



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

Bioimpresión de tejidos oculares

Presentado por María Ruiz Cuesta

Tutelado por: Dra. Yolanda Diebold Luque
Dra. Laura García-Posadas

Tipo de TFG: Revisión Investigación

En Valladolid a, 29 mayo 2021

RESUMEN

El globo ocular está formado por distintas estructuras que participan en el proceso de la visión. Dichas estructuras pueden sufrir patologías que dañan sus tejidos. La medicina regenerativa busca reemplazar o curar esos tejidos, por lo que la bioimpresión supondría un gran avance en el ámbito médico y oftálmico debido a la posibilidad de crear nuevos tejidos y órganos de forma tridimensional.

En los últimos 20 años ha aumentado el número de investigaciones dentro de este campo, creando biotintas y biomateriales compatibles con las líneas celulares de los tejidos que se quieren replicar, y empleando distintas técnicas de bioimpresión dependiendo del tejido diana buscado, para que sea lo más semejante a tejidos y células humanas sanos.

En la actualidad, los tejidos oculares en los que más se ha trabajado son: retina, córnea y conjuntiva. Estos tejidos son los más afectados por distintas patologías, y por ello son los diana más investigados para lograr preservar la visión de los pacientes. Analizando los resultados en viabilidad celular, tamaño celular, densidad, actividad biológica, etc., se observa que la bioimpresión ocular tiene un futuro próximo esperanzador.

ABSTRACT

The eyeball is made up of different structures that participate in the vision process. These structures can suffer pathologies that damage their tissues. Regenerative medicine seeks to replace or heal these tissues, so bioprinting would represent a great advance in the medical and ophthalmic field due to the possibility of creating new tissues and organs in a three-dimensional way.

In the last 20 years the number of investigations within this field has increased, creating bioinks and biomaterials compatible with the cell lines of the tissues to be replicated, and using different bioprinting techniques depending on the target tissue sought, so that it is the most similar to healthy human tissues and cells.

At present, the ocular tissues in which the most work has been done are retina, cornea, and conjunctiva. These tissues are the most affected by different pathologies, and for this reason they are the most investigated targets to preserve the vision of patients. Analyzing the results in cell viability, cell size, density, biological activity, etc., it is observed that ocular bioprinting has a promising near future.

ÍNDICE

1.	Introducción	3
1.1.	Estructuras oculares	3
1.2.	Concepto de bioimpresión.....	5
2.	Justificación	6
3.	Objetivos.....	6
4.	Metodología	7
5.	Resultados.....	7
5.1.	Desarrollo histórico de la bioimpresión	7
5.2.	Biotintas y bioimpresoras	8
5.3.	Técnicas de bioimpresión de tejidos oculares.....	12
5.4.	Tejidos oculares bioimprimibles	14
6.	Discusión	17
7.	Conclusiones	18
8.	Bibliografía.....	19
	ANEXO I	20
	ANEXO II	21

Agradecimientos:

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras, la Dra. Yolanda Diebold Luque y la Dra. Laura García-Posadas, su ayuda y dedicación durante la realización de este trabajo.

También quiero agradecer a mis padres el apoyo incondicional durante esta etapa académica.

Este TFG va dedicado a los investigadores y el personal sanitario que han dedicado su vida a la ciencia.

1. Introducción

Este trabajo va a abordar lo publicado hasta el momento en relación con la bioimpresión de tejidos oculares. Para ello se va a empezar recordando las estructuras que conforman el globo ocular y posteriormente haciendo una breve introducción de la bioimpresión.

1.1. Estructuras oculares

El globo ocular es un órgano formado por diversas estructuras (**figura 1**) que se van a describir a continuación, de capa más externa a más interna:^{1,2}

- **Córnea:** estructura transparente avascular que tiene 5 capas definidas:
 - El epitelio corneal de 5-6 capas, que es periféricamente contiguo con el epitelio de la conjuntiva bulbar en el limbo.
 - La capa de Bowman, que es una capa acelular formada por fibras de colágeno.
 - El estroma, que constituye aproximadamente el 90% del espesor corneal. Tiene capas entrelazadas de fibrillas de colágeno y son paralelas a la superficie de la córnea. Las laminillas se encuentran en la sustancia fundamental de proteoglicanos hidratados asociados con queratocitos que producen el colágeno y la sustancia fundamental.
 - La membrana de Descemet, que constituye la lámina basal del endotelio corneal en forma de laminado.
 - El endotelio corneal, tiene una sola capa de células endoteliales que aumentan en tamaño cuando se van perdiendo con la edad ya que no se regeneran.

La córnea es uno de principales dioptrios del ojo, siendo imprescindible para la refracción.

- **Limbo esclerocorneal:** es la zona que separa la córnea de la conjuntiva y la esclera. Se observan transiciones características en la disposición de los tejidos que lo conforman:
 - El epitelio corneal estratificado escamoso no queratinizado con superficies internas y externas paralelas da lugar al epitelio conjuntival, caracterizado por una superficie basal plegada y tejido conectivo subepitelial interdigitado.
 - Las laminillas de colágeno corneales ordenadas de forma regular dan paso a una disposición más aleatoria de laminillas en la esclera.
 - La membrana de Descemet y la capa de Bowman terminan en esta región.

Esta estructura cumple la función de separar físicamente ambos tejidos y constituye la localización de las células madre de la córnea en los nichos limbares.

- **Conjuntiva:** mucosa ocular que se extiende desde el limbo y reviste el interior de los párpados. Está formada por un epitelio escamoso estratificado no queratinizado fundamentalmente secretor, que incluye células calciformes, una rica red de células dendríticas del MHC de clase II + CD11c y un estroma laxo y vascularizado que contiene tejido linfoide propio. Según su localización y las especializaciones regionales de su epitelio se estructura en tres regiones:²
 - **Palpebral:** mayoritariamente compuesto por células epiteliales cuboidales y columnares.

Ruiz. M
Bioimpresión de tejidos oculares

- **Bulbar:** zona de mayor abundancia de células caliciformes, células de Langerhans, melanocitos y linfocitos.
- **Fondo de saco (fórnix):** la capa superficial del epitelio es aquí cilíndrica, la medial poliédrica y la profunda cuboidal.

Su función fundamental consiste en proteger los tejidos de la superficie ocular, además de contribuir con sus secreciones al mantenimiento de la película lagrimal y facilitar el movimiento independiente del globo ocular.

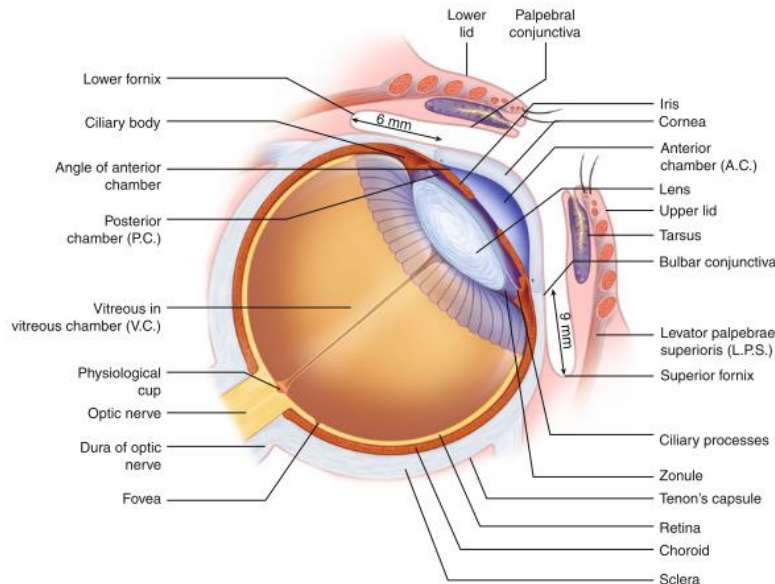


Figura1. Esquema de las estructuras oculares (referencia 3).

- **Esclera:** constituye gran parte de la capa principal fibrosa externa que recubre el ojo. Consta de tejido conectivo denso irregular en su matriz extracelular y fibroblastos secretores de matriz. Su matriz está formada principalmente por colágeno tipo I, aunque también los tipos III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII han sido encontrados en ella. Las laminillas de colágeno están dispuestas de forma irregular e intercaladas con fibras de elastina. El dermatán sulfato y condroitín sulfato son los proteoglicanos más abundantes que se encuentran en la esclera. Su función es mantener la forma del globo ocular, proteger el contenido intraocular y nutrirlo, actuando como conducto para que vasos y nervios accedan al interior del globo.
- **Iris:** diafragma circular colocado en un plano coronal delante del cristalino. El iris está bordeado por epitelios de dos capas que son una continuación del epitelio que recubre el cuerpo ciliar. Está formado por cuatro capas, la membrana limitante anterior, el estroma (contiene melanocitos, fibroblastos, mastocitos y macrófagos, además del esfínter pupilar), el músculo dilatador del iris y el epitelio pigmentado posterior. El margen pupilar del iris contiene un músculo circular involuntario no estriado, llamado esfínter de la pupila, que es el encargado de contraerla. Dispuesto de forma radial, se encuentra otro músculo involuntario, el músculo dilatador de la pupila. Gracias a estos músculos el iris controla la entrada de luz por la pupila además de comunicar la cámara anterior con la cámara posterior.

- **Cuerpo ciliar:** tiene aproximadamente 70 procesos ciliares similares a dedos que han fenestrado capilares desde la raíz del iris. En la zónula, los procesos ciliares están orientados en círculo y unidos a fibras zonulares alrededor del cristalino. El cuerpo ciliar tiene un músculo no estriado involuntario llamado músculo ciliar con una combinación de fibras circulares, radiales y longitudinales. Las fibras longitudinales del músculo ciliar se insertan en la malla trabecular. El cuerpo ciliar se encarga de la acomodación, mediante el músculo ciliar, la zónula del cristalino y la cápsula del cristalino, de la producción del humor acuoso (mediante los procesos ciliares) y su secreción (por el epitelio ciliar no pigmentado) y de la producción de la zónula del cristalino y de componentes del vítreo como el colágeno y el ácido hialurónico (por el epitelio ciliar no pigmentado).
- **Cristalino:** su núcleo y corteza se componen de largas laminillas concéntricas. Cada fibra laminar contiene un núcleo aplanado. La matriz intrafibrilar consta de glucoproteínas de la membrana basal (colágeno tipo IV) y glucosaminoglicanos sulfatados. El epitelio del cristalino se compone por un epitelio cuboidal simple. Su función es ayudar en el enfoque de objetos cercanos, transmitir la luz y filtrar determinadas longitudes de onda.^{1,3}
- **Coroides:** situada entre la retina y la esclera, está compuesta por cuatro capas de vasos sanguíneos (grandes, medianos y pequeños), melanocitos, fibroblastos, células del sistema inmunitario residentes (macrófagos, linfocitos, mastocitos, células plasmáticas y células dendríticas), colágeno y fibras elásticas. Su capa más interna, la coriocapilar, proporciona nutrientes y oxígeno a la retina y al nervio óptico. También posee función inmune, termorregulación, modulación de la PIO (presión intraocular) y drenaje del humor acuoso de la cámara anterior.
- **Retina:** es la región más interna del globo. Está formada por 10 capas que, de la zona más externa a la más interna son: el epitelio pigmentario, los fotorreceptores (conos y bastones), la membrana limitante externa, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares, la capa de fibras nerviosas de la retina y la membrana limitante interna. Se encarga del proceso de visión y participa en las barreras oculares.

1.2. Concepto de bioimpresión

La bioimpresión 3D es una técnica aparecida recientemente empleada en la fabricación de órganos y tejidos. Supone la formación de nuevos tejidos funcionales con fines médicos. En este proceso se utilizan las células del propio paciente y biomateriales para reemplazar tejidos y órganos enfermos por unos sanos, y así evitar que sufran rechazo del injerto en el posoperatorio, que la intervención no se pueda realizar por escasez de donantes compatibles con el paciente y que el tejido obtenido tenga la proporción adecuada respecto a su tamaño.⁴ La bioimpresión sería también muy útil para el aprendizaje y para la planificación de cirugías en humanos, ya que permitiría una apreciación completa de las relaciones anatómicas entre las lesiones y las estructuras circundantes.⁵

El origen de esta técnica se encuentra en la impresión de polímeros, que en 1986 comenzó con la invención de la estereolitografía por Charles Hull. Sin embargo, la primera bioimpresión se realizó en el año 2000 cuando Thomas

Boland adaptó una impresora de inyección de tinta para bioimprimir células en una placa de Petri.⁴ En la **figura 2** se observan los principales componentes de la bioimpresión: las biotintas, las técnicas y las bioimpresoras.

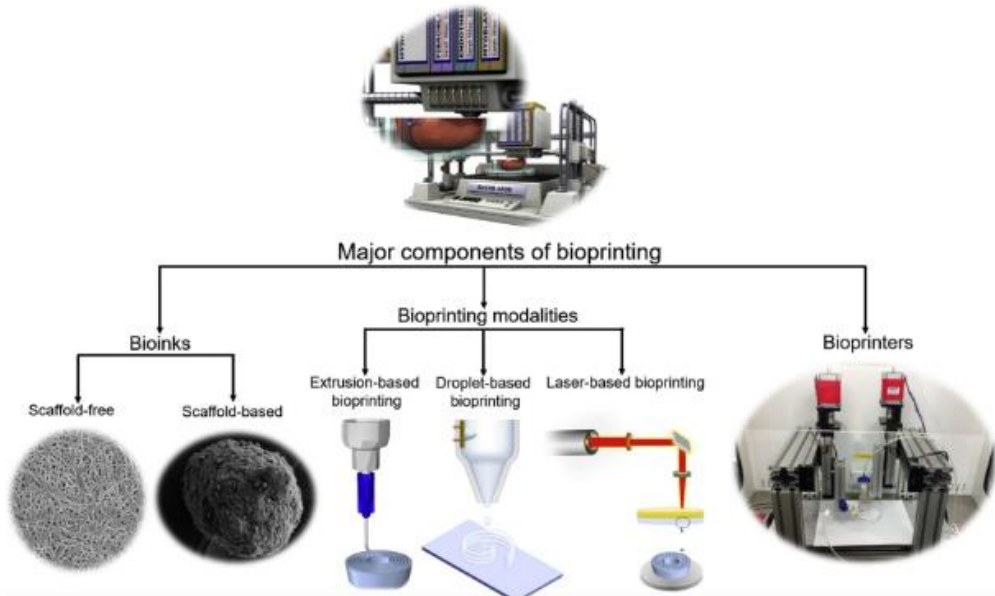


Figura 2. Componentes principales de la bioimpresión (referencia 4)

2. Justificación

La investigación en el campo de la bioimpresión de tejidos oculares está en auge debido a los avances científicos que supone y la versatilidad de poder bioimprimir diferentes tejidos. Actualmente no hay suficientes tejidos para trasplantar y regenerar los tejidos de pacientes con determinadas patologías oculares, por ello la bioimpresión 3D sería de gran ayuda para obtener tejidos sanos y compatibles.

Desde 1988 hasta la actualidad, se han producido importantes avances en la ingeniería de tejidos que están permitiendo crear tejidos y órganos de una forma más especializada.

Debido al impacto que está teniendo y que se prevé tendrá en el ámbito clínico la técnica de bioimpresión de tejidos, es importante conocer los avances realizados hasta el momento en el ámbito ocular y su grado de desarrollo.

3. Objetivos

El objetivo general de este TFG es recopilar la información publicada en los últimos 33 años (desde 1988 hasta 2021) sobre la bioimpresión de tejidos oculares. Los objetivos específicos son:

1. Reunir la información más actual sobre las técnicas de bioimpresión y los materiales que se emplean en distintos tipos de tejidos, incluidos oculares.
2. Reunir la información más actual sobre las distintas biotintas y su importancia para la bioimpresión de tejidos, incluidos los oculares.
3. Presentar los tejidos oculares bioimprimibles y los retos que supone hacerlo.

4. Metodología

Este TFG se ha realizado tras una investigación bibliográfica de las técnicas, materiales empleados y tejidos bioimprimibles realizados en los últimos 33 años (1988-2021). Se han consultado las siguientes bases de datos: Google académico, Almena y PubMed.

Se han utilizado las siguientes palabras clave en castellano: bioimpresión, biotinta, tejidos oculares, ojo.

También se ha realizado una búsqueda en inglés utilizando las siguientes *key words*: *bioprinter, bio-printing, bioink, biopolymers, eye, ocular tissues*.

5. Resultados

Se han revisado un total de 58 artículos publicados entre los años 1988 y 2021, de los cuales han sido citados y utilizados 25 para elaborar este TFG por su relevancia y/o relación con la temática del trabajo.

5.1. Desarrollo histórico de la bioimpresión

Posteriormente a la invención de la estereolitografía por Charles Hull en 1986 comenzaron diversas ramas de la impresión 3D, incluyendo la impresión de metales y la bioimpresión. R. J. Klebe, en 1988, creó patrones bidimensionales (2D) utilizando la tecnología de citoescrición para el microposicionamiento bidimensional de proteínas.⁴ Este tipo de tecnología consiste en la deposición de proteínas de adhesión celular y anticuerpos monoclonales sobre un sustrato bajo control informático.⁶ A finales de la siguiente década, se comenzó a desarrollar técnicas de bioimpresión 2D con células vivas. Para ello se utilizaron técnicas de microposicionamiento, pudiendo así fabricar tejidos más complejos. En 2002, tras la modificación realizada por Thomas Boland en el año 2000 en una impresora de inyección de tinta para bioimprimir células en una placa Petri, Anthony Atala, perteneciente al equipo de investigación del Instituto Wake Forest de Medicina Regenerativa, mostró un riñón en miniatura, el primer órgano completamente bioimpreso.⁴

En 2008 se desarrolló el concepto de esferoides tisulares, facilitando la generación rápida de tejidos y órganos mediante la implantación de esferoides en andamiajes poliméricos. Se denomina andamiaje a las estructuras creadas con diversos materiales que están diseñados para provocar interacciones celulares deseables entre ellos. Ese mismo año, Objet Geometries Ltd. fomentó la impresión multilateral, lo que hizo que creciera aún más el desarrollo potencial en bioimpresión. En 2009, Organovo sacó al mercado la primera bioimpresora, llamada Novogen MMX, que permitió crear construcciones vasculares sin andamiaje. Desde entonces, se ha conseguido desarrollar distintas bioimpresoras pudiendo así bioimprimir una amplia gama de tejidos. Además de la posibilidad de combinar estas bioimpresoras con tecnologías de diseño asistido por ordenador (software CAD/CAM) para poder desarrollar tejidos u órganos compatibles y volumétricamente apropiados para el paciente.⁴

Para comprender la bioimpresión, se tiene que conocer la evolución de la medicina regenerativa desde el concepto de creación *ex vivo* de tejido modificado hasta la inducción *in vivo* de la reconstrucción de tejido funcional.⁷ La

medicina regenerativa tiene el potencial de reemplazar o curar tejidos y órganos dañados por la edad, enfermedad o trauma. La bioimpresión 3D es una de las terapias de medicina regenerativa que ha llegado al mercado⁸ y ha dado como resultado la impresión exitosa de sangre, vasos, redes vasculares, huesos, orejas, exoesqueletos, tráqueas y prótesis dentales (incluyendo un hueso de mandíbula), etc. También hay ejemplos concretos de bioimpresión de tejidos oculares, que se presentarán más adelante. Aunque actualmente esté limitado el uso de esta técnica en oftalmología, tiene potencial para en un futuro poder general todo tipo de tejidos oculares.⁵

5.2. Biotintas y bioimpresoras

Las biotintas son un conjunto de células vivas adecuadas para ser procesadas por una tecnología de biofabricación automatizada. Constituyen el componente obligatorio de la biotinta, que también puede contener componentes estructurales o biomateriales, agentes reticulantes y elementos funcionales.⁹ Las características principales de los materiales para ser seleccionados como biotintas son:

- Biocompatibilidad: ausencia de reacciones alérgicas, inmunitarias, etc., en el contacto entre los tejidos del organismo y ciertos materiales.
- Imprimibilidad: se describe como la capacidad de impresión de una biotinta. *Gillispie et al.*¹⁰ y *Gao et al.*¹¹ participaron en estudios en los que desarrollaron un nuevo marco para evaluar la imprimibilidad de los tejidos.
- Cinética de degradación: tiempo de vida media de las biotintas.
- Propiedades estructurales y mecánicas: dureza, resistencia, estabilidad, plasticidad, resiliencia, etc.
- Biomimetismo: imitar o reproducir las características biológicas del tejido bioimpreso.

Los biomateriales más empleados en las tintas biológicas en las aplicaciones de regeneración de tejidos oculares son polímeros de origen natural como, por ejemplo, el colágeno, la gelatina, el alginato o el ácido hialurónico. Pero también hay ejemplos de materiales de origen sintético. El tejido diana determina el tipo de células que deben emplearse en la biotinta.¹² Hay publicados distintos tipos de biotintas dependiendo de los biomateriales que empleen. La **Tabla 1** recoge las principales biotintas usadas para bioimprimir tejidos oculares.

Las bioimpresoras utilizan las biotintas citadas en la **Tabla 1**, dependiendo del tejido que se busque reproducir se deberán emplear distintas biotintas combinándolas con el método o técnica de bioimpresión más apropiado.

Tabla 1. Tipos de biotintas dependiendo de los biomateriales que emplean y los tejidos oculares que forman.

	Biotintas	Tejido
Biotintas basadas en biomateriales naturales	Alginato	<ul style="list-style-type: none"> - Queratocitos corneales humanos - Células epiteliales corneales humanas - Retina humana, línea de células epiteliales pigmentadas (ARPE-19) - Línea celular de retinoblastoma humano (Y79) - Células ganglionares de la retina (rgcS)
	Gelatina	<ul style="list-style-type: none"> - Queratocitos corneales humanos - Células epiteliales corneales humanas - Células endoteliales corneales humanas modificadas genéticamente para expresar ribonucleasa (R5)
	Colágeno	<ul style="list-style-type: none"> - Queratocitos corneales humanos - Células epiteliales corneales humanas - Células madre embrionarias humanas (hESC) - Células derivadas de tejido adiposo humano (hASC)
	Fibrinógeno/Fibrina	<ul style="list-style-type: none"> - ASCs y células formadoras de colonias endoteliales
	Ácido hialurónico	<ul style="list-style-type: none"> - Células madre embrionarias humanas (hESC) - Células derivadas de tejido adiposo humano (hASC) - Células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) - Células progenitoras de la retina fetal humana (fRPCs)
	Agarosa	<ul style="list-style-type: none"> - Queratocitos corneales humanos
	Hidroxiapatita	<ul style="list-style-type: none"> - Células endoteliales humanas EA.hy926
	Biotintas basadas en matriz descelularizada	<ul style="list-style-type: none"> - Queratocitos corneales humanos diferenciados de cornetes humanos derivados de células madre mesenquimales
Biotintas basadas en biomateriales sintéticos	Matrigel	<ul style="list-style-type: none"> - Células ganglionares retinianas (rgcS)
	PEG	<ul style="list-style-type: none"> - Células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) - Células progenitoras de la retina fetal humana (fRPCs)
Biotintas compuestas con moléculas	Plurónico	<ul style="list-style-type: none"> - Línea de células epiteliales pigmentadas de la retina humana (ARPE-19) - Línea celular de retinoblastoma humano (Y79)
	Plasma sanguíneo	<ul style="list-style-type: none"> - Células madre embrionarias humanas (hESC) - Células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASC)
	Arg-Gly-Asp-Ser Péptidos	<ul style="list-style-type: none"> - Células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) - Células progenitoras de la retina fetal humana (fRPCs)

Distintos grupos de investigación de todo el mundo han creado una amplia variedad de bioimpresoras además del desarrollo de bioimpresoras comerciales por distintas empresas. Estas son algunas de las características que debe tener la bioimpresora ideal:

- Alto grado de libertad de movimiento, lo que permite la deposición de la biotinta en superficies no planas.
- Alta resolución y precisión que permiten la deposición de la biotinta con una similitud suficiente para simular la colocación en tejidos nativos de las células.
- Alta velocidad que permite una rápida construcción tanto de órganos y tejidos para el trasplante clínico, así como para producir modelos de tejido para la investigación.
- Capacidad de dispensar distintas biotintas simultáneamente para facilitar la fabricación de tejidos heterocelulares.
- Facilidad de esterilización para mantener unas condiciones asépticas durante los procesos de bioimpresión.
- Capacidad de automatización completa, facilitando la bioimpresión de tejidos y órganos sin intervención de los operadores.
- Versatilidad que permite a los operadores modificar y expandir el instrumental.

Dentro de los distintos tipos de bioimpresoras se encuentran ciertas agrupaciones. Estas son algunas de las bioimpresoras comercializadas:

- En la **Tabla 2**, se aprecian las distintas **impresoras basadas en extrusión** y los diferentes tipos que hay, además del nombre de la impresora, la empresa que la ha fabricado y la dirección web de la empresa:
 - Bioimpresoras basadas en extrusión convencionales.
 - Bioimpresoras basadas en extrusión con grados más altos de libertad de movimiento.
 - Bioimpresoras basadas en extrusión que apoyan el proceso de bioplotting.
 - Bioimpresoras basadas en extrusión que apoyan la bioimpresión de agregados celulares.
 - Bioimpresoras basadas en extrusión que apoyan otras modalidades de bioimpresión.
- En la **Tabla 3**, se aprecian las distintas **impresoras basadas en goteo**:
 - Autodrop Compact and AD-P-8000
 - MicroFab jetlab®
- Las **impresoras basadas en láser** no se han comercializado aún de forma privada, pero numerosas universidades colaboran en la mejora de la investigación.
 - Bioimpresoras con grabado directo guiado por láser (LGDW)
 - Bioimpresoras por transferencia directa inducida por láser modificado (LIFT).

Tabla 2. Bioimpresoras comercializadas basadas en la extrusión

		Nombre	Empresa	Dirección web
Bioimpresoras basadas en extrusión	convencionales	Alpha and Omega bioprinters	3DYNAMIC SYSTEMS	https://3dynamicsystem.com/
		Biobot	Biobots	https://www.advancedsolutions.com/
		Fab@Home	Seraph Robotics	https://seraphrobotics.wixsite.com/seraph1
		Inkredible	Cellink	https://www.cellink.com/bioprinting/
		Regenovo	Regenovo Biotechnology Co., Ltd.	http://regenovo.com/english/
		REGEMAT 3D	Regemat 3D	https://www.regemat3d.com/
	con grados más altos de libertad de movimiento	BioAssemblyBot	Advanced solutions	https://www.advancedsolutions.com/
	que apoyan el proceso de bioplotting	3D Bioplotter®	EnvisionTec	https://enviontec.com/
	que apoyan la bioimpresión de agregados celulares	NovoGen MX™	Organovo	https://organovo.com/
		nScript	Sciperio/nScript	https://www.sciperio.com/ https://www.nscript.com/
	que apoyan otras modalidades de bioimpresión	Bio3D SYN^ and Bio3D Explorer	Bio3D technologies	https://www.3dprintingbusiness.directory/company/bio3d-technologies/
		Biofactory and 3D Discovery®	RegenHU	https://www.regenhu.com/

Tabla 3. Bioimpresoras comercializadas basadas en el goteo.

	Nombre	Empresa	Dirección web
Bioimpresoras basadas en el goteo	Autodrop Compact and AD-P-8000	Microdrop Technologies	https://www.microdrop.de/
	MicroFab jetlab®	MicroFAB Technologies, Inc	http://www.microfab.com/

5.3. Técnicas de bioimpresión de tejidos oculares

Las técnicas principales empleadas en la bioimpresión de tejidos oculares actualmente son: la bioimpresión basada en la extrusión, la bioimpresión basada en goteo y la bioimpresión basada en láser. En la **figura 3** se ve un esquema de cada una de estas tres técnicas.

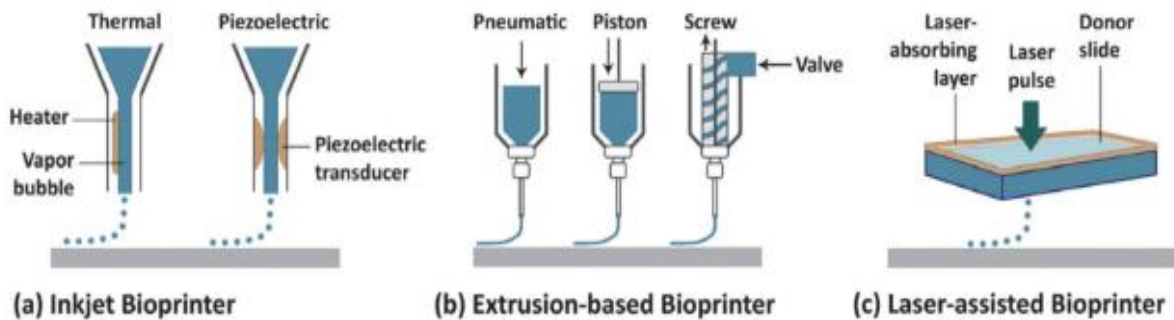


Figura 3. Esquema de las distintas técnicas de bioimpresión (referencia 13)

A. La **bioimpresión por extrusión** utiliza un sistema de accionamiento neumático, emplea la fuerza mecánica para depositar un flujo continuo de biotinta; esta biotinta, posee alta viscosidad y alta integridad mecánica y estructural. Los métodos más comunes de bioimpresión basada en extrusión son:

- Método de dispensación neumático
- Accionado por pistón
- Accionado por tornillo

En la **figura 4** se observa de forma esquemática como funciona cada método. En el primero, la presión del aire proporciona la fuerza impulsora, mientras que en los dos últimos, el desplazamiento mecánico y la rotación se utilizan para impulsar un flujo continuo de biomaterial a través de la boquilla.

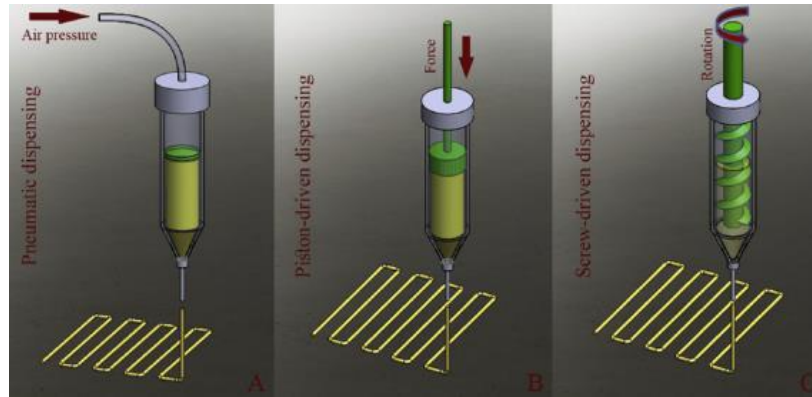


Figura 4. Diagrama esquemático de los métodos más comunes de bioimpresión basada en la extrusión (referencia 14).

Esta es la modalidad más utilizada en la investigación de bioimpresión debido a su practicidad y capacidad para fabricar construcciones 3D a mayor escala. La velocidad de impresión es lenta y su resolución moderada. La viabilidad celular que se consigue oscila entre el 45 y el 98%.

B. La **bioimpresión por inyección de tinta (figura 5)**, consiste en la deposición de gotas de biotinta. Actúa mediante un mecanismo de accionamiento térmico, piezoeléctrico o acústico para depositar gotas de suspensión celular. Su viscosidad es baja, al igual que su integridad mecánica y estructural; sin embargo, la velocidad de impresión es rápida y posee alta resolución. Las células tienen una viabilidad de un 70 – 90%.

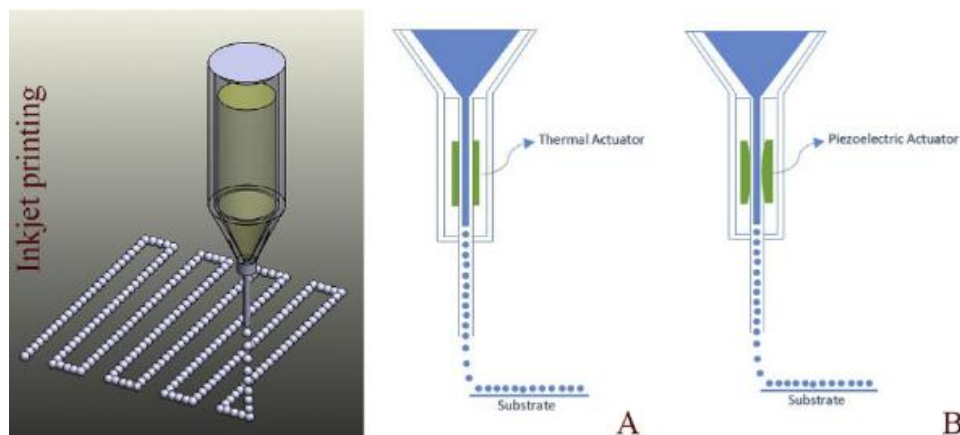


Figura 5. Diagrama esquemático de la bioimpresión por inyección de tinta (referencia 14).

C. La **bioimpresión asistida por láser (figura 6)**, basada en estimulación láser, posee un amplio rango en la viscosidad de la biotinta. La integridad mecánica y estructural es baja, pero su velocidad de impresión es media y la resolución alta, además la viabilidad de las células es mayor de 95%.^{12,15}

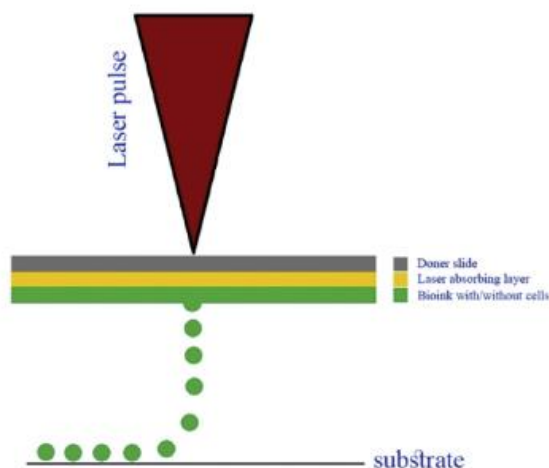


Figura 6. Diagrama esquemático de la bioimpresión asistida por láser (referencia 15).

5.4. Tejidos oculares bioimprimibles

Hasta el día de hoy, hay pocos ejemplos de bioimpresión de tejidos oculares. Esto se debe a la complejidad de los tejidos, ya que están compuestos por más de un tipo celular. Las estructuras con los principales tejidos diana han sido la retina, la córnea y la conjuntiva. La retina es el tejido en el que más se ha trabajado, posteriormente la córnea y, por último, la conjuntiva.

5.4.1. Retina

Algunas enfermedades de la retina están asociadas con un solo tipo de células, como, por ejemplo, el glaucoma, asociado con las células ganglionares retinianas, y la retinosis pigmentaria, asociada con los fotorreceptores. Sin embargo, hay otras patologías que están asociadas con áreas más grandes, como por ejemplo la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), en la que se daña la zona central de la retina. Hasta ahora, las técnicas tradicionales, como la aplicación en animales de fotorreceptores maduros, células madre, láminas retinianas y células del epitelio pigmentario de la retina¹⁶ no han conseguido unas buenas propiedades estructurales en los andamiajes 3D ni en la posición y orientación celular, por lo que se pensó que la bioimpresión 3D sería una buena alternativa¹⁶. En los cultivos celulares, la buena disposición de los andamiajes 3D daría apoyo mecánico y físico para que se produjera de forma correcta la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células retinianas. La especificidad es otro aspecto muy importante, ya que se podría diseñar el número de capas, el grosor y la disposición espacial para que las funciones de la retina ocurran de forma fisiológica.¹²

Las células ganglionares retinianas son necesarias para la transmisión de señales del ojo al cerebro; también son parte del sistema nervioso central, por lo que son incapaces de regenerarse, y a menudo mueren tras una lesión. *Lorber et al.* publicó un estudio tras imprimir células gliales junto a células ganglionares de la retina de ratas adultas mediante impresión de inyección de tinta piezoeléctrica en un intento por reproducir toda la retina.¹⁷ Los resultados mostraron una buena viabilidad, aunque la cantidad total de células bioimpresas se redujo en comparación con los controles tradicionales.

En el estudio de *Shi et al.* se intentó bioimprimir de forma 3D células del epitelio pigmentario de la retina y fotorreceptores imitando la interacción funcional para conseguir una visión adecuada. Emplearon una solución híbrida de alginato y plurónico para imprimir una capa ultrafina de células ARPE-19 (línea celular de epitelio pigmentario humano) a las que luego se les añadieron células fotorreceptoras Y79 para analizar sus interacciones.¹⁶ La morfología general de las células no se vio afectada y las células se mantuvieron bien en cultivo.

Kador et al. combinó la impresión 3D utilizando la impresión de células tridimensionales con la guía de los axones impresos utilizando andamios radiales electrohilados incrustados en matrices de hidrogel, imitando la organización de las células retinianas.¹⁸ Empleó este andamio de ácido poliláctico como término en la inyección de tinta con múltiples boquillas. El andamio radial electrohilado estaba diseñado para regular la orientación axial. Esta alineación, de células con axones alineadas un 72% con su andamio radial con un 49% de dendritas también alineadas, mejoró significativamente en comparación con el 11% que presentaba el cultivo 2D típico. Pudieron así lograr una densidad impresa de aproximadamente 30 células/mm² siendo la densidad celular total en la retina humana de 2.100 células/mm² aproximadamente.¹⁹

5.4.2. Córnea

Las células epiteliales de la córnea se renuevan constantemente a partir de la capa basal, por lo que cualquier defecto o daño en esta área podría generar un excesivo crecimiento de la conjuntiva, aparición de neovasos, fotofobia y dolor. La compleja estructura del estroma (fibrillas de laminina y colágeno tipo I super ordenadas) es la clave para comprender la resistencia mecánica y la transparencia corneal. En el caso de un traumatismo, a pesar de la poca actividad de los queratinocitos del estroma, estas células se pueden activar en forma de fibroblasto, provocando opacidad corneal y formación de cicatrices.¹² Por último, las células endoteliales (capa más profunda) son las encargadas de mantener el equilibrio hídrico corneal. Su capacidad de regeneración *in vivo* es muy baja, por lo que cualquier defecto podría degenerar en enfermedades graves o incluso ceguera irreversible.²⁰ En España, ha ido aumentando paulatinamente el número de pacientes que se someten a un trasplante corneal, en 2014 se alcanzó su máximo con un total de 3488 pacientes trasplantados.²¹ Tras una encuesta mundial publicada en 2016, el 53% de la población mundial carece de accesibilidad a esta cirugía. Además, los pacientes pueden sufrir rechazo al injerto alogénico incluso años después.²² Además, un trasplante de córnea no soluciona una patología limbar, como el Síndrome de Insuficiencia Límbica, si las células madre del limbo están dañadas o han desaparecido. Es por ello por lo que se han utilizado técnicas de ingeniería de tejidos basadas en la combinación de células del limbo y andamiajes. Por ejemplo, se han utilizado injertos de células madre autólogas del limbo en fibrina o en membrana amniótica para restaurar una superficie corneal dañada.²³ *Calonge M. et al.* realizaron un ensayo clínico que consistía en utilizar células madre mesenquimales derivadas de médula ósea para tratar el déficit de células madre del epitelio corneal. Este ensayo de prueba demostró que el trasplante alogénico de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea era tan seguro y eficaz como el trasplante alogénico de epitelio del limbo cultivado.²⁴

Las técnicas convencionales de cultivo celular no han conseguido satisfacer las distintas características de la córnea, como su transparencia, su curvatura, su resistencia y su adaptabilidad. Sin embargo, la bioimpresión 3D, al poder usar distintos materiales con propiedades muy diversas consigue ajustarse mejor a las necesidades del tejido corneal. La córnea posee ciertas ventajas sobre otros tejidos a la hora de la bioimpresión, ya que es completamente avascular y tiene una demanda metabólica extremadamente baja. La mayoría de los tejidos corneales que se han creado usan la técnica de extrusión (queratocitos corneales humanos, queratocitos corneales humanos diferenciados de las células madre mesenquimales derivadas de cornetes humanos, células epiteliales corneales humanas, células endoteliales corneales humanas modificadas genéticamente para expresar ribonucleasa (R5)) aunque en algunos casos, la técnica de inyección de tinta (queratocitos corneales humanos) y la bioimpresión asistida por láser (células madre embrionarias humanas y células madre derivadas de tejido adiposo humano) podrían ser ventajosas por reaccionar mejor con las células.¹²

Científicos de todo el mundo participan en la producción de una córnea artificial. En 2017, un equipo de investigadores españoles, en el Instituto Español de Investigaciones Biomédicas, Hospital La Paz de Madrid, anunció su intención de crear una córnea trasplantable mediante bioimpresión 3D para uso humano. Otros equipos de investigación, como por ejemplo *Potgieter et al.*, de la Universidad de Massey en Nueva Zelanda, están investigando a partir de colágeno extraído de las escamas del pez Hoki, un espécimen que es tolerado por el sistema inmunológico humano. También, se investiga y compara distintos métodos para preparar injertos de córnea, encontrando la alternativa más rentable que mantenga unos buenos resultados visuales.²²

A día de hoy, aún no se ha conseguido obtener un tejido corneal multicapa completo mediante bioimpresión 3D, pero esta técnica está en sus inicios y hay interesantes avances en comparación a las terapias comunes.²⁰

5.4.3. Conjuntiva

Cuando la conjuntiva sufre diferentes lesiones que obligan a cortar el tejido, los tratamientos habituales para repararla son: injertos autólogos de conjuntiva sana o aloinjertos de otros tejidos, como por ejemplo membrana amniótica o mucosa oral. Estos tratamientos tienen algunas limitaciones: ausencia de conjuntiva sana si la lesión o enfermedad es bilateral, mala respuesta inmune, queratinización, pérdida de células caliciformes, infecciones, y opacidad, entre otras.

Hasta ahora, el único estudio experimental que ha utilizado la bioimpresión 3D para obtener una estructura que permita la regeneración de la estructura dañada es *Dehghani et al.*²⁰; esto se debe a los parámetros que se deben tener en cuenta para conseguir bioimprimirla:

- Espesor: debe estar lo más cerca del espesor original.
- Densidad celular adecuada tanto de células epiteliales como de células caliciformes.
- Transparencia, elasticidad y rigidez. Al poder emplear distintos materiales, se puede controlar la transparencia de la construcción,

ajustar las propiedades elásticas para que sean similares a las del tejido sano, y ajustar la rigidez de los andamiajes.

- Actividad biológica: el uso de materiales de origen biológico permite la capacidad de reepitelización, consiguiendo una buena biocompatibilidad y disminuyendo la formación de cicatrices.¹²

Dehghani et al. publicaron en 2018 la incorporación de células de conjuntiva a membranas mediante la bioimpresión basada en extrusión. Las membranas impresas eran incoloras y transparentes; las células cultivadas en las membranas demostraron una viabilidad y proliferación adecuadas, además de presentar una adhesión celular correcta. Estos resultados se obtuvieron con la mezcla de gelatina al 8% p/v, elastina al 2% p/v y hialuronato de sodio al 0,5% p/v. La conclusión de la investigación tras los experimentos *in vivo* sobre defectos conjuntivales inducidos en conejos fue que, gracias a la composición de la mezcla, la membrana diseñada ofrecía características físicas y mecánicas necesarias para la reconstrucción exitosa de la superficie ocular, debido a una mayor densidad de células caliciformes en el epitelio trasplantado, menos inflamación y menor formación de tejido cicatricial.²⁰

6. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran el avance de la bioimpresión a lo largo de los siglos XX y XXI. Durante los últimos 20 años, además de crearse el concepto de bioimpresión de tejidos, se han diseñado bioimpresoras y biotintas, han evolucionado las técnicas de bioimpresión y se han desarrollado nuevas técnicas para obtener distintos tejidos bioimpresos, entre ellos los oculares.

Los conocimientos acerca de la bioimpresión y sus utilidades han hecho que las investigaciones obtengan cada vez mejores resultados, y que estos modelos tridimensionales creados se parezcan cada vez más al tejido humano que se necesita reemplazar avanzando notablemente en el campo de la medicina regenerativa. Dependiendo del tejido que se busque replicar, se deben emplear distintas biotintas y biomateriales, combinándolo con la técnica que mejores resultados ofrezca para crear ese tejido.

El progreso no ha sido equitativo en todos los tejidos del organismo, lo que más se ha conseguido bioimprimir han sido vasos sanguíneos, seguido de cartílago, huesos, tejido muscular, piel, tejido adiposo y músculo esquelético.²⁵ Tanto equipos de investigadores académicos como empresas privadas trabajan para lograr una viabilidad celular óptima bioimprimiendo distintas líneas celulares, creando nuevas bioimpresoras, investigando nuevas biotintas, etc., que poder emplear en un futuro cercano en el ámbito médico-quirúrgico.

Se observa como en los últimos 10 años ha crecido el interés de la comunidad científica por la bioimpresión 3D. En las figuras 7 y 8 se aprecia el aumento significativo de artículos publicados desde 2010 hasta 2021. En la **figura 7** se ve el número de publicaciones con las palabras clave *3D bioprinting*, y en la **figura 8**, se ve en azul el número de publicaciones con *3D bioprinting*, mientras que en naranja con *bioprinting AND eye*.

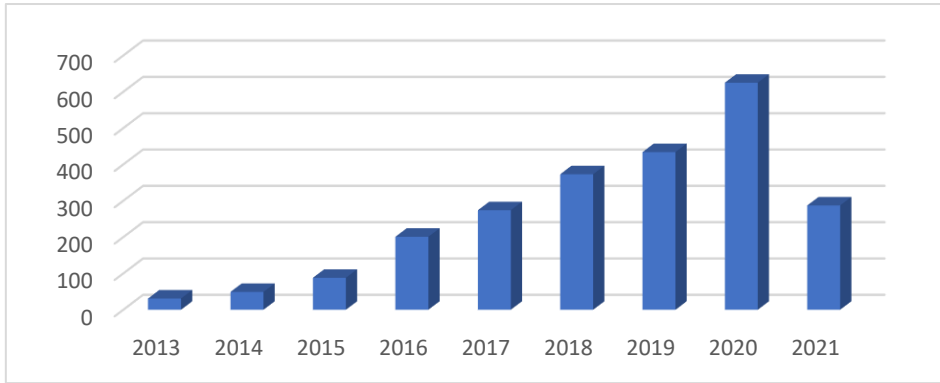


Figura 7. Número de publicaciones en *PubMed* con las *keywords*: *3D bioprinting*

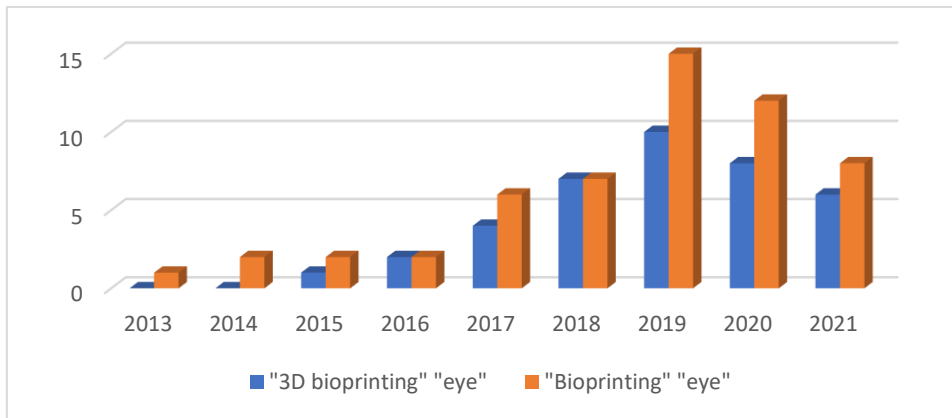


Figura 8. Número de publicaciones en *PubMed* con las *keywords*: *3D bioprinting* y *eye* (en azul) y *bioprinting* y *eye* (en naranja).

Como se aprecia, los estudios de bioimpresión de tejidos oculares son muy pocos, en comparación con el total de los publicados, pero desde el 2018 el número ha aumentado de forma considerable.

7. Conclusiones

La conclusión general de este trabajo es que la bioimpresión de tejidos oculares ha avanzado de forma considerable a lo largo de los años, encontrando distintos materiales para biotintas cada vez mejores y más compatibles, y creando distintas bioimpresoras con diferentes funciones y técnicas para obtener tejidos oculares bioimpresos cada vez más semejantes a los naturales.

De forma específica:

1. Las técnicas de bioimpresión empleadas para los tejidos oculares son la bioimpresión basada en la extrusión, la basada en goteo y la basada en láser.
2. Las biotintas empleadas en la bioimpresión pueden ser basadas en biomateriales naturales, basadas en biomateriales sintéticos y basadas en compuestos con moléculas.
3. Los tejidos oculares más investigados y publicados son retina, córnea y conjuntiva.

8. Bibliografía

- 1) Forrester J V, Dick A D, McMenamin P G, Roberts F. Anatomy of the eye and orbit. Forrester J V. The eye: Basic sciences in practice; Aberdeen, UK: Saunders; 2016: 4th ed. Pag.20-59
- 2) Harvey T M, Fernandez A G A, Patel R, Goldman D, Ciralsky J. Conjunctival Anatomy and Physiology. Holland E, Mannis M, Barry L.W. Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film. Aberdeen, UK: Saunders; 2013: Pag. 23-26.
- 3) Ansari M W, Nadeem A. Transparent Structures of the Eyeball. Ansari M W, Nadeem A. Atlas of Ocular Anatomy. Cham, Switzerland: Springer International; 2016; Pag. 68-69
- 4) Leberfinger A N, Dinda S, Wu Y, Koduru S V, Ozbolat V, Ravnic D J, Ozbolat I T. Bioprinting functional tissues. Acta Biomater; 2019;95:32-49.
- 5) Huang W, Zhang X. 3D Printing: Print the future of ophthalmology. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(8):5380-1.
- 6) R.J. Klebe, Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues, Exp. Cell Res. 179 (1988) 362–373
- 7) Naranjo JD, Scarritt ME, Huleihel L, Ravindra A, Torres CM, Badylak SF. Regenerative Medicine: lessons from Mother Nature. Regen Med. 2016;(8):767-775.
- 8) Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(47):14452-9.
- 9) J. Groll, J. A. Burdick, D-W Cho, B Derby, M Gelinsky, S C Heilshorn, T Jüngst¹, J. Malda, V A Mironov, K Nakayama, A Ovsianikov, W Sun, S Takeuchi, J. J. Yoo and T. B. F Woodfield. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. Biofabrication 11 (2018), 3.
- 10) Gillispie G, Prim P, Copus J, Fisher J, Mikos AG, Yoo JJ, Atala A, Lee SJ. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. Biofabrication. 2020;12(2):022003.
- 11) Gao T, Gillispie GJ, Copus JS, Pr AK, Seol YJ, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. Biofabrication. 2018;10(3):034106.
- 12) Ruiz-Alonso S, Villate-Beitia I, Gallego I, et al. Current Insights Into 3D Bioprinting: An Advanced Approach for Eye Tissue Regeneration. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):308.
- 13) Selcan Gungor-Ozkerim P, Inci I, Shrike Zhang Y, Khademhosseini A, Remzi Dokmeci M. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview HHS Public Access. 6(5), 915-946.
- 14) Derakhshanfar S, Mbeleck R, Ku K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. (2018)
- 15) Ozbolat I T, Moncal K K, Gudapati H. Evaluation of bioprinter technologies. Additive Manufacturing. Elsevier B.V. 2017; (Vol. 13, Pag. 179-200.
- 16) Shi P, Edgar TYS, Yeong WY, Laude A. Hybrid three-dimensional (3D) bioprinting of retina equivalent for ocular research. Int J Bioprint. 2017;3(2):008.
- 17) Lorber B, Hsiao WK, Hutchings IM, Martin KR. Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric inkjet printing. Biofabrication. 2014;(1):015001.
- 18) Kador KE, Grogan SP, Dorthé EW, Venugopalan P, Malek MF, Goldberg JL, D'lima DD. Control of Retinal Ganglion Cell Positioning and Neurite Growth: Combining 3D Printing with Radial Electrospun Scaffolds. Tissue Eng Part A. 2016; (3-4):286-94.
- 19) Fenton O S, Paolini M, Andresen J L, Müller F J, Langer R. Outlook son Three-Dimensional Printing for Ocular Biomaterials Research. Journal of ocular pharmacology and therapeutics. (2019) Volume 00, Number 00
- 20) Dehghani S, Rasoulianboroujeni M, Ghasemi H, Keshel SH, Nozarian Z, Hashemian MN, Zarei-Ghanavati M, Latifi G, Ghaffari R, Cui Z, Ye H, Tayebi L. 3D-Printed membrane as an alternative to amniotic membrane for ocular surface/conjunctival defect reconstruction: An *in vitro* & *in vivo* study. Biomaterials. 2018;174:95-112.
- 21) Organización Nacional de Trasplantes. Plan Nacional de Córneas. <http://www.ont.es/infesp/Documents/PLAN%20NACIONAL%20DE%20CORNEAS%202016.pdf> . (26 de mayo de 2021)
- 22) Sommer A C, Blumenthal E Z. Implementations of 3D printing in ophthalmology. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology (2019) 257:1815-1822.
- 23) Rönkkö S, Vellonen K-S, Järvinen K, Toropainen E, Urtti A. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. Drug Deliv. Adn Transl. Res (2016)6:660-675
- 24) Calonge M, Pérez I, Galindo S, Nieto-Miguel T, López-Paniagua M, Fernández I, Alberca M, García-Sancho J, Sánchez A, Herreras JM. A proof-of-concept clinical trial using mesenchymal stem cells for the treatment of corneal epithelial stem cell deficiency. Transl Res. 2019;206:18-40.
- 25) Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. Biotechnol Adv. 2016;34(4):422-434.

ANEXO I



Universidad de Valladolid

IOBA - Proyectos Investigación

Conformidad del Director del IOBA / Comisión de Investigación



D^a M^a Paz García García, como Secretaria de la Comisión de Investigación del IOBA, por delegación del Director.

Hace constar:

Que conoce la documentación relativa al estudio con código de la Comisión de Investigación **04** que lleva por título **Bioimpresión de tejidos oculares**, y que la misma ha sido evaluada previa realización por la Comisión de Investigación del IOBA.

El investigador principal del proyecto será:

D//D^a Yolanda Diebold Luque

Declaro tener conocimiento y apruebo la realización del estudio en el IOBA.

En Valladolid a, 5/2/2021

Fdo.: M^a Paz García García

Secretaria de la Comisión de Investigación



IOBA - Campus Miguel Delibes - Paseo de Belén 17 - 47011 - Valladolid
Tel. 983 42 35 59 | Fax 983 18 37 33 | ioba@ioba.med.uva.es | www.ioba.es

UEC-CEIM-02
1 de 1
V1 - 20180622

ANEXO II



Avda. Ramón y Cajal, 3 - 47003 Valladolid
Tel.: 983 42 00 00 - Fax 983 25 75 11
gerente.hcuv@saludcastillayleon.es



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS ÁREA DE SALUD VALLADOLID

Valladolid a 11 de febrero de 2021

En la reunión del CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID ESTE del 11 de febrero de 2021, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

PI 21-2152	BIOIMPRESIÓN DE TEJIDOS OCULARES IOBA-2021-04	IP: YOLANDA DIEBOLD LUQUE, LAURA GARCÍA POSADAS EQUIPO: LAURA GARCÍA POSADAS, MARÍA RUIZ CUESTA IOBA
TFG NO HCUV		

A continuación, les señalo los acuerdos tomados por el CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID ESTE en relación a dicho Proyecto de Investigación:

Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe favorable** y la **aceptación** del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos Área de Salud Valladolid Este.

Un cordial saludo.

F. Javier Álvarez

Dr. F. Javier Álvarez.
CEIm Área de Salud Valladolid Este
Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Farmacología, Facultad de Medicina,
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7,47005 Valladolid
alvarez@med.uva.es,
jalvarezgo@saludcastillayleon.es
tel.: 983 423077