/v) de fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio, seguido de un mezclado suave.

5. Una biotinta primaria que comprende una pasta de dECM y 1,46 -7,32 % (p/v) de gelatina metacrilada, 0,15-1,10 % (p/v) de ácido hialurónico metacrilado y 5 a 10 % (p/v) de glicerol, y un fotoiniciador, preferentemente 0,03-0,17 % (p/v) fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio, en el que la pasta de dECM comprende 5-50 % (p/v), preferentemente 15-25 % (p/v), del polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2, y 1-10 % (p/v), preferentemente 8-10 % (p/v), de la solución de dECM obtenible por el procedimiento definido en la reivindicación 3 y en la que la viscosidad de la biotinta primaria es de al menos 5 Pa s, medida en un sistema de placa cónica, a una velocidad de cizallamiento constante de 21/s y una temperatura de 37 °C.

6. La biotinta primaria según la reivindicación 5, que comprende al menos un aditivo seleccionado entre: ácido hialurónico a una concentración de 0,001 a 0,100 mg/ml de la biotinta primaria, preferentemente, 0,007 mg/ml, laminina a una concentración de 0,005 a 0,100 mg/ml de la biotinta primaria, preferentemente, 0,084 mg/ml, colágeno I a una concentración de 0,001 a 0,100 mg/ml de la biotinta primaria, preferentemente, 0,041 mg/ml, colágeno IV a una concentración de 0,005 a 0,175 mg/ml de la biotinta primaria, preferentemente, 0,122 mg/ml, fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, fibrinógeno humano a una concentración de 10 a 100 mg/ml de la biotinta primaria, aprotinina a una concentración de 1 a 2 EPU/ml de la biotinta primaria, polisorbato a una concentración de 0,05 a 2 mg/ml de la biotinta primaria, trombina humana a una concentración de 5 a 55 mg/ml de la biotinta primaria, cloruro de calcio a una concentración de 20 a 60 mM/ml de la biotinta primaria; vitaminas proangiogénicas: vitamina A a una concentración de 1 nM - 500 µM, preferentemente 100 µM, vitamina B 1 a una concentración de 50-100 µM, preferentemente 100 µM, vitamina B3 a una concentración de 1 a 10 µM, preferentemente 10 µM, vitamina B12 a una concentración de 10 a 100 mg/ml de la biotinta primaria, vitamina D3 a una concentración de 0,1 a 10 nM, preferentemente 10 nM, factores de crecimiento que apoyan la angiogénesis: VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml de la biotinta primaria, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml de la biotinta primaria, preferentemente 20 ng/ml, TGF-β a una concentración de 1 a 10 ng/ml de la biotinta primaria, preferentemente 20 ng/ml, interleucina (IL)-8 a una concentración de 0 a 100 ng/ml de la biotinta primaria, preferentemente 10 ng/ml, IL-17A a una concentración de 20 a 50 ng/ml de la biotinta primaria, preferentemente 20 ng/ml.

7. La biotinta primaria según la reivindicación 5 o 6, que comprende uno o más aditivos derivados de animales o humanos seleccionados de células endoteliales a una densidad de 0,1 -10×10⁵/ml de la biotinta primaria, células endoteliales microvasculares primarias a una concentración de 0,1 to 10×10⁵/ml de la biotinta primaria, células α de origen animal o humano a una concentración de 3 a 9 ×10⁶ /ml de la biotinta, células β de origen animal o humano a una concentración de 1,1 a 3,4 × 10⁷/ml de la biotinta, islotes pancreáticos de origen animal o humano, preferentemente en una cantidad de 20.000 iEq/ml de la biotinta primaria.

8. Un procedimiento de preparación de una biotinta vascular que comprende las etapas de:

a) preparación opcional de una solución de gelatina microbiológica complementada con CMC que comprende la preparación de una solución al 1-2 % (p/v) de gelatina microbiológica en una solución tampón, preferentemente PBS, suspendiendo la gelatina microbiológica en la solución tampón con agitación a una temperatura comprendida entre 50 y 65 °C, preferentemente a 60 °C, adición de una solución acuosa de carboximetilcelulosa (CMC) al 2 - 5 % (v/v) para obtener una concentración final del 0.2-1 % (v/v) de CMC en la biotinta vascular y enfriamiento de la solución a una temperatura igual o inferior a 40 °C

b) preparación de una solución de dECM al 5-10 % (p/v) agregando el polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2, preferentemente esterilizado por radiación, a (i) la solución de gelatina microbiológica complementada con CMC obtenida en la etapa a) o (ii) una solución tampón o (iii) una solución de medio celular con agitación suave.

c) sonicación de la solución obtenida a una temperatura no superior a 37 °C durante 0,5 - 2,0 horas

d) adición opcional de al menos un aditivo de origen animal o humano seleccionado entre: fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml, preferentemente 20 ng/ml, PGE2 a una concentración entre 100 y 300 nM, preferentemente 100 nM, células endoteliales a una densidad entre 0.1 y 10×10⁷ células/ml de la biotinta, fibroblastos a una densidad entre 0,1 y 10×10⁶ células/ml de la biotinta.

9. Un procedimiento de preparación de una biotinta vascular que comprende las etapas de:

a) preparación opcional de una solución de gelatina microbiológica complementada con CMC que comprende la preparación de una solución al 1-2 % (p/v) de gelatina microbiológica en una solución tampón, preferentemente PBS, suspendiendo la gelatina microbiológica en la solución tampón con agitación a una temperatura comprendida entre 50 y 65 °C, preferentemente a 60 °C, adición de una solución acuosa de carboximetilcelulosa (CMC) al 2 - 5 % (v/v) para obtener una concentración final del 0.2-1 % (v/v) de CMC en la biotinta vascular y enfriamiento de la solución a una temperatura igual o inferior a 40 °C

b) preparación de una solución de dECM al 5 -10 % (p/v) por adición de polvo de dECM obtenible por el procedimiento definido en una de las reivindicaciones 1 o 2, preferentemente esterilizado por radiación, a (i) la solución de gelatina

microbiológica complementada con CMC obtenida en la etapa a) o (ii) una solución tampón o (iii) una solución de medio celular con agitación suave.

c) hervir la mezcla a 100 °C durante 15-30 minutos

5 d) adición opcional de al menos un aditivo de origen animal o humano seleccionado entre: fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml, preferentemente 20 ng/ml, PGE2 a una concentración entre 100 y 300 nM, preferentemente 100 nM, células endoteliales a una densidad entre 0.1 y 10×10⁷ células/ml de la biotinta, fibroblastos a una densidad entre 0,1 y 10×10⁶ células/ml de la biotinta.

10 10. Una biotinta vascular que comprende la solución de dECM sonicada o hervida obtenible por el procedimiento definido en la reivindicación 3 a una concentración de 2 - 10 % (p/v), preferentemente complementada con gelatina microbiológica a una concentración de 1 a 5 % (p/v) y/o CMC a una concentración de 0,2 a 2 % (v/v).

15 11. La biotinta vascular según la reivindicación 10 que comprende al menos un aditivo de origen animal o humano seleccionado entre: fibronectina a una concentración de 3 a 300 µg/ml, preferentemente 100 µg/ml, VEGF a una concentración de 10 a 30 ng/ml, preferentemente 30 ng/ml, FGF a una concentración de 10 a 20 ng/ml, preferentemente 20 ng/ml, PGE2 a una concentración entre 100 y 300 nM, preferentemente 100 nM, células endoteliales a una densidad entre 0.1 y 10×10⁷ células/ml de la biotinta vascular, fibroblastos a una densidad entre 0,1 y 10×10⁶ células/ml de la biotinta vascular.

20 12. Una estructura tridimensional que comprende al menos tres capas adyacentes de biotinta, en la que una capa de la biotinta vascular definida en la reivindicación 10 u 11 está dispuesta entre dos capas de la biotinta primaria definida en una de las reivindicaciones 5 a 7.

25 13. Un procedimiento de preparación de una estructura tridimensional, en el que la biotinta primaria definida en una de las reivindicaciones 5 a 7 y la biotinta vascular definida en la reivindicación 10 u 11 se depositan capa por capa en un procedimiento de bioimpresión 3D a una velocidad de impresión de 5 a 50 mm/s, una presión de 4 a 300 kPa y una temperatura de 4 a 37 °C, y en el que durante o después de la deposición la biotinta primaria se expone a luz UV y/o luz visible, preferentemente de longitud de onda de 365 a 405 nm, más preferentemente a 405 nm, durante al menos 5 segundos.

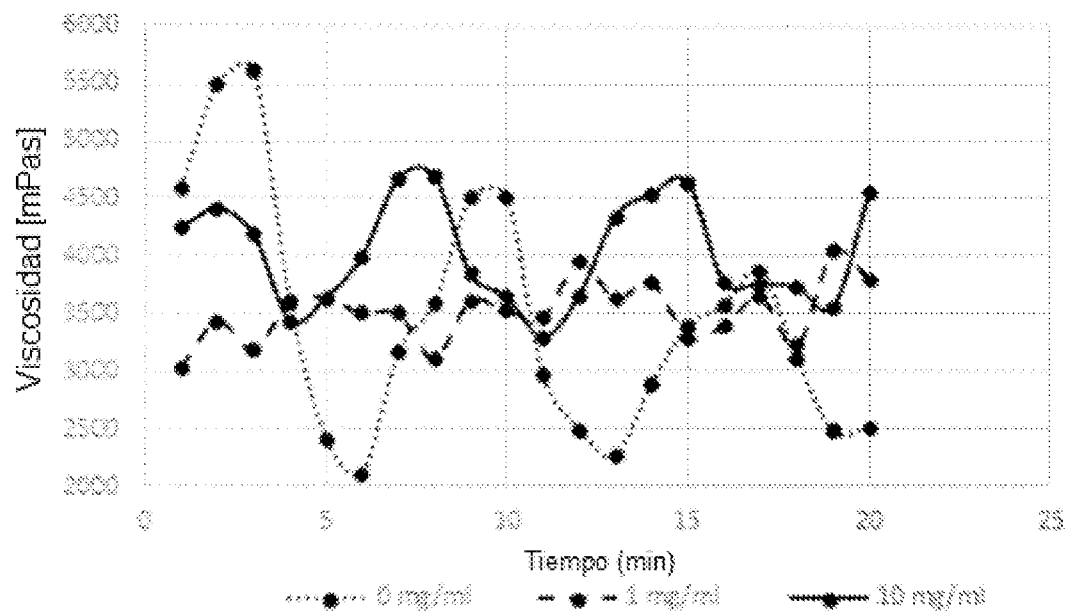


Fig 1

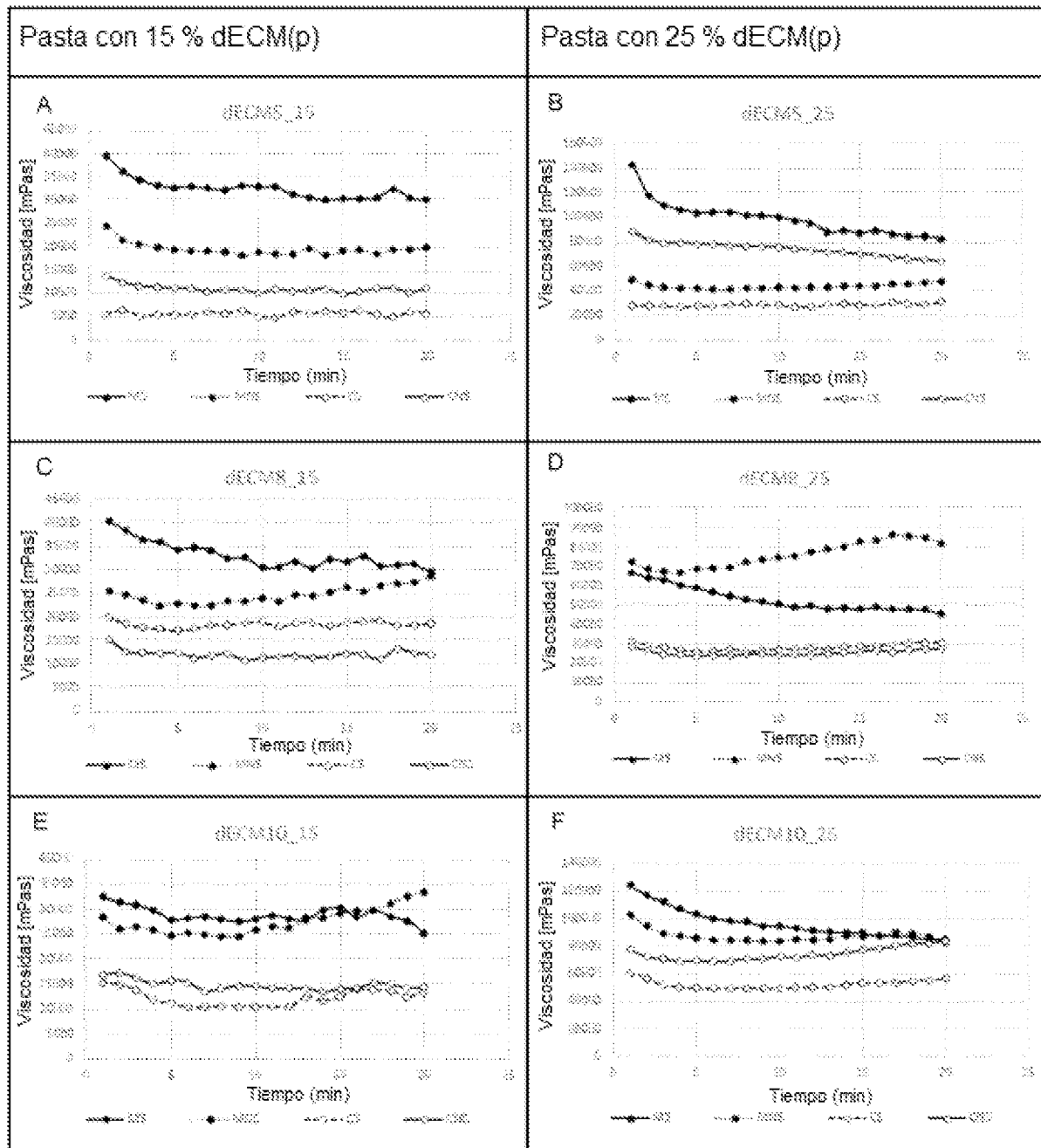


Fig 2

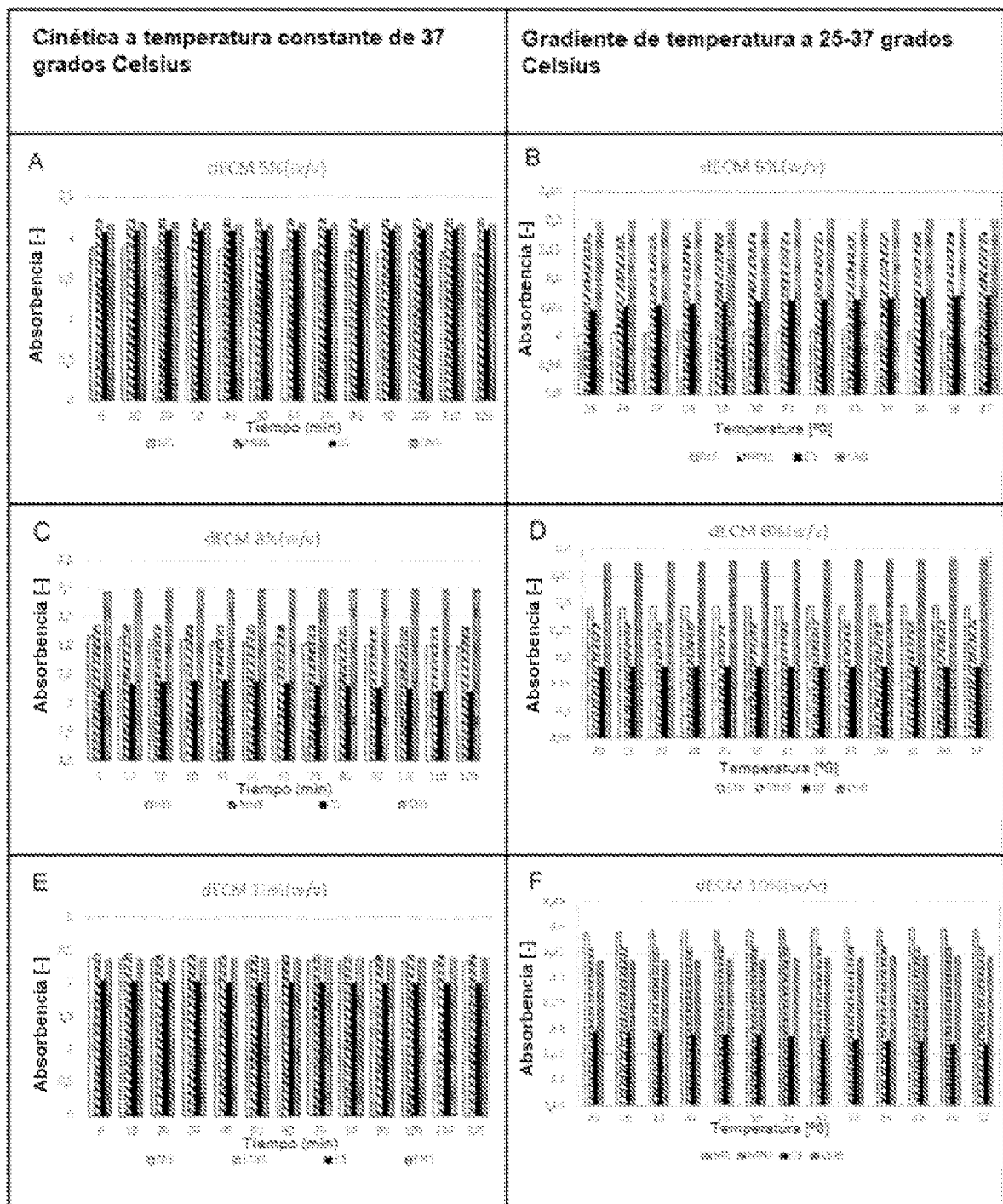


Fig. 3

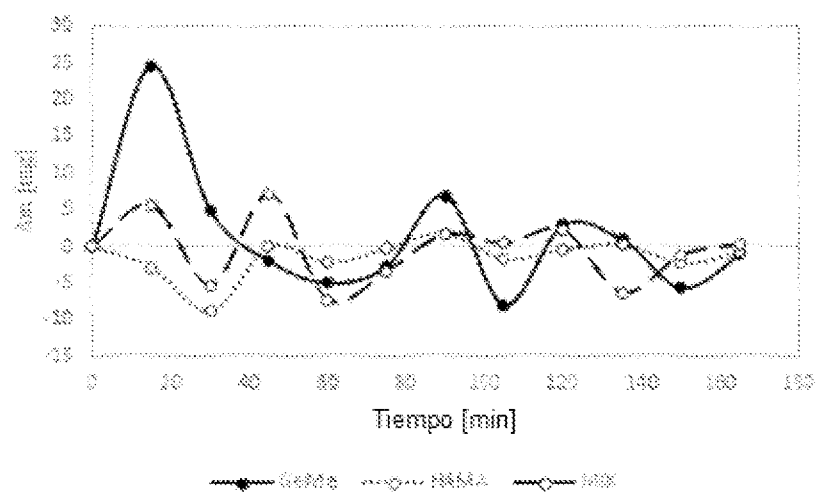


Fig. 4

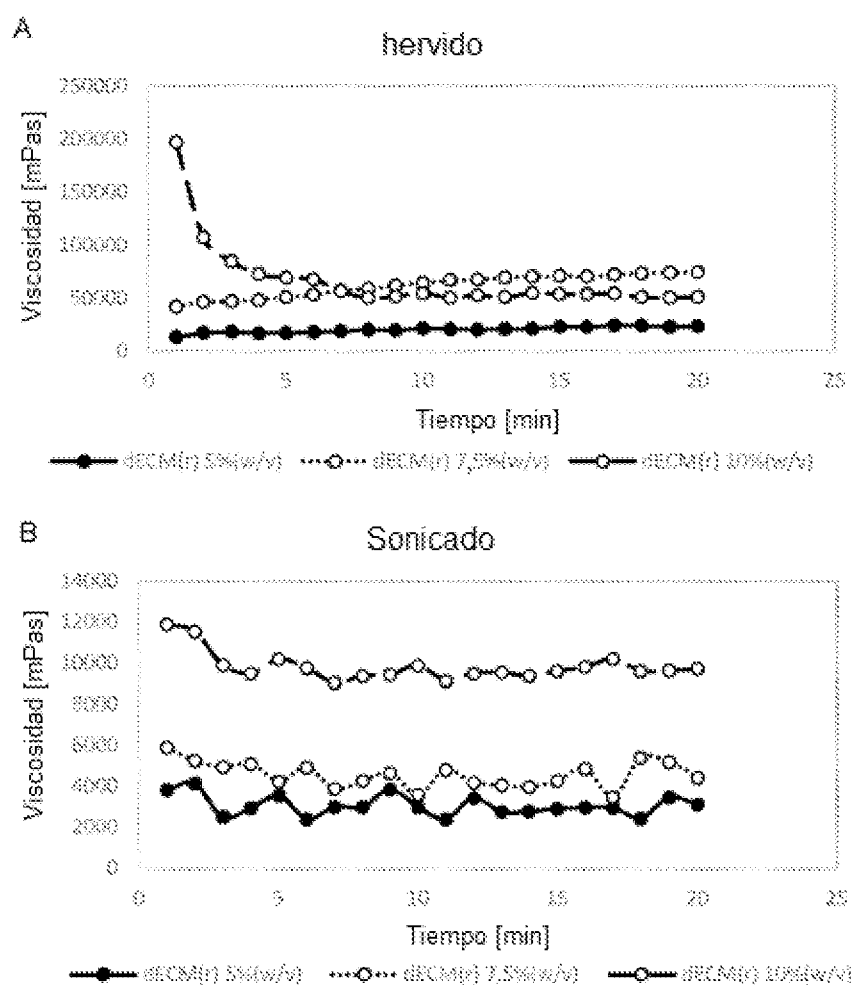


Fig. 5

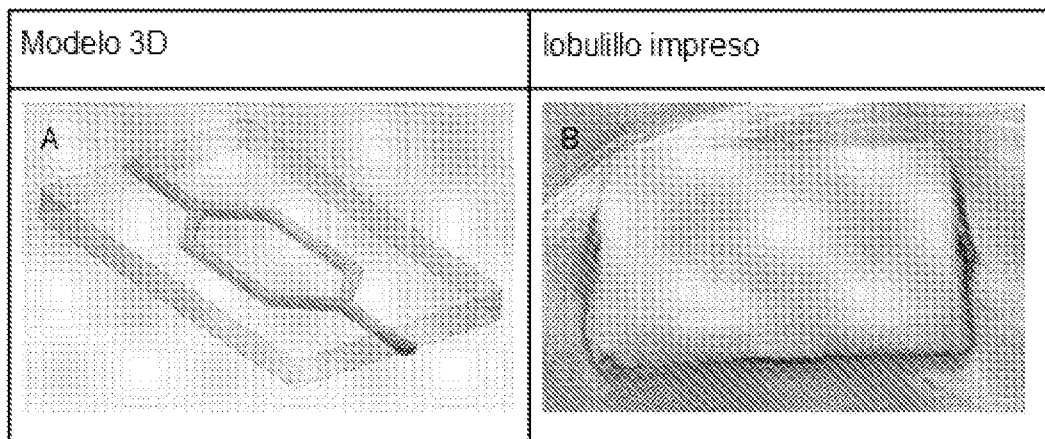


Fig. 6

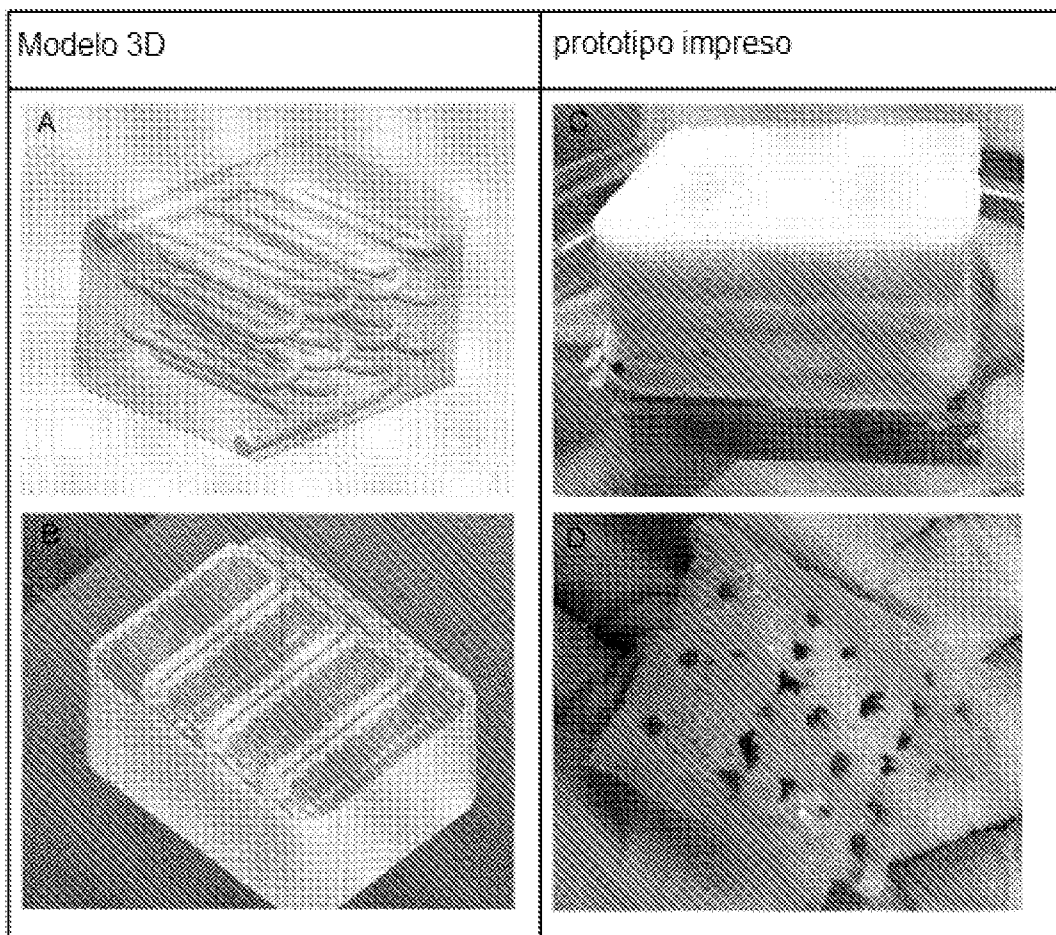


Fig. 7

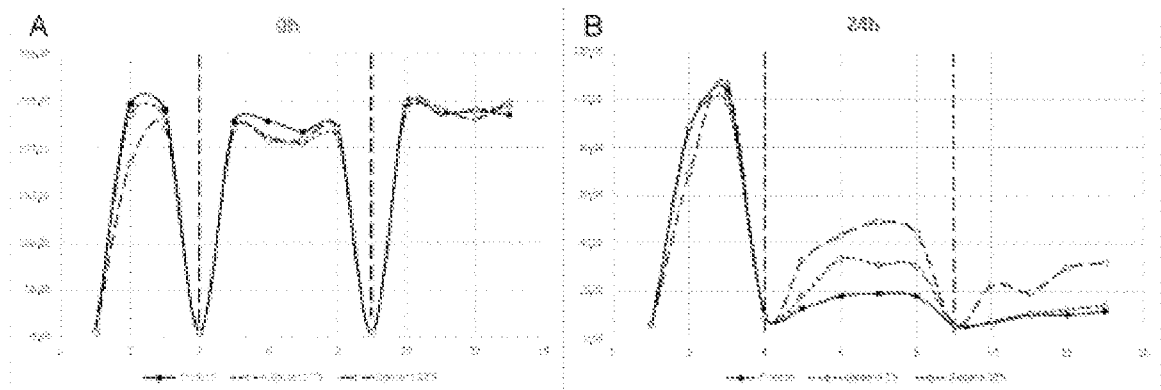


Fig. 8

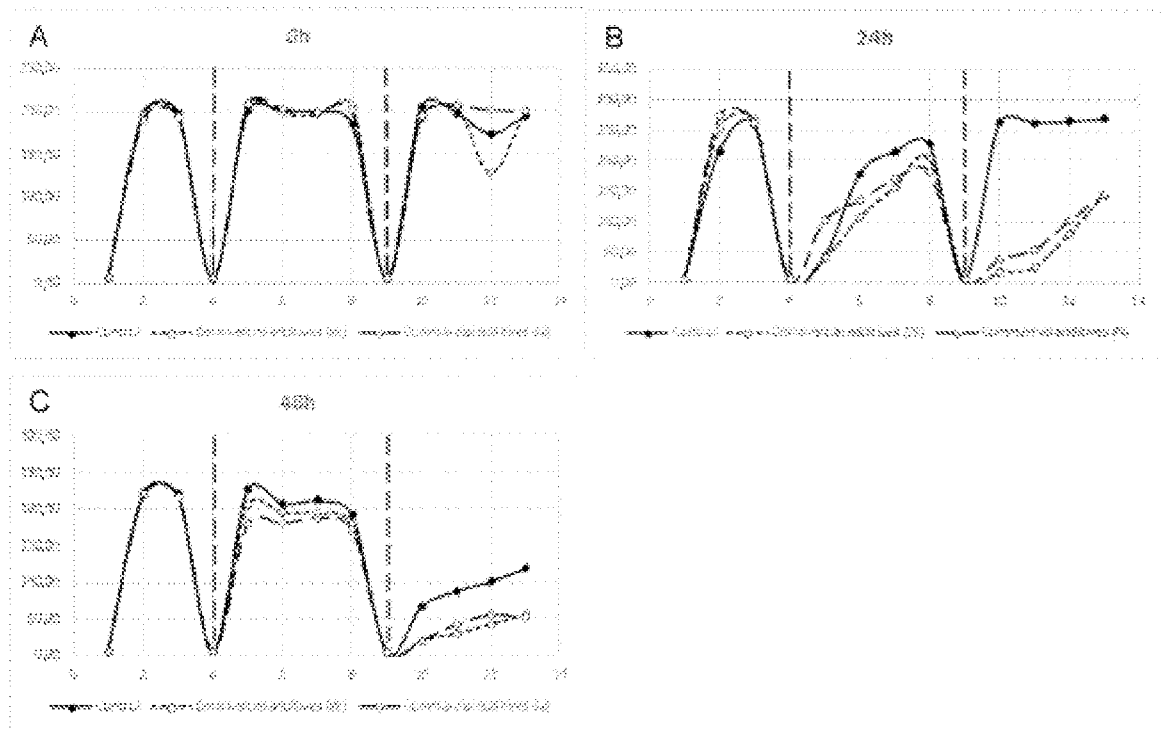


Fig. 9

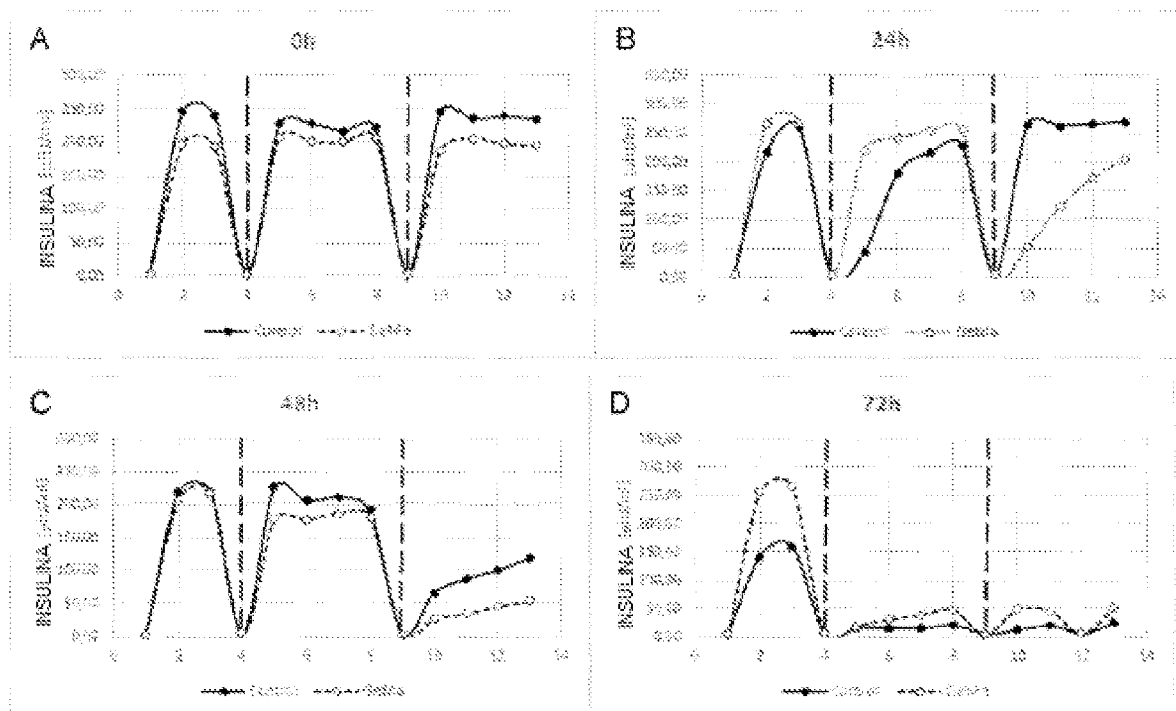


Fig. 10

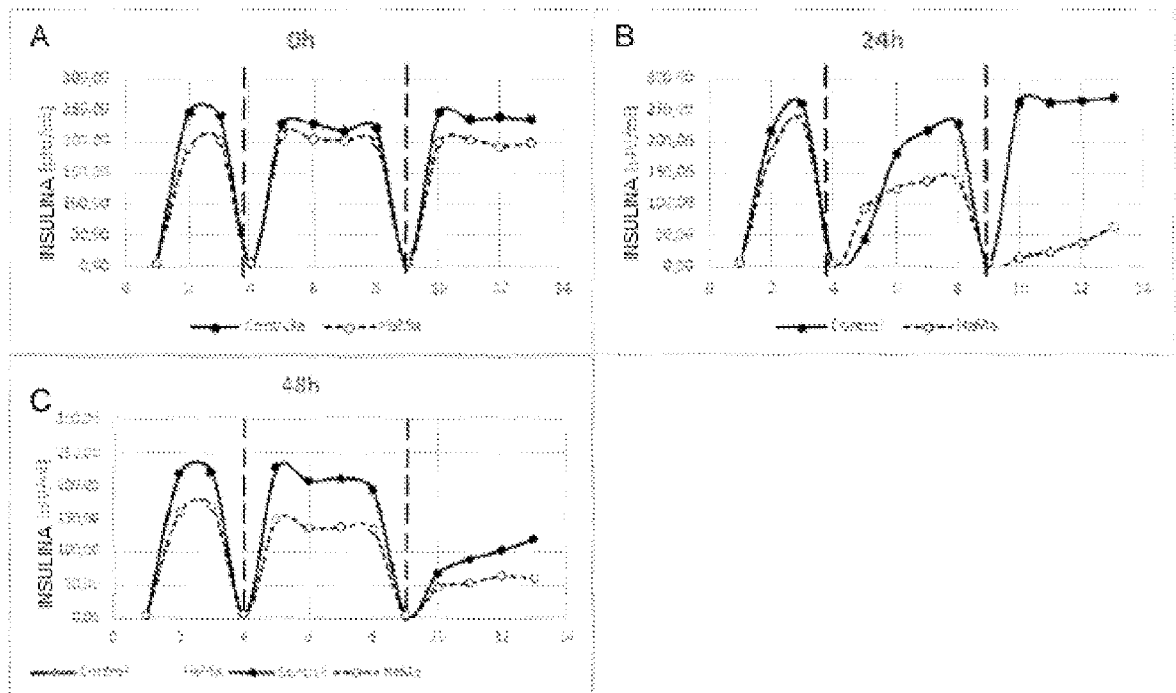


Fig. 11

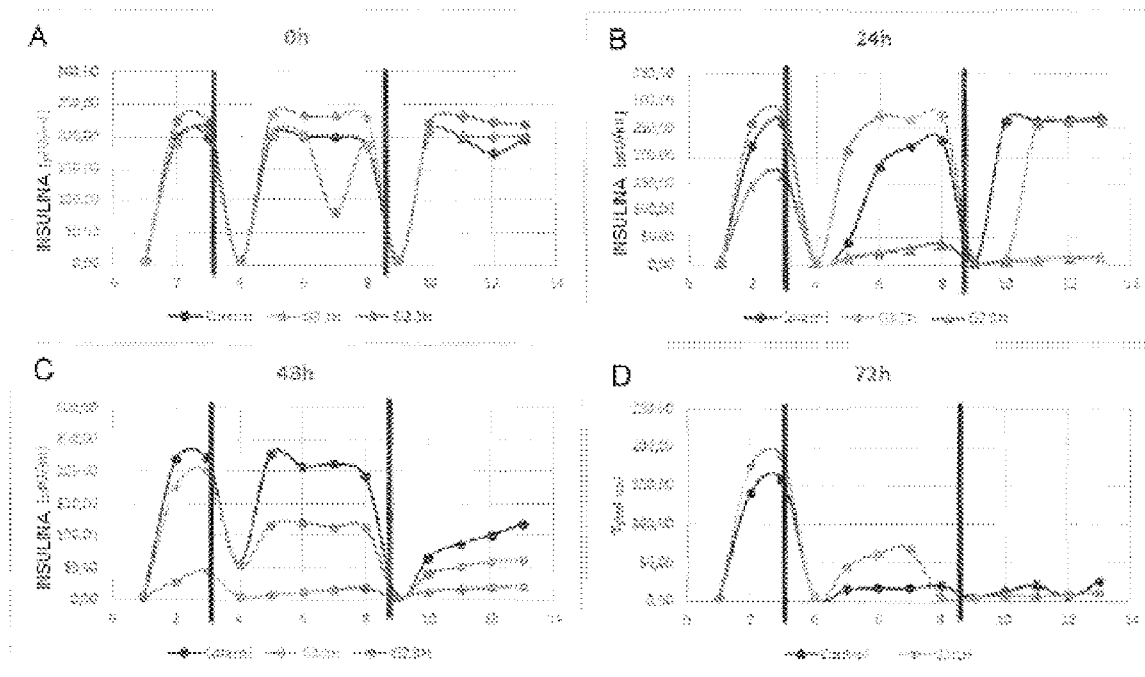


Fig. 12

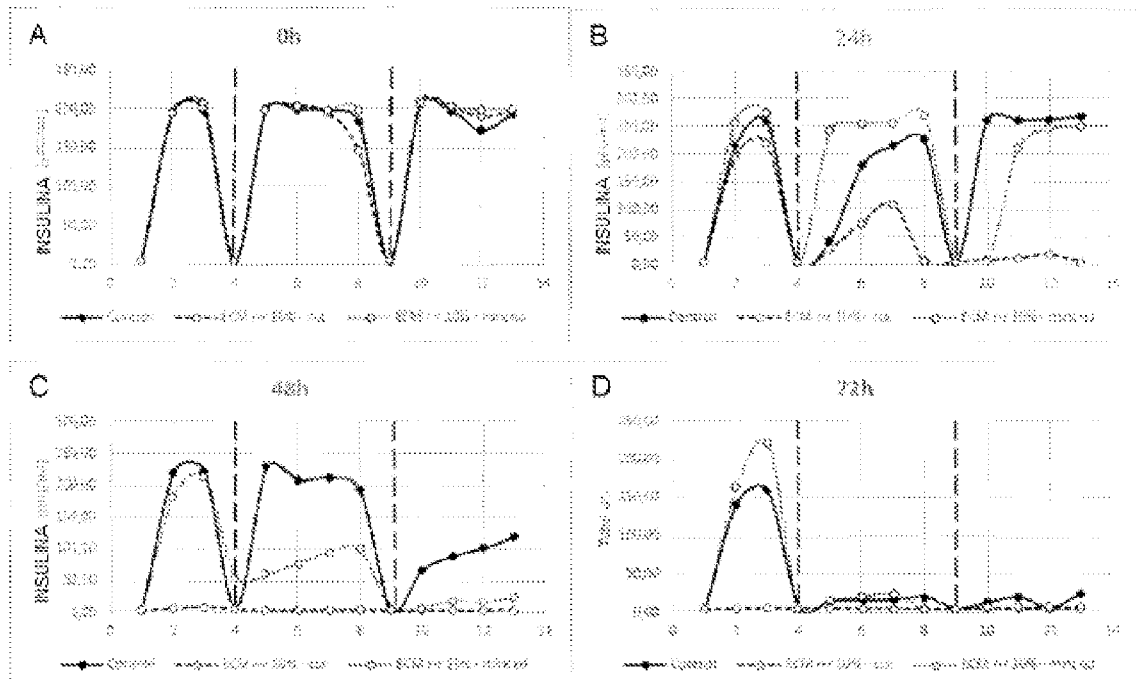


Fig. 13

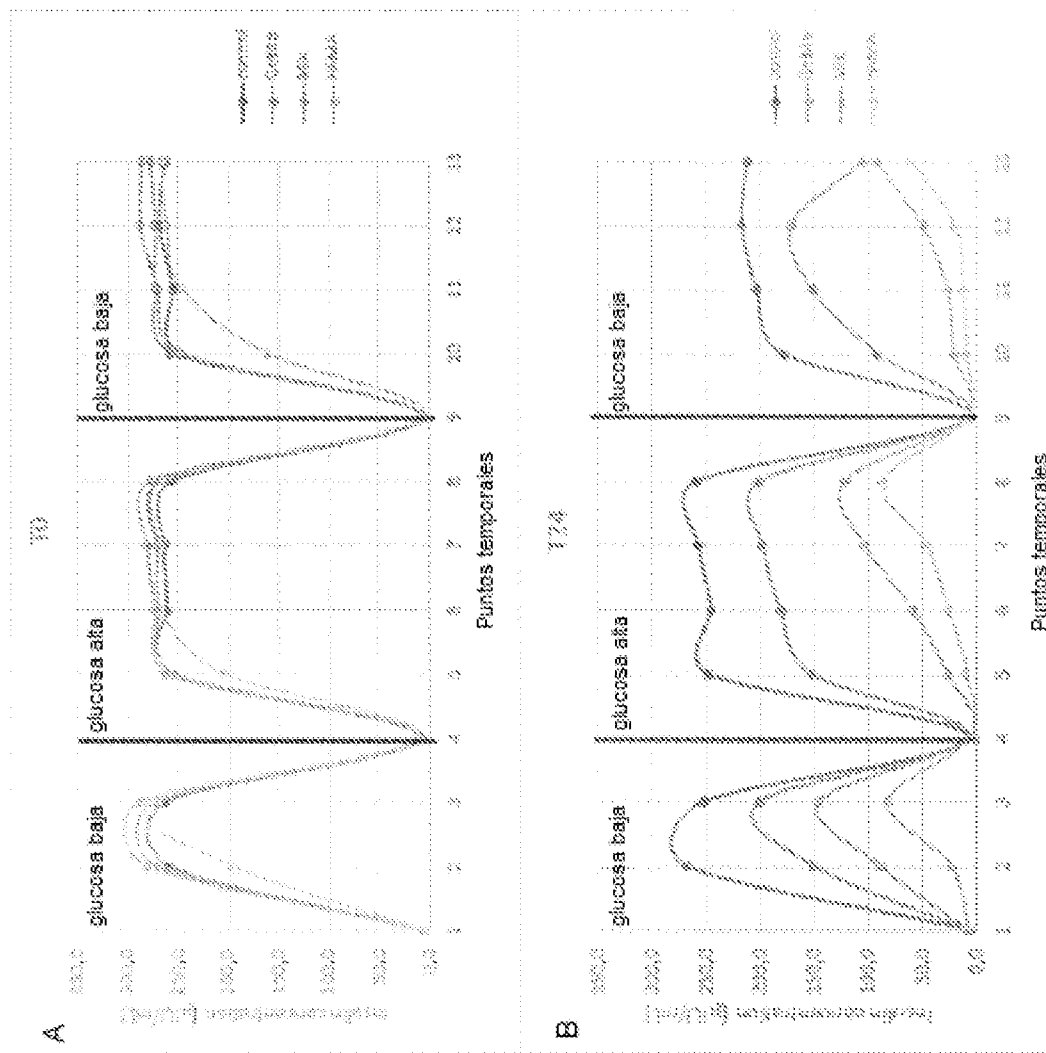


Fig. 14

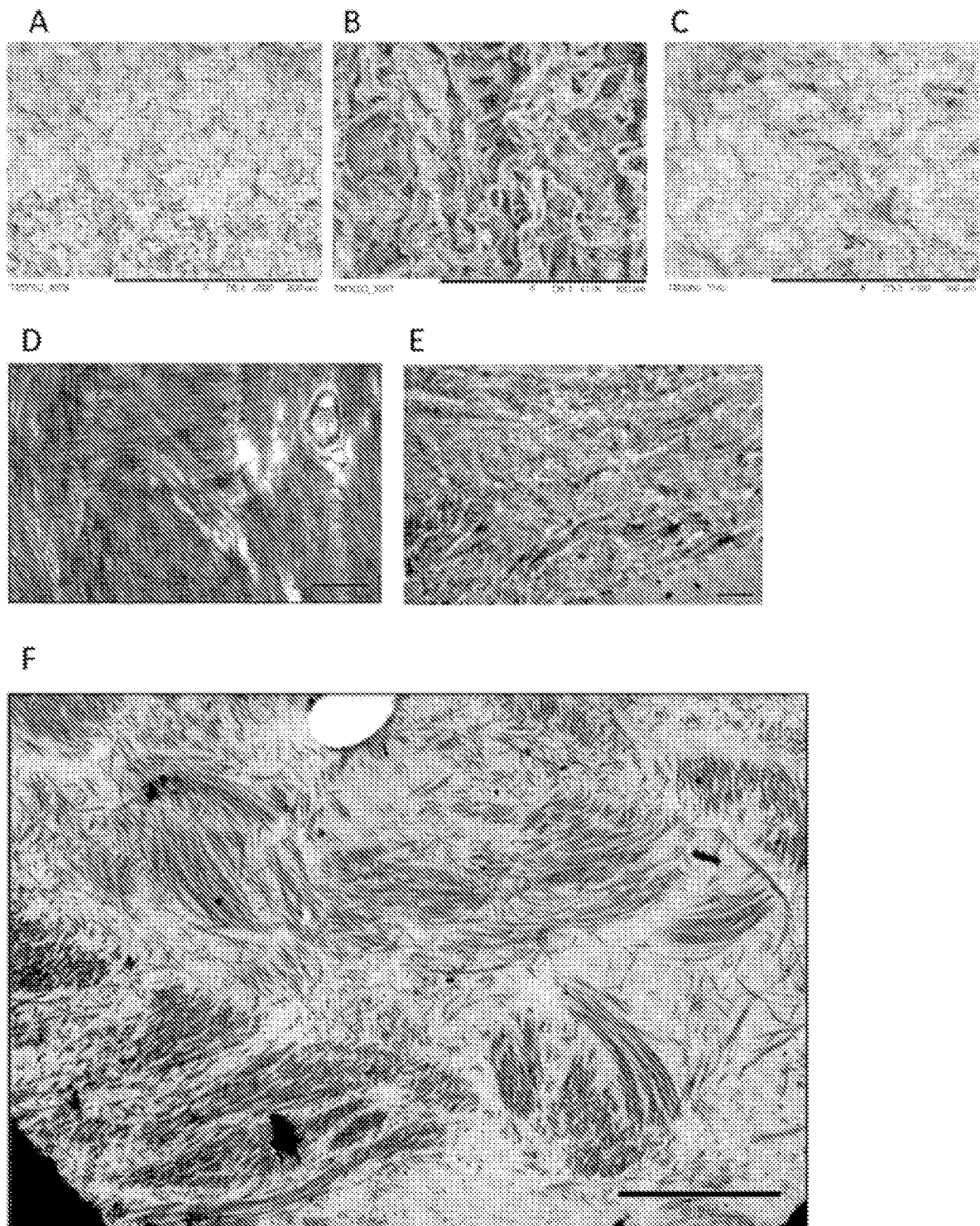


Fig. 15