



Biomateriales para la bioimpresión 3D de la piel

Biomaterials in 3D skin bioprinting

Luz Pérez-Tulich¹, Julianna Travi-Antonio¹, Julio Valdivia-Silva^{1,2}

RESUMEN

La bioimpresión 3D es una técnica de manufactura aditiva que permite utilizar un biomaterial mezclado con células (llamado biotinta) formando una estructura que en condiciones amigables para las células, permiten el crecimiento y diferenciación de un tejido neo-formado como puede ser la piel. La técnica distribuye de forma homogénea factores de crecimiento y nutrientes, superando de lejos a los cultivos tradicionales e imitando de mejor manera al microambiente idóneo presente en los tejidos. En esta minirevisión describimos la técnica y los principales biomateriales de origen natural usados para la bioimpresión de la piel.

PALABRAS CLAVE: Bioimpresión de tejidos, Biomateriales, Piel, Medicina regenerativa, Ingeniería de tejidos

Dermatol Peru 2020; 30 (2): 120-127

ABSTRACT

3D bioprinting is an additive manufacturing technique that allows the use of a biomaterial mixed with cells (called bioink), forming a structure that, under cell-friendly conditions, allows the growth and differentiation of a newly-formed tissue such as the skin. The technique homogeneously distributed growth factors and nutrients, far surpassing traditional cell cultures and better imitating the ideal microenvironment present in the tissues. In this mini-review we describe this technique and the main biomaterials of natural origin used for bioprinting of the skin.

KEY WORDS: bioprinting tissue, Biomaterials, Skin, Regenerative medicine, Tissue engineering.

LA PIEL Y SU ESTRUCTURA

La piel es el órgano más grande del cuerpo y representa aproximadamente el 15% del peso corporal total de los adultos. Entre sus funciones se encuentran; Función protectora como barrera contra agresores físicos, químicos y biológicos externos, absorbe luz UV, vigilancia inmune, (ii) Función Perceptiva: tacto, temperatura, dolor y (iii) Función Reguladora, participa en la regulación térmica, de hidratación y excreción^{1,2}.

La piel está organizada en 3 capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. El nivel más externo, la epidermis, se divide comúnmente en cuatro capas de acuerdo con la morfología y posición de los queratinocitos, se diferencian en células córneas, incluida la capa de células basales (estrato germinativo), la capa de células escamosas (estrato espinoso), la capa de células granulares (estrato granuloso), y la capa celular corniforme o córnea (estrato córneo) Las tres capas inferiores se denominan estrato de Malpighii. La capa media, la dermis, está formada fundamentalmente por colágeno, comprende la mayor

1. Laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Biología Sintética, Universidad de Ingeniería y Tecnología - UTEC, Lima Perú

2. Centro de Investigación en Bioingeniería (BIO), Universidad de Ingeniería y Tecnología -UTEC

parte de la piel y proporciona su flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tracción. Protege al cuerpo de lesiones mecánicas, se une al agua, ayuda a la regulación térmica e incluye receptores de estímulos sensoriales. La hipodermis se encuentra en el tejido subcutáneo, o panículo, que contiene pequeños lóbulos de células grasas conocidas como lipocitos^{1,2} (Tabla N° 1).

CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

La cicatrización de heridas es un intrincado proceso que involucra migración y proliferación celular todo esto orquestado mediante citoquinas, las cuales son producidas por macrófagos, plaquetas, fibroblastos, células epidermales y neutrófilos^{3,4}. Las cuatro etapas principales, continuas y ocasionalmente superpuestas de la cicatrización de heridas son la hemostasia, la inflamación, la proliferación y la remodelación. La hemostasia es la fase inicial, la cual ocurre instantáneamente después de ocurrida la injuria, en esta fase las plaquetas entran en contacto con las proteínas de la matriz extracelular lo que provocará su activación y formación inicial del coágulo con la transformación del fibrinógeno en fibrina, luego se liberarán citocinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF),

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo que provocará la migración de monocitos, linfocitos y neutrófilos a la herida y el comienzo a la fase inflamatoria^{4,5,6}. Tanto los neutrófilos como los monocitos expresan selectina L y ligando de selectina P y E, utilizan las 3 selectinas para mediar las interacciones iniciales que provoca las células endoteliales activadas. Los neutrófilos son la primera línea de defensa y llegan al sitio de la injuria dentro de las siguientes 24 horas, junto con los neutrófilos, los macrófagos son atraídos al lugar de la injuria ya que son responsables de limpiar las células apoptóticas^{6,7}. La fase inflamatoria generalmente es resuelta en 2 semanas. Una respuesta inflamatoria persistente se considera patológica y se llama inflamación crónica⁴.

En la fase proliferativa la angiogénesis y la fibroplasia son los componentes principales, entre los 3 y 5 días después de la lesión inicial, los fibroblastos comienzan a secretar colágeno tipo III, proteoglicanos y elastina, que forma el tejido de granulación, las células endoteliales vasculares, atraídas por VEGF, PDGF y TGF- β , crean nuevos capilares y transportan células circulantes y nutrientes a la herida.

En la etapa de regeneración, los macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos sufren apoptosis para dejar una matriz formada principalmente por colágeno tipo III, que luego es cambiada por una matriz principalmente formada por colágeno tipo I, con un número reducido de células^{4,5}.

Capa	Célula	Función
▲ Epidermis	Queratinocitos	Producir queratina, Protectora
	Melanocitos	Producir melanina, protección contra la radiación UVB
	Células de Langerhans	Reconocen y procesan Antígenos solubles encontrados en la epidermis
▲ Dermis	Células de Merkel	Mecanorreceptores tipo I ubicados en sitios de alta sensibilidad táctil
	Fibroblastos	Sintetizan fibras de retículo, fibras elásticas y colágeno
	Mastocitos	Respuesta a alergias, sus gránulos contienen histamina, heparina, serina proteinasas y ciertas citocinas
▲ Hipodermis	Fibroblastos	Sintetizan fibras de retículo, fibras elásticas y colágeno
	Adipocitos	Almacenamiento de energía en forma de grasa
	Macrófagos	Fagocitosis, reparación de heridas

BIOIMPRESION 3D

Según la OMS, las quemaduras son un problema de salud pública, que representan unas 180 000 muertes anuales, casi dos tercios ocurren en las regiones de África y Sudeste Asiático, la tasa de muertes infantiles por quemaduras es actualmente más de 7 veces mayor en los países de bajos y medianos ingresos que en los países de altos ingresos⁸.

Se estima que cada año en el Perú 15,000 niños son atendidos por quemaduras leves y severas en los diferentes establecimientos de salud. Al instituto Nacional de salud del Niño llegan los casos más graves; los que tienen quemaduras en más del 30% de su cuerpo. En estos casos los tratamientos son largos y costosos y muchas veces de por vida. Dependiendo del grado de intensidad de la quemadura, el niño que la sufrió puede pasar por cirugías o curaciones bajo anestesia en sala de operaciones y acceder a un injerto de piel, para luego someterse a terapias de rehabilitación física y emocional por dos o tres años más⁹.

Una solución prometedora a la demanda insatisfecha de tejidos y órganos para la medicina regenerativa, es la ingeniería de tejidos, la cual utiliza una combinación de células, biomateriales, moléculas bioactivas y tecnologías de ingeniería para fabricar construcciones biológicas que imitan y mejoran las funciones de sus contrapartes en el cuerpo humano¹⁰. La bioimpresión 3D deposita la biotinta (células en una matriz de soporte) con una presión milimétrica en condiciones que son amigables con las células^{11,12}, en comparación con los cultivos in vitro 3D tradicionales, el tejido de impresión 3D distribuye factores de crecimiento y nutrientes de manera más uniforme a lo largo del material, lo cual es importante para mantener la integridad estructural y proporcionar un entorno citocompatible para las células antes, durante y después de la impresión.

La medicina regenerativa tiene el potencial de sanar o reemplazar tejidos y órganos dañados por la edad, enfermedad o trauma, así como también para normalizar defectos congénitos. Los datos preclínicos y clínicos hasta la fecha son prometedores, ya que respaldan la posibilidad de tratar tanto enfermedades crónicas o lesiones agudas, como heridas dérmicas, enfermedades cardiovasculares, traumas, tratamientos para ciertos tipos de cáncer y más^{11,12}. Una de las técnicas usadas en medicina regenerativa es la bioimpresión 3D, la cual implica la deposición capa por capa de biomateriales cargados de células en una estructura predeterminada para generar tejidos u órganos funcionales,

integrando biomateriales, células vivas y sistemas motores controlados para crear estructuras complejas, permitiendo la manipulación espacial de las células vivas, componentes funcionales como la matriz extracelular (ECM) y las moléculas bioactivas, dando la posibilidad de recapitular el microambiente fisiológico complejo de tejidos y órganos 3D^{13,14}. (Figura N° 1)

Principales técnicas de Bioimpresión 3D

Recientemente se han desarrollado múltiples técnicas para lograr la bioimpresión de multimateriales de forma espontánea y continua, con el objetivo de reproducir la microarquitectura compleja de los tejidos nativos con diferentes tipos de biomateriales y células. Estos métodos se clasifican principalmente como inyección de tinta, extrusión y estereolitografía.

La bioimpresión de inyección de tinta es una técnica sin contacto que usa fuerzas térmicas, piezoeléctricas o electromagnéticas para expulsar gotas sucesivas de biotinta sobre un sustrato. En general, este tipo de bioimpresora utiliza cartuchos para que el hidrogel con las células encapsuladas (biotinta) se cargue, estos cartuchos están conectados a la bioimpresora y actúan como fuente de la biotinta durante el proceso de bioimpresión¹⁵⁻¹⁸. La impresión depende de propiedades físicas tales como la densidad, la viscosidad y la tensión superficial de la biotinta para una bioimpresión sea exitosa. Este tipo de bioimpresión no funciona bien con materiales con alta viscosidad (> 15 mPa / s) y con biotintas

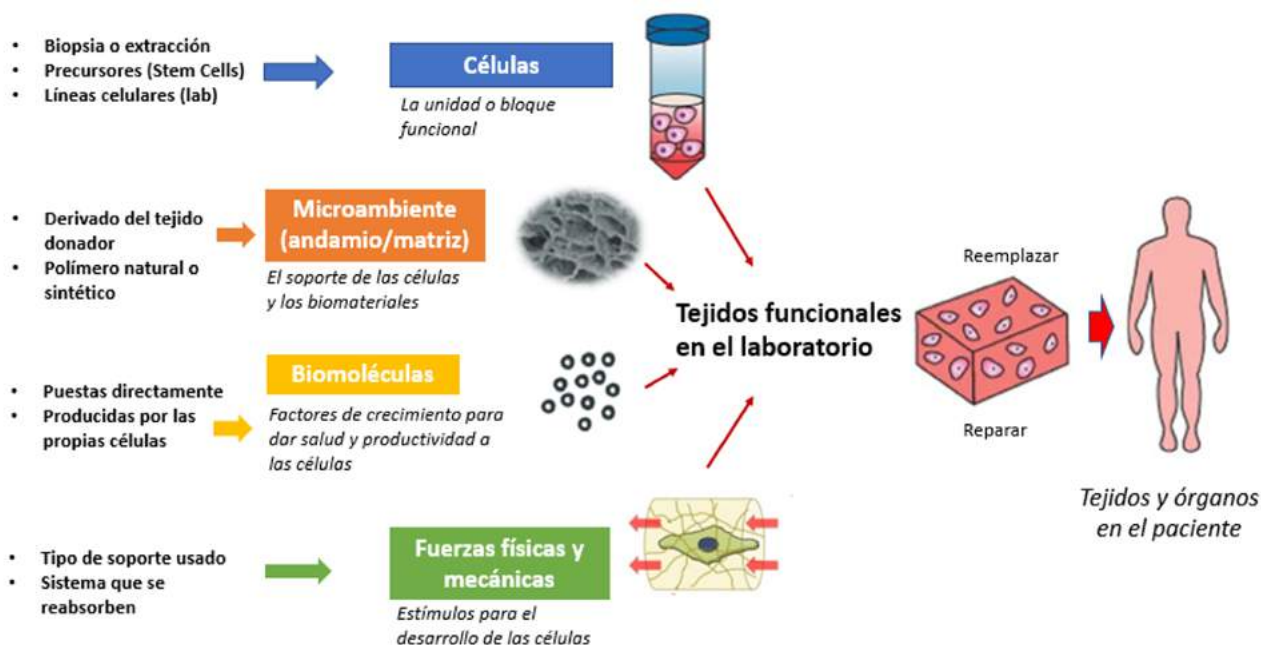


Figura N° 1. Interacción entre las células, microambiente y fuerzas mecánicas en la Bioimpresión 3D.

con alta densidad celular ($> 1 \times 10^6$ células / ml) debido a que la alta densidad aumenta la viscosidad promedio de los biotintas, lo que resulta en la obstrucción del cabezal, también a la alta velocidad de deposición celular podría dañar considerablemente las células^{15,19}.

La bioimpresión por extrusión se lleva a cabo en un equipo que poseen cartuchos similares a una jeringa, en que con la ayuda de presión neumática y pistones (presión mecánica) dispensan el biomaterial mezclado con las células y facilitan la extrusión a través de una boquilla con un orificio dispensando filamentos de hidrogel de manera continua, los cuales tienen aproximadamente 150–300 μm de diámetro, realizando este proceso capa por capa hasta obtener una construcción^{10,16,20-24}. Una de las ventajas de la bioimpresión por extrusión es la capacidad de imprimir con densidades celulares muy altas y brinda la posibilidad de ajustar la presión del aire, para la deposición neumática. Podemos utilizar una gama de tipos de biotintas y viscosidades. (30–6 $\times 10^7$ mPa s). Las desventajas de este método radica en la presión mecánica generada en el momento del depósito de la biotinta, lo cual puede dañar las células encapsuladas debido a una interrupción de la membrana celular, lo que podría desencadenar la muerte celular²⁰⁻²².

Otro de los métodos más conocidos, dado que elimina los efectos negativos de la presión de corte presente en las otras técnicas de bioimpresión, es la estereolitografía, la cual se realiza capa por capa en la superficie de un depósito de material, usando un conjunto de micro espejos digitales para controlar la intensidad de la luz de cada píxel para imprimir áreas donde la luz UV o VIS polimeriza materiales poliméricos sensibles, con alta precisión y velocidad de impresión²³⁻²⁵. Estas resinas fotosensibles absorben fotones, después de la irradiación con luz y la formación de especies reactivas fuera del estado excitado, inician reacciones consecutivas^{22,26-28}. La concentración de los fotoiniciadores influye en la rigidez y la densidad de la resina curada, las altas concentraciones pueden producir efectos citotóxicos, los cuales dependen del tipo celular.^{26,30} (Figura N° 2)

PROPIEDADES DE LOS POLÍMEROS PARA BIOIMPRESIÓN

La biotinta utilizada en el proceso de bioimpresión se define como un material de soporte celular imprimible; se utilizan diferentes tipos de biotintas para cada técnica de bioimpresión específica. Propiedades como la viscosidad de los polímeros que forman parte de las biotintas afectan el resultado de la estructura impresa, o el comportamiento del polímero en solución, grado de hidratación, interacción biológica, velocidad de degradación. Otras consideraciones

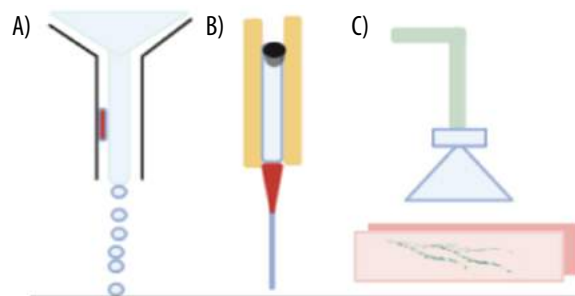


Figura N° 2. Principales tipos de Bioimpresión A) Bioimpresión por Inyección a tinta B) Bioimpresión por extrusión C) Bioimpresión por estereolitografía.

como la vida útil y el costo de los de polímeros para las biotintas también son importantes para la elección del material^{16,22}.

Las principales propiedades a tener en cuenta son; la reticulación, la viscosidad, la hidratación, la biocompatibilidad y el grado de degradación.

La reticulación, es un proceso de estabilización en la química de los polímeros que conduce a una extensión multidimensional de la cadena polimérica que da como resultado una estructura tipo red. La reticulación es un enlace que une una cadena de polímero a otra, puede ser iónico o covalente. La red reticulada facilita enormemente la formación de una estructura 3D al imprimir andamios^{30,31}.

La viscosidad es una medida de su resistencia a las deformaciones graduales causadas por tensiones de corte o tensiones de tracción, está determinada por la temperatura, la concentración de polímero y su peso molecular¹¹. Los hidrogeles en general, son fluidos no newtonianos, lo que significa que su viscosidad cambia con la velocidad de corte; esfuerzo cortante y / u otras condiciones como la geometría de flujo o el historial cinemático del fluido^{20,31,33}. En la bioimpresión por extrusión, si la biotinta es altamente viscosa, entonces la presión necesaria para la extrusión será mayor y el flujo de la solución de polímero desde el orificio de la boquilla pequeña puede verse afectado, lo que resulta en la muerte celular^{15,20}

El grado de hidratación; los hidrogeles tienen un alto contenido de agua que es beneficioso para la supervivencia celular porque protegen a las células de las fuerzas inducidas por el proceso de impresión, también determina directamente la velocidad de absorción y difusión del soluto, como el transporte de oxígeno y nutrientes a las células cargadas dentro de la red de hidrogel^{16,20,34}.

La biocompatibilidad es una propiedad crítica para un biomaterial, no debe tener efectos tóxicos o perjudiciales a los sistemas biológicos; el organismo que acepta el

material extraño y lo admite como parte del conjunto, no debe mostrar signos de efectos nocivos en el sitio de colocación^{13,35}. La biocompatibilidad cubre tres aspectos: (a) no cambia la estructura y función de las células y tejidos con los que entra en contacto directo; citocompatibilidad; (b) los productos de degradación deben ser citocompatibles; y (c) cuando se implanta in vivo, el material y sus productos de degradación no causan ninguna respuesta de rechazo inmune³¹.

La degradación de un biomaterial es importante para bioimpresiones exitosas basadas en andamios. Porque en un escenario ideal, el tiempo de degradación del andamio hecho del biomaterial será remodelado y reabsorbido por las células en crecimiento y reemplazado gradualmente por las células diferenciadas recién formadas y la matriz extracelular, garantizando así una remodelación adecuada del tejido^{33,35-36}.

POLÍMEROS PARA LA BIOIMPRESIÓN DE PIEL

Actualmente existen varios sustitutos de piel usados para el tratamiento de quemaduras o heridas profundas, los cuales pueden ser biológicos o sintéticos; hasta la fecha no se conoce uno ideal ya que esto depende del uso que se le dé. En muchos casos ayudan de manera temporal o permanente a la regeneración del tejido dañado. Por otro

lado la bioingeniería luego de años de investigación ha logrado identificar diversos materiales que cuentan con una similitud o parecido a los depósitos de células o tejidos relacionados a la piel. Los hidrogeles, son los candidatos óptimos para esta tarea ya que son biocompatibles y no generan una reacción inmune por parte del paciente. Además se les puede adicionar componentes necesarios para el crecimiento celular y su porcentaje de agua crea un microambiente que favorece la encapsulación de células. Los hidrogeles se clasifican en dos tipos:

Polímeros naturales: Son biológicamente compatibles y degradables por procesos naturales. Los más utilizados son los de origen animal y se encuentran en la matriz extracelular, son el Colágeno, la Fibrina y el Ácido Hialurónico o Matrigel, otros de origen vegetal como Agarosa y alginato⁴⁵. El lado positivo de usar polímeros derivados de la matriz extracelular es que contienen ligantes naturales que favorecen la adhesión celular y la señalización entre células. Pero propiedades mecánicas no son tan buenas, son mecánicamente inestables, rígidos y en muchos casos no se puede controlar su degradabilidad. Tabla N° 2

Polímeros sintéticos: Estos polímeros son diseñados para actuar como materiales base para ser modificados según las características deseadas a través de una modificación

Tabla 2. Propiedades de Polímeros naturales que forman hidrogeles.

Variante	Métodos de polimerización	Degradable	Favorece la adhesión celular	Observaciones
Polímeros Naturales				
▲ Agarosa	Térmico	No	No	
▲ Alginato	Iónico, Ca ²⁺	No	No	Oligómeros de Ácido Manurómico (M) y Ácido gularónico (G) y otros cationes divalentes pueden ser usados como cross-linkers
▲ Colágeno	Calor, pH	Enzimático, MMP y Colagenasa	Si	Para ajustar el tamaño de la fibra se puede alterar el pH y la temperatura
▲ Fibrina	Corte enzimático del fibrinógeno usando trombina	Enzimático: plasmina	Si	
▲ Gelatina	Térmico, pH	Enzimática: MMPs y colagenasa	Si	Colageno Hidrolizado
	Luz	Enzimática: MMPs y colagenasa	Si	
▲ Ácido hialurónico	Químico, requiere cross-linkers	Enzimática: hialuronidasa	No	Se usa crosslinker que puedan reaccionar con los grupos hidroxilos y carboxilos libres
	Luz	Enzimática: hialuronidasa; se puede adicionar cross-linkers sensibles a MMP	No	Metacrilatos y acrilatos unidos con los grupos hidroxilos libres
▲ Matrigel	Calor	Enzimática: MMPs y colagenasa	Yes	Se conoce muy poco de matriz ya que varía por lote

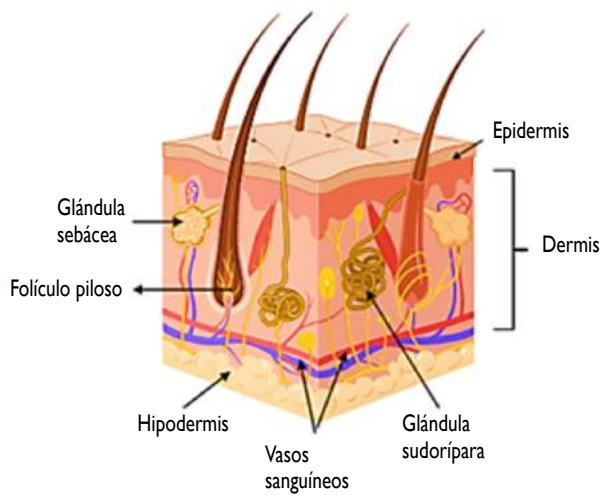


Figura N° 3. Estructura de la piel.

química. los polímeros sintéticos tienen la facilidad, a diferencia de los polímeros de origen natural, que sus propiedades mecánicas y químicas son más estables y controlables.

Muchas veces se usan agregados compuestos constituidos por polímeros de origen natural y sintético. Para así aprovechar las ventajas de cada uno de estos. Estos hidrogeles al aplicarles reticulación forman matrices esponjosas con alto contenido de agua similar a una matriz extracelular que brindan soporte estructural a las células.

El éxito de una biotinta dependerá de la mezcla de polímeros y de las células utilizadas en la fabricación. Los compuestos naturales más usados para la bioimpresión de piel son los siguientes:

- ▲ Colágeno: cadena de tres polipéptidos de forma helical; se encuentra en gran proporción en la piel,

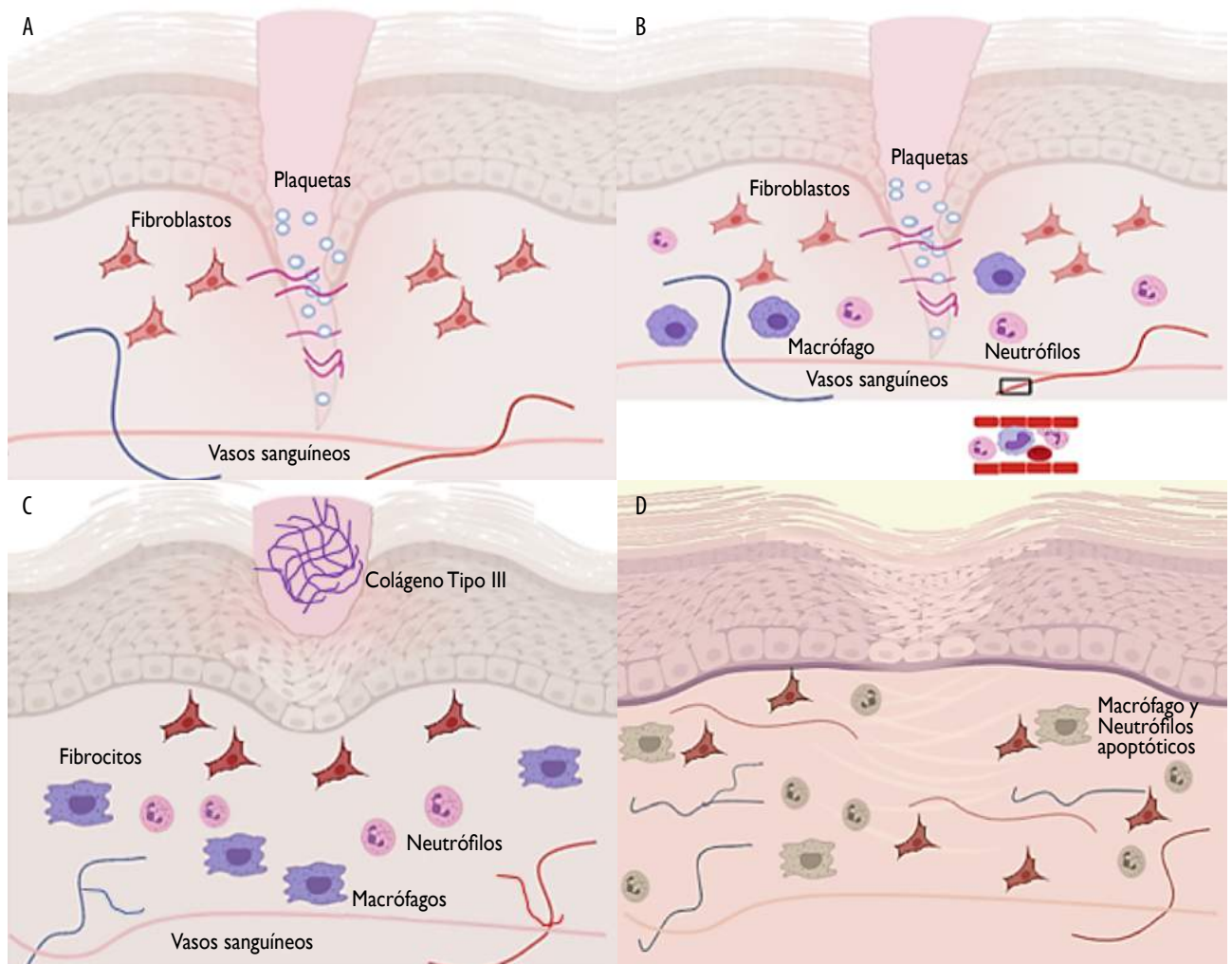


Figura N° 4. Proceso de cicatrización de heridas. A) Hemostasia, Plaquetas son expuestas a las proteínas de Matriz Extracelular y son activadas. B) Fase Inflamatoria, migración de monocitos y neutrófilos a la herida. C) Fase Proliferativa en donde la angiogénesis y la fibroplasia son los eventos principales. D) Fase de regeneración en donde neutrófilos y macrófagos sufren apoptosis.

contiene arginina, ácido aspártico y glicina (RGD). Brinda soporte biológico y estructural para las células. Es poco tóxico, biodegradable. En el año 1980 un grupo de investigadores diseñaron una piel artificial a base de colágeno llamado *Integra* que luego fue comercializado como un parche dérmico. Hansbrough y col. fabricaron un andamio a base de colágeno y glicosaminoglicanos que contiene fibroblastos y queratinocitos que fue usado en tratamientos para quemaduras. El colágeno reduce las contracciones al ser usado en heridas comparado con los andamios fríos-secos.

- ▲ Fibrina: Es una proteína presente en la sangre, que cuenta con sitios de anclaje celular. Es usado como un soporte estructural en la curación de heridas; para la impresión de biomateriales similares a la piel. Se tiene como referencia que el uso de fibrina derivada de plasma al 10% para un cultivo de queratinocitos y fibroblastos presenta una elevación significativa de interleucina -8 y un aumento en la expresión de colágeno tipo I Y III⁴⁹. Los modelos *in vitro* hechos con fibrina son adecuados para los mecanismos reguladores que se ven entre la matriz extracelular y las interacciones entre células.
- ▲ Gelatina: se obtiene por la desnaturalización irreversible del colágeno. Posee residuos de RGD que promueven la adhesión celular, tiene poca fuerza mecánica. Es usada en ingeniería de tejidos para promover la epitelización en la curación de heridas. Zhao y col⁵⁰ fabricaron una matriz similar a la epidermis usando queratinocitos con una matriz de gelatina entrelazada con luz. Esto resultó en una mejora en la consistencia de la matriz improvisando la adhesión celular y la formación de una epidermis estratificada con una función de barrera. Al aplicar electrospinning a la gelatina hace de esta un andamio 3D deseable para la regeneración de la piel.
- ▲ Alginato: es un polisacárido lineal cargado negativamente, está compuesto de ácido manurónico y gulurónico. Es natural, no tóxico, biodegradable y altamente compatible. Es popularmente usado en aplicaciones biomédicas debido a sus bajo costo, facilidad de formar geles y no genera rechazo inmune, por eso es usado para cubrir tejidos luego de una cirugía de donación de piel⁵⁰. Al modificar el alginato de forma química mejora su estabilidad mecánica en las estructuras 3D y al unirla con polímeros sintéticos como Dimetacrilato de Polietilenglicol PEG-DA provee una rigidez a andamios 3D impresos y sobrevivencia celular.
- ▲ Quitosano: Es un polisacárido lineal, se encuentra de forma abundante en el exoesqueleto de los invertebrados y

los hongos. Es biodegradable, biocompatible, analgésico y un polímero hemostático que puede ser modificado como un agente antimicrobiano y antiinflamatorio para parches de cicatrización de heridas⁵¹. El quitosano mejora la adhesión celular, favorece la proliferación de Fibroblastos y queratinocitos⁵². Sus propiedades mecánicas no son muy buenas y la gelatinización es lenta es por esto que debe de ser mezclado con otros polímeros o realizar un entrecruzamiento. La sonicación de nanofibras de quitosano tiene una alta porosidad e incrementa la proliferación celular.

CONCLUSIONES

En este artículo hemos recopilado todos los puntos que consideramos importantes relacionados a la bioimpresión de piel, esperamos sirva de ayuda para las personas que quieren iniciar su investigación sobre estos temas o buscan ampliar sus conocimientos. Consideramos que es un tema de importancia dentro del ámbito de la salud pública y que el desarrollo de un andamio *skin like* ayudaría a la recuperación de pacientes quemados o que presenten heridas por úlcera cuyos tratamientos en muchos casos son caros o muy complejos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noreen N. Anatomy and physiology of the skin. *Dermatology Nursing* 2005 Feb; 17(11): 62
2. Vijayavenkataraman S, Lu W, Fuh J. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication*. 2016 Sep 8;8(3):03-21.
3. Coalson E, Bishop E, Liu W, Feng Y, Spezia M, Liu B, et al. Stem cell therapy for chronic skin wounds in the era of personalized medicine: From bench to bedside. *Genes Dis*. 2019 Dec;6(4):342-58.
4. Gantwerker E. & Hom D. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Clin Plastic Surg* 2012 39 85-97.
5. Rahmati M, Blaker J, Lyngstadaas S., Mano J. & Haugen H. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. *Materials Today Advances*. 2020. p. 100051. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100051>
6. Abbas, Abul K., Andrew H. H. Lichtman, and Shiv Pillai. 2015. *Inmunología celular y molecular + Student Consult*. Elsevier España.
7. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing [Internet]. *Journal of Dental Research*. 2010. p. 219-29. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034509359125>
8. Organización Mundial de la salud Burns. [Documento en internet] [Fecha de acceso: Abril 2020] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
9. Sausa M. Más de 400 niños se queman cada año en el Perú por accidentes con líquidos calientes. *Perú 21*. 2017 Oct 21: Secc. Perú
10. Zhu K, Chen N, Liu X, Mu X, Zhang W, Wang C, et al. A General Strategy for Extrusion Bioprinting of Bio-Macromolecular Bioinks through Alginate-Templated Dual-Stage Crosslinking. *Macromol. Biosci*. 2018 Sep; 18(9):e1800127
11. Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martínez Ávila H, Hägg D, Gatenholm P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*. 2015 May 11; 16(5):1489-96.
12. Singh YP, Bandyopadhyay A, Mandal BB. 3D Bioprinting Using Cross-Linker-Free Silk-Gelatin Bioink for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019 Sep 18; 11(37):33684-96
13. Richards DJ., et al. 2013, 3D Printing for Tissue Engineering. *Isr J Chem*. October 1; 53(9-10): 805-814.
14. Gopinathan J, Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater Res*. 2018 Apr 6; 22:11.

15. Liu W, Heinrich MA, Zhou Y, Akpek A, Hu N, Liu X, et al. Extrusion Bioprinting of Shear-Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks. *Adv. Healthc. Mater.* 2017 Jun;6(12).
16. Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances.* 2016 -34, 422–434.
17. Skardal, A. Bioprinting Essentials of Cell and Protein Viability. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, 2015, 1–17.
18. Bishop ES, Mostafa S, Pakvasa M, Luu HH, Lee MJ, Wolf JM, et al. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes Dis.* 2017 Dec;4(4):185–95.
19. Ferris CJ, Gilmore KJ, Beirne S, McCallum D, Wallace GG, In Het Panhuis M. Bio-ink for on-demand printing of living cells. *Biomater Sci.* 2013 Feb 3;1(2):224–30.
20. Jakab K, Norotte C, Marga F, Murphy K, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication.* 2010 Jun;2(2):022001.
21. Kačarević ŽP, Rider PM, Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, et al. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials.* 2018 Nov 6;11(11).
22. Chen DXB. Extrusion Bioprinting of Scaffolds: An Introduction Extrusion Bioprinting of Scaffolds for Tissue Engineering Applications. 2019; 1–13.
23. Hu W, Wang Z, Xiao Y, Zhang S, Wang J. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater Sci.* 2019 Feb 26;7(3):843–55.
24. Chua CK, Yeong WY. *Bioprinting: Principles and Applications.* World Scientific Publishing Co Inc; 2014. 117-163
25. Schwalm R. Photoinitiators and Photopolymerization. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology.* 2001, 6946–51
26. Hacıoğlu, A., Yilmazer, H., & Ustundag, C. 3D Printing for Tissue Engineering Applications. *Journal of Polytechnic.* 2018
27. Mézel C, Souquet A, Hallo L, Guillemot F. Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling. *Biofabrication.* 2010 Mar;2(1):014103.
28. Williams C, Malik A, Kim T, Manson P, Elisseff J. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials.* 2005 Apr;26(11):1211–8.
29. Wang Z, Abdulla R, Parker B, Samanipour R, Ghosh S, Kim K. A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. *Biofabrication.* 2015 Dec 22;7(4):045009.
30. Ali M, Pages E, Ducom A, Fontaine A, Guillemot F. Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution. *Biofabrication.* 2014 Sep 12;6(4):045001.
31. Maitra, J, Kumar, V. Cross-linking in Hydrogels - A Review *American Journal of Polymer Science* 2014, 4(2): 25-31
32. Hu W, Wang Z, Xiao Y, Zhang S, Wang J. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater Sci.* 2019 Feb 26;7(3):843–55.
33. Chua CK, Yeong WY. *Bioprinting: Principles and Applications.* World Scientific Publishing Co Inc; 2014, 117-163
34. Song R, Murphy M, Li C, Ting K, Soo C, Zheng Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des. Devel. Ther.* 2018 Sep 24;12:3117–45.
35. Ozbolat I. *3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications.* Academic Press; 2016. Chapter 3: Bioink, 42, 92
36. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications [Internet]. *Progress in Polymer Science.* 2012, 106–26.
37. 7 September 2016 .3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication* 8 (2016) 032001.
38. Bajaj, Piyush M, Schweller R, Khademosseini A, L. West J, and Bashir R. (2014). 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 16:247-76.
39. Axpe, Eneko, and Oyen M. (2016). Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences.* 17 :12
40. Hölzl K, Shengmao L, Tytgat L, Van Vlierberghe S, Gu L, and Ovsianikov. A (2016). Bioink Properties Before, during and after 3D Bioprinting. *Biofabrication.* 8(3):032002
41. Tesis: Zhang Y. 3D bioprinting of vasculature network for tissue engineering. (esis para optar por el grado de Doctor en Fisiología), University of Iowa, 2014.
42. Li Z, Huang S, and Fu X. (2018). 3D Bioprinting Skin. *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery,* 367–376.
43. Yan, Wei-Cheng, Davoodi P, Vijayavenkataraman S, Tian Y, Cheng W, Fuh J, Samirah K, and Wang C. (2018). 3D Bioprinting of Skin Tissue: From Pre-Processing to Final Product Evaluation. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2-128
44. Binder, Kyle, and Skardal A. (2016). Human Skin Bioprinting. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine.*
45. Vijayavenkataraman S, Lu W, and Fuh J. (2016). 3D Bioprinting of Skin: A State-of-the-Art Review on Modelling, Materials, and Processes. *Biofabrication* 8 (3): 032001.
46. Baltazar T, Merola J, Catarino C, Xie C, Kirkiles-Smith N, Lee V, Hotta S, et al. (2020). Three Dimensional Bioprinting of a Vascularized and Perfusable Skin Graft Using Human Keratinocytes, Fibroblasts, Pericytes, and Endothelial Cells. *Tissue Engineering Part A.* 26(5-6):227-238
47. Tanaka A, Nagate T, and Matsuda H. (2005). Acceleration of Wound Healing by Gelatin Film Dressings with Epidermal Growth Factor. *Journal of Veterinary Medical Science.* 67(9):909-13
48. Zhao X, Lang Q, Yildirim L, Yuan Z, Cui W, Annabi N, Woei K, Dokmeci M, Ghaemmaghami A, and Khademosseini A. (2016). Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* 5 (1): 108–18.
49. Brenner M, Hilliard C., Peel G, Crispino G, Geraghty R, and O'Callaghan G. (2015). Management of Pediatric Skin-Graft Donor Sites. *Journal of Burn Care & Research.* 36(1):159-66.
50. Mandrycky C., Zongjie W., Keekyoung K., Deok-Ho K. (2015) 3D Bioprinting for engineering complex tissue. *Biotechnology Advances.* 34(4): 422–434.
51. Kumirska J, Mirko X., Czerwicka M, Kaczyski Z, Bychowska A, Krzysztof B, Thming J, and Stepnowski P. (2011). Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials. En: *Their Biomedical Activity.* Biomedical Engineering, Trends in Materials Science., Mr Anthony Laskovski (Ed.), ISBN: 978-953-307-513-6, InTech.
52. Chatelet, C. (2001). Influence of the Degree of Acetylation on Some Biological Properties of Chitosan Films." *Biomaterials.* 22(3):261-268

Correspondencia: Dr. Julio E. Valdivia-Silva MD, PhD.
E-mail: jvaldivias@utec.edu.pe