

Biobateragarria den biotinta baten garapena, 3D inprimaketa bidez, zauri kroniko *in vitro* eredu bat eratzeko

Lander Ruiz Pehaut

Farmazia Gradua

2024/25

AURKIBIDEA

1. SARRERA.....	1
2. HELBURUAK.....	6
3. METODOLOGIA.....	7
3.1.- 3D diseinua.....	7
3.2.- Biotintaren garapena.....	7
3.3.- Propietate erreologikoak.....	8
3.4.- Inprimaketa.....	8
3.5.- Karakterizazio fisiko-kimikoa.....	9
3.6.- Karakterizazio morfologikoa.....	9
3.7.- Ura xurgatzeko ahalmena eta iragazkortasuna.....	9
3.8.- Propietate mekanikoak.....	10
3.9.- Biobateragarritasuna.....	10
4. GARAPENA.....	11
4.1.- Propietate erreologikoak.....	11
4.2.- Inprimaketa.....	12
4.3.- Karakterizazio fisiko-kimikoa.....	13
4.4.- Karakterizazio morfologikoa.....	14
4.5.- Ura xurgatzeko ahalmena eta iragazkortasuna.....	15
4.6.- Propietate mekanikoak.....	16
4.7.- Biobateragarritasuna.....	19
5. ONDORIOAK.....	19
6. GARAPEN IRAUNKORRERAKO HELBURUAK.....	20
7. BIBLIOGRAFIA.....	21

LABURDUREN ZERRENDA

CAD: *Computer-aided design* (ordenagailuz lagundutako diseinua)

dECM: *Decellularized extracellular matrix* (deszelularizatutako matrize estrazelularra)

ECM: *Extracellular matrix* (matrize estrazelularra)

EMEM: *Eagle's minimum essential medium* (Eagle ezinbesteko gutxieneko medioa)

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Fourier-en transformatuaren espektroskopia infragorria)

GIH: Garapen iraunkorreko helburuak

HTS: *High-throughput screening* (errendimendu handiko baheketa)

PBS: *Phosphate-buffered saline* (fosfato gatz sistema)

PEG400: Polietilenglikol 400

PVA: Polibinil alkohola

ROS: *Reactive oxygen species* (oxigeno-espezie errektiboak)

SASP: *Senescence-associated secretory phenotype* (fenotipo seneszente jariatzailea)

SEM: *Scanning electron microscopy* (ekorketazko mikroskopio elektronikoa)

TPA: *Texture profile analysis* (ehundura-profilaren azterketa)

WVTR: *Water vapor transmission rate* (ur baporearen transmisio-abiadura)

XRD: *X-ray diffraction* (X-izpien difrakzioa)

LABURPENA

Zauri kronikoak osasun publikoko arazo larri bat bilakatu dira, beren prebalentzia handia eta eragin sozial zein ekonomikoengatik. Gaur egungo tratamenduak ez dira pazientearen egoera fisiopatologikora egokitzen eta, sarritan, entsegu-errorez aplikatzen dira, ospitalizazioak eta kostuak handituz. Arazo hori, entsegu aurrekliniko eta klinikoen arteko translazio faltari egozten zaio. Horregatik, 3D *in vitro* ereduak garatzen hasi dira, baino merkatuan dauden tintak, biobateragarriak izan arren, ez dute propietate mekaniko eta erreologiko egokirik erakutsi.

Hori dela eta, gradu amaierako lan honetan, soja proteina, txerri gelatina, PVA, PEG400 eta ura erabiliz, tinta berri bat garatu da. Inprimatzeko propietate proposak dituela baieztatzeko, tintaren propietate erreologikoak zehaztu dira. Datu horien arabera, tintaren inprimaketa gauzatu da, eta lagin horiekin, haien ezaugarriak sakonago ezagutzeko, karakterizazio fisiko-kimiko eta morfologikoak burutu dira. Halaber, ereduaren ur xurgatze ahalmena eta iragazkortasun balioak ezarri dira. Laginen propietate mekanikoak neurtu dira ere, inprimatu osteko egonkortasuna aztertzeko. Azkenik, biobateragarritasun entseguen bidez, zelulen bideragarritasuna egiaztatu da. Beraz, entsegu guzti hauekin, garaturiko tintaren biobateragarritasuna eta inprimatu osteko egonkortasuna ziurtatu dira, zauri kronikoetarako 3D *in vitro* eredu baten oinarri sendoa izan daitekeela baieztatuz.

1. SARRERA

Zauri kronikoen definizioa, prebalentzia eta kostu ekonomikoa

Zauri kronikoak orbaintze-prozesu fisiologikoan luzatzen diren lesioak dira, lau aste baino gehiagoko iraupena izaten dutenak (1). Gaitz heterogeneoak izanik, hainbat etiologia izan ditzakete, besteak beste: zain edo arteria zirkulazioaren disfuntzioa, diabetes mellitusa, mugikortasun-falta, bizkarrezur-muineko lesioak, faktore genetikoak, erradiazioaren eragina edota kausa immunologikoak (2).

Munduko biztanleriaren artean, etiologia anitzeko zauri kronikoen prebalentzia 1000 biztanleko 2,21 kasukoa dela kalkulatu da (3), eta aurreikuspenen arabera, mundu mailako biztanleriaren %1 eta %2 artean zauri kroniko bat pairatuko du bizitzan zehar (2). Estatu Batuetan, adibidez, *Medicare beneficiaries*-en (Estatu Batuetako osasun aseguru federalaren programaren) %16,3ak zauri kronikoren bat jasaten du; hau da, 10,5 milioi pertsona inguruk (4).

Zauri kronikoen ultzeren sailkapena, etiologiaren arabera egiten da, eta lau motatan banatzen dira: ultzera arteriala, ultzera diabetikoa, presiozko ultzera eta zainetako ultzera (5). Azpimarratzekoa da zauri mota hauen errekurrentzia-tasa nabarmen altua dela; esaterako, zainetako ultzera kronikoen kasuan, lehen urteko berrerortze-tasa %60 eta %70 artekoa da (6); bizkarrezur-muineko lesioa izan duten pazienteetan, presiozko ultzeren berrerortze-tasa %69rainokoa izan daiteke (7) eta oin diabetikoko ultzeretan berragerpen-tasa %60 ingurukoa da bost urteko epean (8). Gainera, azken honen ondorioz sorturiko anputazioak %31 dira (9), eta 5 urteko epean %40 eta %70 arteko heriotza-tasa izaten dute (10).

Era berean, zauri kronikoek osasun-sisteman kostu handiak sortzen dituzte; Espainian, adibidez, tratamenduen urteko batez besteko kostua 587 milioi euro ingurukoa da (11). Estatu Batuetako *Medicare beneficiaries*-en kasuan, zauri kronikoen kostua 28,1 eta 96,8 mila milioi dolar artean estimatu da (12). Erresuma Batuan egindako beste ikerketa batean, Galeseko zauri kronikoen prebalentzia %6-an finkatu zen, eta horrek osasun sistemaren %5,5eko gastua suposatu zuen (1). Australian berriz, urteko 3,5 mila milioi dolarreko inbertsioa suposatzen du urtero, eta horrek Australiako gobernuko osasunean gastuaren %2a suposatzen du (13). Azkenik, Europan, zauri kronikoen kostuek osasun aurrekontuaren %2a hartzen dute, eta eskandinaviar herrialdeetan, %2 eta %4 artekoa da portzentaje hori (1).

Pazientearen bizi-kalitateari dagokionez, gaitz honek eragin nabarmena du arlo fisikoan, emozionalean eta sozialean. Eguneroko jardueretan zailtasunak sortzen

dira, etengabeko mina, mugikortasun murriztua eta loaren nahasmenduak direla eta. Horrez gain, estresa, antsietatea, depresioa eta isolamendu soziala bezalako ondorio emozionalak ager daitezke, eta tratamenduaren kostuak zama ekonomiko esanguratsua suposatzen dute (2).

Honen harira, populazioaren zahartzea, mundu mailako diabetesaren eta obesitatearen etengabeko mehatxua eta infekzioaren arazo iraunkorra kontuan hartuta, espero da zauri kronikoek erronka kliniko, sozial eta ekonomiko garrantzitsua izaten jarraitzea (14).

Zauri kronikoen patofisiologia

Larruazalaren orbaintzea fase sekuentzial eta gainjarrien bidez gertatzen den prozesu dinamikoa da: hemostasia, hantura, ugaltzea eta birmoldaketa (15). Baldintza normaletan, zelula immunitarioek, fibroblastoek, keratinozitoek eta zelula endotelialek modu koordinatuan jarduten dute, haien seinaleztapen-bide desberdinen bidez ehunen osotasuna eta funtzionaltasuna berrezartzeko (16).

Hala ere, zauri kronikoetan ehunen konponketa-prozesua eten egiten da, eta zauria hanturaren fase luzatu batean geratzen da (17). Egoera honetan, nabarmentzekoa da fibroblasto dermikoaren seneszentzia zelularra; non zelulek beren ugalketa-, migratze- eta ehunen birsorkuntzarako funtsezko faktoreak jariatzeko gaitasuna galtzen duten (17). Zelula seneszente hauek, SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) deritzon sekrezio-profila garatzen dute, hantura eragiten duten zitokinak, proteasak eta zelulaz kanpoko matrizearen (ECM) birmoldaketa patologikoa sustatzen duten faktoreak askatuz. Ondorioz, hantura kronikoa mantendu egiten da eta ECM-ren egitura degradatzen da, ehunen konponketa-prozesua nabarmenki zailduz (18).

Bestalde, egoera honetan, immunitate-sistemaren desoreka bat gertatzen da, M1 fenotipoko makrofago proinflamatorioen nagusitasunarekin (19). Makrofago hauek, hanturaren aldeko zitokinak askatzen dituzte, eta horrek hantura egoera iraunkorra eragiten du (20). Zauriaren mikroingurunean sortutako aldaketa hauek, hainbat prozesu biologikotan eragiten dute. Izan ere, ingurune horretan, estres oxidatiboa handitzen da oxigeno-espezie errektiboan (ROS) ondorioz (17). Gainera, pH igoera batengatik, biofilmen sorrera errazten duten egoerak sortarazten dira, konpontze-prozesua gehiago zailduz (21).

Aldaketa guzti horiek, zelularen seinaleztapen-bide nagusien funtzionamendua oztopatzen dute, eta horrek eragotzi egiten du birepitelizazioa, angiogenesisia eta matrize estrazelularraren berreraikuntza (16).

Tratamenduak

Urteetan zehar, zauri kronikoen tratamendurako ingeleseko "T.I.M.E." (Ehunaren maneia, infekzio/hantura kontrola, hezetasun-balantzea eta ertz epitelialaren aurrerapena) akronimoaren jarraibideak erabili izan dira. Bertan, gaitzaren maneian garrantzitsuak diren atalak zehazten dira (22,23).

Hala ere, beste kontzeptu berri bat argitaratu da azken urteetan: "M.O.I.S.T." (Hezetasun-balantzea, oxigeno-balantzea, infekzioen kontrola, euskarri-estrategiak eta ehunen maneia), "T.I.M.E." eredua eguneratzen duena, medikuntzako aurrerapenak eta nazioarteko estandarrak kontuan hartuta. "M.O.I.S.T." printzipioen arabera, orbaintze-prozesua bizkortzeko funtsezkoa da giro hezea mantentzea, oxigeno-hornidura egokia bermatzea, infekzioak tokian bertan kontrolatzea, euskarri-estrategia berritzaileak aplikatzea eta ehuna modu egokian maneiatzea. Ikuspegi malgu honek ez du jarraibide sekuentzialik, eta pazientearen premia indibidualetara egokitzen da, tratamendu eraginkorrak planifikatuz eta konplikazioak sahiesten lagunduz (23).

Jarraibide horiek betetzeko, hainbat terapia eta material ezberdin erabili izan dira, hala nola: aposituak, hazkuntza-faktoreak, larruazaleko txertaketak, debridamendua, antibiotikoak, antiseptikoak, terapia fisikoak eta presio negatiboa. Hala ere, nahiz eta metodo konbentzional hauek azken hamarkadetako tratamenduen oinarri izan diren, haien eraginkortasuna mugatua izan da zauri kronikoetan. Arazo nagusiak berrinfekzioak, ehunaren sendatze desegokia, sendatze-prozesu motela eta tratamenduen kostu handiak izan dira (15). Bestalde, merkaturatutako 3000 aposito baino gehiagoren presentziak tratamendu estandarizatu, zehatz eta eraginkor bat ezartzea zailtzen du (24). Horren ondorioz, terapien eraginkortasuna entsegu-errore metodologiaren bidez baloratzen da; hau da, hainbat produktu probatu behar izaten dira pazientearen ezaugarri fisiologiko eta klinikoetara egokitzeke. Honek arazo handi bat sortarazten du osasun-sisteman, ospitaleratze-denborak luzatzen direlako eta, ondorioz, baliabideen kontsumoa eta profesionalen lan-karga areagotzen direlako. Guzti honek kostu ekonomikoak handitzeaz gain, tratamendu desegokiek konplikazioak eta berrospitaleratzeak eragin ditzakete, arazoa larriagotuz.

Hori dela eta, azken urteetan, estrategia berritzaileak aztertu dira, hala nola 3D bioinprimaketa, nanoteknologia, zelula amak, eta plaketa ugarioko plasma. Teknika horiek, bakarrik edo konbinatuta, orbaintzea bizkortzeko eta zauri konplexuen tratamendua hobetzeko aukera ematen dute. Hala ere, teknologia horiekin lotutako erronkak ikertzen ari dira, oraindik ez dagoelako erabateko orbaintzea ziurtatzen duen terapiarik, mekanismo zelular eta molekular ugari baitaude tartean (25).

Entsegu aurrekliniko ereduak

Garapen farmakologikoaren prozesuak baliabide eta denbora kopuru handia eskatzen duen prozesua da; izan ere, medikamentu berri baten garapenaren inbertsioa 2,8 mila milioi dolar inguruan balioztatu da (26) eta 12-15 urteetako iraupena du (27). Ikerketa faseetan, entsegu aurrekliniko (*In vitro*, *In vivo* eta animaliak) eta klinikoak (gizakiak) bereizten dira, farmakoaren eraginkortasun eta segurtasuna frogatzeko.

Historikoki, ordea, medikamentuen eraginkortasunaren baheketa eta toxikotasunaren ebaluazioa, 2D ereduko zelula-kultiboetan eta animalia-ereduetan oinarritu izan dira batez ere (28). Hala ere, 2D ereduko zelula-kultiboek giza fisiologia islatu arren, ezin dituzte 3D ingurunea eta izaki bizidunen konplexutasuna adierazi; animalia-ereduek erakusten dituzten kontrako ezaugarriak alegia. Gainera, entsegu aurreklinikoetan animalia-ereduak *gold standard* gisa erabiltzen diren arren, konposatu kimiko anitzen prozesamendu metaboliko desberdintasunek, mugatu egiten dituzte gizakietan frogatutako farmakoen egokitasuna (29). Izan ere, garapen etapetako 3. fasera iritsitako farmakoen %54-k ez dituzte entseguak gainditzen (30). Honen harira, 2024. urtean egindako meta analisi batek erakutsi du animalietan frogatutako terapia berrien %5-a soilik iristen dela erregulazio-onarpenera (31).

Porrot horiek, neurri handi batean, animalien eta gizakien arteko muga translazionalari atxikitu dira; askotan, eredu aurreklinikoek eta giza fisiologiak dituzten bateragarritasun mugatuari egozten zaizkienak. Ondorioz, posible da konposatu baliagarriak baztertuak izatea edo eraginkorrak ez diren eta toxikoak izan daitezkeen farmakoekin aurrera egitea (28). Testuinguru horretan, premiazkoa da esperimendu-eredu adierazgarriagok ezartzea, giza ingurune *in vivo*-a ahalik eta zehaztasun handienaz irudikatzeko. Horrek emaitzen fidagarritasuna hobetzea eta medikamentuen garapen-prozesuaren eraginkortasuna handitzea ahalbidetuko lukeelako.

3D bioinprimaketa

Egoera honetan, bioinprimaketa tridimentsionala (*3D bioprinting-a*) kokatzen da eta medikuntza birsortzailearen esparruko oinarrietako bat bilakatu da. Fabrikazio aditibo honek, aurrez definituriko diseinu digital batean oinarriturik (CAD; *computer-aided design*), biotintaren (biomaterialez eta zelulez osaturiko materialaren) kokatze espazial kontrolatu eta zehatza ahalbidetzen du. Horrela, egitura biologiko konplexu eta doiak sor daitezke, ehunen ingeniartzaren ohiko teknikek eskaini ezin dituzten konplexutasun-mailak lortuz (32). Hala ere, oraindik garapen-prozesuan dagoen teknologia da. Izan ere, biotintaren esparruan gainditu beharreko erronkak azaleratu dira. Gaur egun, oinarri gisa erabilitako materiala deszelularizatutako matrize estrazezularra (dECM) izan da. Nahiz eta biobateragarritasun handia eta ehunen ingurune naturalaren antzeko ezaugarriak eskaini, dECMak baditu zenbait muga, hala nola: biskositate txikia, propietate mekaniko eskasak, gelifikazio-prozesu motela eta formaren egonkortasunari eusteko zailtasunak (33). Horregatik, premiazkoa da biobateragarritasuna eta inprimagarritasunaren oreka lortuko duen eredu baten garapena.

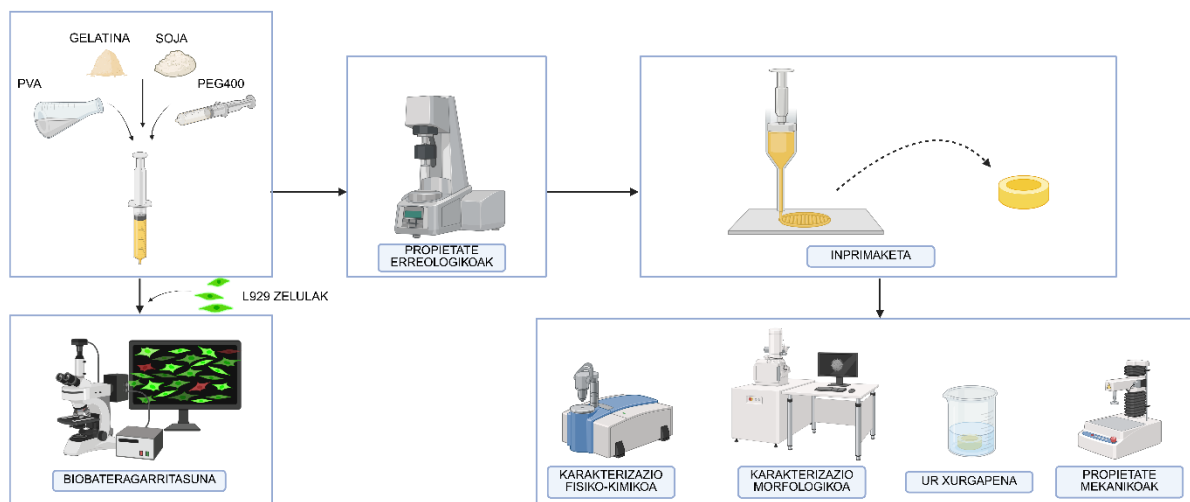
Ildo horretatik, 3D bioinprimaketa oso tresna baliotsua bihurtu da farmakoen garapenerako, giza ehunaren fisiologia 2D zelula-kultiboek eta animalia-ereduek baino modu adierazgarriagoan irudikatzen dituelako. Honek, *in vivo* emaitzen korrelazio handiagoa eskaintzen du, farmakoen eraginkortasun eta segurtasuna modu zehatzagoan ebaluatzea ahalbidetuz. Era berean, fabrikazio automatikoaren eta uniformetasun handiz erreproduzitzeko gaitasunak, errendimendu handiko baheketak (HTS, *high-throughput screening*) errazten ditu. Horri esker, industria farmazeutikoan garapen-prozesuak arindu eta kostuak nabarmen murriztu daitezke (34). Gainera, etorkizunari begira, teknologia honek potentzial handia du entsegu aurreklinikoetan animalia-ereduak ordezkatzeko, adierazgarriagoak diren *in vitro* ereduaren garapenengatik (35).

Beraz, zauri kronikoaren 3D *in vitro* eredu batek entsegu aurrekliniko eta klinikoen arteko emaitzen korrelazio baxuak hobetu ditzake, giza fisiologiaren ingurunea zehatzago irudikatuz. Horrez gain, errendimendu handiko baheketen bidez, terapien espezifikotasuna eta eraginkortasuna garatzeko aukera eskainiko luke, garapen-denborak eta kostu ekonomikoak murriztuz, eta, ondorioz, pazienteen ospitaleratze-denborak laburtuz.

Hala ere, merkaturatutako tintek, dECM-ak oinarri gisa dituztenak, biobateragarritasun handia izan arren, propietate erreologiko eta mekaniko eskasak erakutsi dituzte. Ondorioz, ez dira gai diseinaturiko ereduak zehaztasunez inprimatzeko, ezta haien egonkortasuna bermatzeko ere. Horregatik, ezinbestekoa da biobateragarritasuna eta inprimatzeko propietate egokiak bateratzen dituen tinta baten garapena, aurrez azaldutako arazoei irtenbidea emateko.

2. HELBURUAK

Gradu amaierako lan honen helburua, beraz, biobateragarritasun eta inprimagarritasun propietate egokiak uztartzen dituen biotinta bat garatzea da, 3D bidez inprimatutako zauri kronikoaren *in vitro* eredu bat sortzeko. Helburu hori lortzeko, tintak propietate erreologiko eta mekaniko egokiak izan beharko ditu, gaur egun merkatuan dauden tinten erronkei erantzuteko. Horretarako, lehenik eta behin, tintaren garapena eta haren karakterizazio erreologikoa burutuko dira, inprimaketarako egokiak diren propietate teorikoak lortu arte. Ondoren, karakterizazioaren bidez zehaztutako parametroak erabiliz, laginen inprimaketa egingo da. Jarraian, laginen karakterizazio fisiko-kimikoa, morfologikoa, ur-xurgatze ahalmena, iragazkortasuna eta propietate mekanikoak ebaluatuko dira, inprimatutako egiturek egonkortasun egokia dutela baieztatzeko. Azkenik, biobateragarritasun-saioen bidez, zelulen bideragarritasuna egiaztatuko da.



1. irudia: Proiektuko tintaren garapena eta egin beharreko entseguak. *Egileak egindako irudia BioRender erabiliz.

3. METODOLOGIA

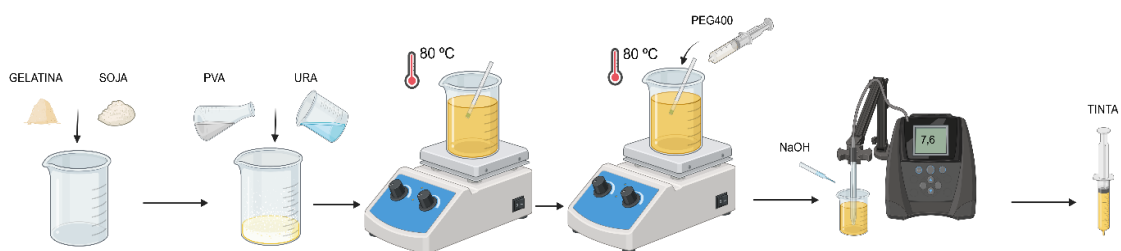
3.1.- 3D diseinua

Laginen 3D diseinua *Solid Edge* CAD softwarraren (Siemens Digital Industries Software, Ameriketako Estatu Batuak) bitartez garatu zen. Bertan, 20.0 mm x 20.0 mm x 3.0 mm-ko (luzera x zabalera x altuera) modelo sortu zen, barnealdean 10.0 mm diametroko eta 1.0 mm-ko altuerako zirkunferentzia bat zuena (5A eta 5B irudia). Eredu digital hori *Ultimaker-cura* 5.8.1 bertsio programara (Ultimaker, Herbehereak) transferitu zen, %100 *infill*-arekin, inprimagailuak irakur zezakeen fitxategia prestatu zezan. Sorturiko G-kodea, bioinprimaketarako makinaren eredu izango zen.

3.2.- Biotintaren garapena

Jarraian azaltzen diren kontzentrazioak, ikerketen ostean ondorioztatutako formulazio eraginkorrenari dagozkio, 30-40 tintari; beste tinta guztien proportzioak 1. Taulan irudikaturik ageri dira.

Lehendabizi, soja proteinaren 10 g (ADM, Ameriketako Estatu Batuak) eta txerri jatorriko gelatinaren 2 g (Sancho de Borja, Espainia) pisatu eta nahastu ziren hauspeakin ontzi batean. Ondoren, polibinil alkohol (PVA, 89,000-98,000 Da; Sigma-Aldrich, Alemania) eta polietilenglikol (PEG400, 400 Da; PanReac sintesis, Espainia) kontzentrazioen arabera ur kantitate ezberdinak erabili ziren. Formulazio eraginkorrenean 20 mL ur gehitu eta homogeneousatu ziren. Gero, %10 PVA zuen ur disoluzio baten 30 mL gehitu eta nahastu ziren. Jarraian, 80 °C-tan berotu eta nahasten jarraitu zen eta tapatuta utzi zen 30 minutuz (5-10 minuturo irekiz eta irabiatuz). Ondoren, 3,6 mL PEG400 gehitu ziren eta nahasten jarraitu zen beste 30 minutuz. Azkenik, pH-metroa (Crison Instruments, Espainia) erabiliz, 0,1 M den NaOH (PanReac AppliChem, Espainia) disoluzioaren tantatxoak gehitu zitzaizkion, 7,6 inguruko pH-a lortu arte. Ondoren, lorturiko biotinta 60 mL-ko *Luer-Lock* xiringetan bete eta izendatu ziren, hozkailu batean gordez 4 °C-tan.



2. irudia: Tintaren garapenaren pausoak. *Egileak egindako irudia BioRender erabiliz.

1. Taula: Aztertutako tinta guztien lehengaien kantitateak.

Tintaren izena	Soja proteina (g)	Txerri gelatina (g)	PVA % 10 disoluzioa (mL)	PEG400 (g)	H ₂ O (mL)
20-20	10	2	20	2	30
20-40	10	2	20	4	30
30-40	10	2	30	4	20
40-20	10	2	40	2	10
40-30	10	2	40	3	10
40-40	10	2	40	4	10

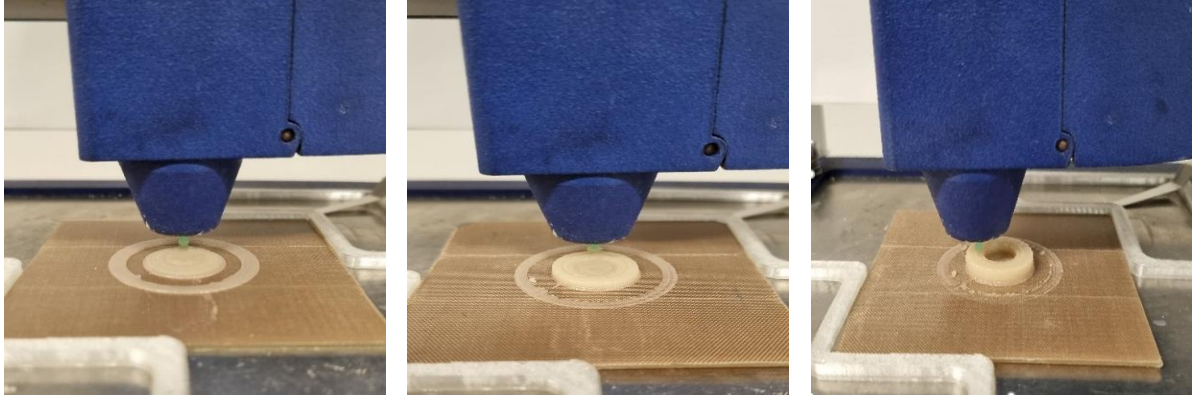
3.3.- Propietate erreologikoak

Tintaren likatasuna eta propietate erreologikoak Haake RheoStress1 erreometroa (Thermo Scientific, Espainia) erabiliaz zehaztu ziren. Neurketak 35 mm-ko plaka zerradun baten bidez gauzatu ziren, plaken arteko 1 mm-ko distantziarekin eta tinta bakoitzaren 0,5 mL erabiliaz entsegu bakoitzeko.

Deformazio ekorketa entsegua burutu zen 0,05 eta 1000 Pa bitartean 1 Hz-tan, deformazio eskualde biskoelastiko lineala zehazteko. Halaber, frekuentzia ekorketa egin zen 0,1 eta 100 Hz bitartean. Tenperaturaren eragina aztertu zen ere, 15 °C-tatik 45 °C-tara, 0,5 °C handituz minutuko, 0,01 γ -tan. Bestalde, 0,001 eta 100 s⁻¹ arteko ekorketak egin ziren, fluxu-kurbak lortzeko. Azkenik, berreskurapen proba burutu zen 10 segunduz 40 s⁻¹ ebakidura abiadura aplikatuz. Entsegu guztiak 30 °C-tan gauzatu ziren, (tenperatura entsegua izan ezik) inprimaketa egoera irudikatzeko. Era berean, entsegu guztiak hiru aldiz burutu ziren eta Origin Pro 2021 (OriginLab, Ameriketako Estatu Batuak) softwarraren bidez grafikatu ziren, laneko grafiko guztiak bezala.

3.4.- Inprimaketa

Egiturak 3D estrusiozko makina (Domobio 3D BIOprinter, Espainia) erabiliz inprimatu ziren. Horretarako, 4 °C-tan gordetako tinta 38 °C-ra zegoen labean (Jeio Tech, Japonia) berotu zen, eta ondoren 10 mL-ko *Luer-Lock* xiringa esteriletara transferitu zen. Transferentzia hau presiozko ponpa baten bidez egin zen, inprimatze-prozesuan burbuilen sorrerak ekiditeko. Tintarekin kargatutako xiringak makinan ezarri ziren, 33 °C-tan zegoena inprimatzerako garaian. Inprimakia 21 °C-tan zegoen tefloizko plaketan lagatu zen, G18 neurriko plastikozko punta batetik igarota 25mm/s-ko abiaduran.



3. irudia: Inprimaketaren garapen prozesu sekuentziala.

Inprimatutako ereduaren kontserbazio aproposa bermatzeko laginak liofilizatu egin ziren. Horretarako $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan biltegitatu ziren 24 orduz. Ondoren, ereduak liofilizatzailean (Christ, Alemania) ezarri ziren 24 orduz, $0,0035\text{ bar}$ presiopean eta $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ko tenperaturan.

3.5.- Karakterizazio fisiko-kimikoa

Karakterizazio fisiko-kimikoa Fourier-en transformatuaren bidezko espektroskopia infragorria (FTIR; Bruker, Alemania) erabiliz burutu zen, $4000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ uhin luzera konstantean giro tenperaturan. Neurketak egiteko islapen beiran liofilizatutako laginen eta lehengaien material kantitate txikiak ezarri ziren.

3.6.- Karakterizazio morfologikoa

Inprimakien barneko zein kanpoko egitura morfologikoa zehaztearren ekorketazko mikroskopia elektronikoa (SEM) egin zen. Horretarako, Hitachi S-4800 mikroskopia elektronikoa (Hitachi High-Technologies corporation, Japonia) erabili zen 15 kV -ko azelerazio boltaiarekin. Liofilizatutako laginak, hutseko argon atmosferan aztertu ziren.

Gainera, X-izpien difrakzioa (XRD) burutu zen. Difraktometroaren (Malvern Panalytical, Erresuma Batua) laguntzaz, erradiazioa igorri zen $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418\text{ \AA}$) 40 mA eta 40 kV jatorritik. Datuak 2θ (θ , inprimatutako laginaren X izpien sarrerako angelua da) baliotik jaso ziren 2° -tik 50° -ra.

3.7.- Ura xurgatzeko ahalmena eta iragazkortasuna

Laginen ur xurgatze gaitasuna eta degradazioa neurtu zen. Lehendabizi liofilizatutako laginak lehorrean pisatu (Precisa, Suitza) ziren eta hauspeakin ontzi batean estalita ezarri ziren 40 mL ur desionizatuarekin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan eta 20 rpm -ra inkubagailu batean (Labnet International, Espainia). Jarraian, laginen neurketa

periodikoak egin ziren orduro, ur gehigarria paper batekin erauziz. Neurtutako datuak ondorengo formularen (1. Ekuazioan) aplikatu ziren, ur hartzearen oreka-puntua zehazteko:

$$Ur\ xurgapena(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Non m_0 liofilizatutako laginaren hasierako masa den (lehorrean) eta m_t denbora zehatz bakoitzean neurturiko lagin hidratatuaren masa.

Laginen iragazkortasunaren neurketa PermeTM makinaren (Labthink, Txina) bidez egin zen %90 hezetasunarekin 38 °C-tan. Ur baporearen transmisio-abiadura (WVTR) ondorengo ekuazioaren bitartez kalkulatu zen:

$$WVTR \left(\frac{g}{s\ cm^2} \right) = \frac{G}{t \ x \ A} \quad (2)$$

non G pisu aldaketa (g) den, t denbora (s) eta A azalera (cm²).

3.8.- Propietate mekanikoak

Laginen proba mekanikoak TA.XT.Plus C Texture Analyser (Stable Micro Systems, Erresuma Batua) bidez egin ziren. Lagin guztiak ur hartze oreka-puntu burutu ziren eta tinta bakoitzeko hiru imprimaki erabili ziren. Konpresio entseguetan %10-eko deformazioa aplikatu zen 1 mm/s-ko 5 kg-ko kargarekin, indar maximoa eta Young modulua lortzeko. *Texture profile analysis* (TPA) frogan %10-eko deformazioa aplikatu zen 5 segunduz bi aldiz, aurreko parametro berdinetan, gogortasun eta kohesio parametroak eskuratzeko. Azkenik, mukoitsaskortasun froga gauzatu zen, %10 txerriko urdaileko muzina (Sigma-Aldrich, Alemania) duen disoluzio batean entsegu paper bat bustiz eta makinako oinarrian ezarriz. Gero, 0,2 N-eko indarra aplikatu zen 30 segunduz indar maximoa eta egindako lana zehazteko.

3.9.- Biobateragarritasuna

Biobateragarritasuna frogatzeko, liofilizatutako tintaren hautsaren 1 g, 4 mL medioan (*eagle's minimum essential medium*, EMEM) berrosatu zen. Jarraian, zelulak gehitu zitzaizkion (L929 fibroblastoak, 2,500,000 zelula/mL) biotinta sortzeko eta bi biobateragarritasun froga gauzatu ziren, bata biotinta eta medioa soilik eta bestea lagina inprimatu ostean. Ondoren, bi frogetako ereduak 0,125% kaltzeina/etidio homodimero eta 0,25% fosfato gatz indargetzaile (PBS) disoluzio batean murgildu ziren 30 minutuz. Ondoren, zelulak bistaratu ziren epifluoreszentiako Olympus CKX53 mikroskopia (Olympus, Txina) baten bidez, Olympus DP23M kamera

(Olympus, Txina) batekin. Argiztapen arrunteko eta fluoreszentiako irudiak bateratu ziren ImageJ eta Olympus Viewer softwareak (Olympus, Txina) erabiliz.

4. GARAPENA

4.1.- Propietate erreologikoak

Tinta baten propietate erreologikoen haren inprimagarritasuna eta egonkortasuna baldintzatzen dituzte. Proiektu honen helburua, aurretik definitua izan den bezala, tintaren barnealdean zelulak izango dituen eredu bat garatzea izan da, biobateragarria izateaz gain, inprimagarritasuna bermatuko duena eta propietate mekaniko egokiak izango dituen. Horretarako, garapen-prozesuan zehar, osagaien kontzentrazio ezberdinak probatu dira. Grafikoetan tinta bakarraren kurbak adierazi direnean, denek antzeko jokaera erakutsi dutelako izan da.

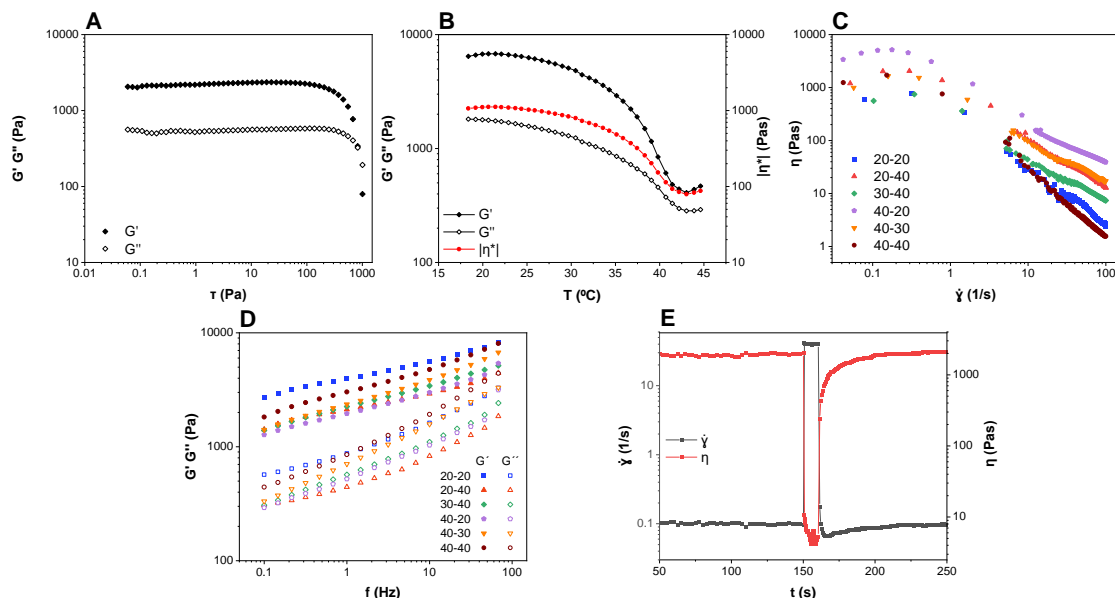
Lehendabizi eskualde biskoelastiko lineala determinatu zen (4A irudia) eta 0,01 γ -ko balioa hartu zen hurrengo saio erreologikoentzat, eskualde biskoelastiko linealaren barnean lan egiten dela bermatzeko. Ondoren, tenperatura ekorketa (4B irudia) egin zen eta pilatze-modulua (G'), materialaren portaera elastikoa adierazten duena, eta galera-modulua (G''), materialaren portaera likatsua adierazten duena, aztertu ziren. $G' > G''$ denean, materialak gel baten portaera izango du; $G'' > G'$ denean, berriz, materialak likido baten jokaera izango du (36). Inprimagarritasun egokia eta inprimatu osteko egonkortasuna izatearren, gel baten propietateak izatea beharrezkoa da. Ekorketa guztian zehar $G' > G''$ mantentzen denez, prozesu guztian zehar tintak gel izaera duela ziurtatzen da. Gainera, tenperatura igotzean, likatasuna jaisten da, hau da, tintek deformazio-mehaketa portaera erakusten dute eta propietate hori bilatzen da. Izan ere, tintak likatasun handiegia balu, inprimatze-puntatik igarotzean presio handiak sortuko lirateke, eta horrek inprimaketa zailduko luke. Gainera, zelulak izango balitu, presio horiek zelulak kaltetzeko arriskua handituko lukete. Ondorioz, inprimaketarako tenperatura 33 °C-tan zehaztu zen.

4C irudiari dagokionez, likatasuna eta ebakidura abiadura erlazionatzen dituen grafiko bat azaltzen da. Bertan ikusi daiteke ebakidura abiadura handiagoetan, likatasunaren murrizpen bat ematen dela; beraz, tintek material pseudoplastiko gisa jokatzen dute. Datu hauek inprimagarritasunaren ikuspegitik oso onuragarriak dira, erakusten baitute indar bat aplikatzean fluidoaren likatasuna jaisten dela eta, horri esker, tinta errazago igarotzen dela inprimatze-puntatik. Bestalde, tinta

guztiek jokabide bera erakusten dute eta ez dago desberdintasun esanguratsurik haien artean.

Frekuentzia ekorketan (4D irudia) G' eta G'' -ren aldaketak erakusten dira frekuentzia ezberdinetan. Berrero ere, materialaren gel izaera berresten da, indar eremu guztian zehar $G' > G''$ delako. Ondorioz, materialaren inprimatu osteko egitura egonkorra dela adierazten da. Gainera, bi moduluen igoera bat ikusten da, tintak deformazioekiko erresistentzia handia dutela adieraziz.

Azkenik, tintaren berreskurapen entseguak (4E irudia) egin ziren, inprimatu osteko ezaugarri erreologikoak aztertzeko. Bertan, 10 segunduz 40 s^{-1} -eko ebakidura abiadura bat aplikatzerakoan, tintaren likatasunaren murrizpena agertzen da. Hala ere, ebakidura abiadura aplikatzeari uztean, bere hasierako likatasunera iristen da eta %100 berreskurapena du. Honek, inprimaketa egoera simulatzen du, izan ere, tinta inprimagailuko puntatik pasatzean, ebakidura abiadura handia jasaten du. Horregatik, entsegu honen bidez egiaztatu da tintak aurreko frogetan erakutsitako ezaugarri erreologikoak mantentzen dituela, eta inprimatu ondoren materialak forma mantentzen duela, guztizko berreskurapena erakutsi duelako.

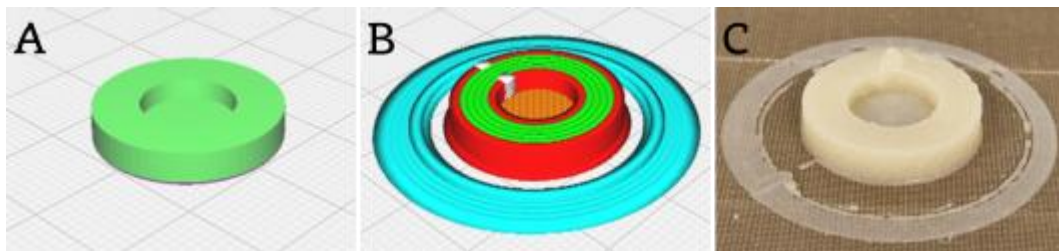


4. irudia: Erreologia entseguko grafikoak. A: Deformazio ekorketa. B: Tenperatura ekorketa. C: Ebakidura ekorketa. D: Frekuentzia ekorketa. E: Berreskurapen entsegua.

4.2.- Inprimaketa

Propietate erreologikoek egiaztatu zuten bezala, tintek oso inprimagarritasun ona erakutsi zuten, laginaren diseinu digitaleko eredu oso fidel eta errepikakorrek

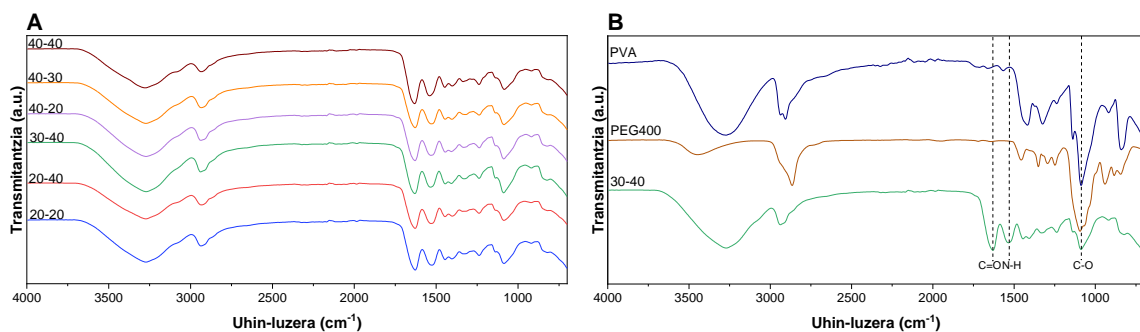
inprimatzea lortu zirelako (5C irudia). 5. Irudian ikusten den bezala, inprimakiak oso antzekoak ziren hasieran ezarritako ereduarekiko (5A eta 5B irudiekiko). Gainera, inprimatze makinak ez zuen arazorik azaleratu; beraz, tintaren jariakortasuna baieztatu zen.



5. irudia: A: Solid Edge-ean sorturiko konstruktua. B: Ultimaker-cura aplikazioko laginen garapenerako jarraibideak. C: Inprimatutako lagina.

4.3.- Karakterizazio fisiko-kimikoa

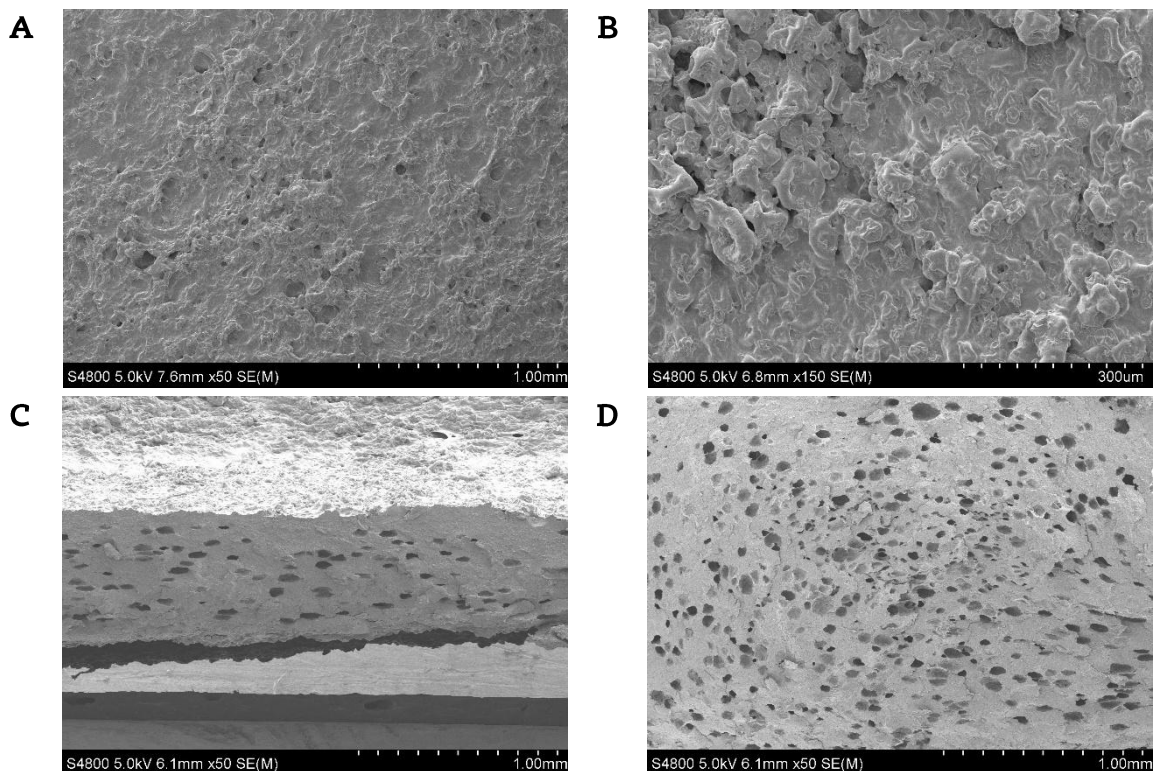
FTIR espektroen bitartez (6A Irudia) baieztatu zen kontzentrazio ezberdineko tinten artean ez zegoela desberdintasun nabaririk. 6B irudiko grafikoari dagokionez, tinta eraginkorrenaren (30-40) FTIR espektroa agertzen da, beste lehengaien espektroekiko alderaturik. Bertatik ondorioztatu daiteke, tintaren lehengaien arteko elkarrekintzak fisikoak izan zirela, PVA eta PEG400 gailurrak tintan ageri direlako. PVA-ren C-O (alkoholaren) loturak $\sim 1080-1140 \text{ cm}^{-1}$ uhin luzeran eta PEG400-ren C-O (eter) loturak $\sim 1110 \text{ cm}^{-1}$ uhin luzeran agertzen dira. $1700-1500 \text{ cm}^{-1}$ uhin luzeretan agertzen diren gailurrak proteina kateetan dauden amida loturei dagozkie, soja eta txerri gelatinarenak. 6B irudiko grafikoan zehaztu diren bezala, C=O lotura $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$ -tan zehaztu da eta hori amida I loturari dagokio. Amida II lotura berriz, N-H bibrazioek sortzen dituzte eta $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ inguruan agertzen da (37). Gailur berrien sorrerak, interakzio kimikoen ondorioz sorturiko konposatu berri baten adibidea izango litzateke, baina grafikoa aztertuz, onartu daiteke soilik lehengaien talde polarren arteko hidrogeno zubien interakzioak eman direla.



6. irudia: FTIR espektroak. A: Tinta guztien FTIR espektroak. B: 30-40 tintaren, PVA-ren eta PEG400-aren FTIR espektroak.

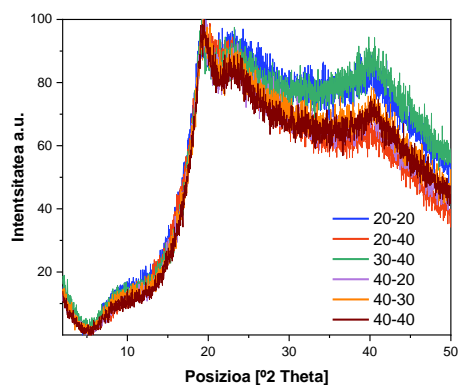
4.4.- Karakterizazio morfologikoa

SEM azterketaren bitartez (7. irudia), laginen gainazaleko (7A eta 7B) eta zeharkako sekzioko irudiak (7C eta 7D) ikusten dira. 7A irudian, inprimatutako ereduaren erdigunea zimurtsua dela erakusten da. Hori, baliagarria izan daiteke etorkizun bateko terapien frogapenerako, tratamenduak bertan ezartzeko ahalmena erraztuko luketelako. 7B atalean berriz, soja proteina globulararen egitura antzematen da. 7C irudian laginaren erdiguneko zeharkako sekzioa erakusten da eta aurretik aipaturiko alde zimurtsua ikusten da goikaldean. Barnekaldean aldiz, laginean daude poroak agertzen dira. 7D irudian, laginaren ertzetik aterako zeharkako sekzioa erakusten da eta bertan poroak oso ugariak dira. Poro hauek baliagarriak izan daitezke zelulen itsaspenerako eta uraren edo medioaren hartzea erraztu dezakete.



7. irudia: SEM irudiak. A: ereduaren erdiguneko gainazala. B: ereduaren erdiguneko gainazala anplifikatuago. C: ereduaren erdiguneko zeharkako sekzioa. D: ereduaren alboko zeharkako sekzioa.

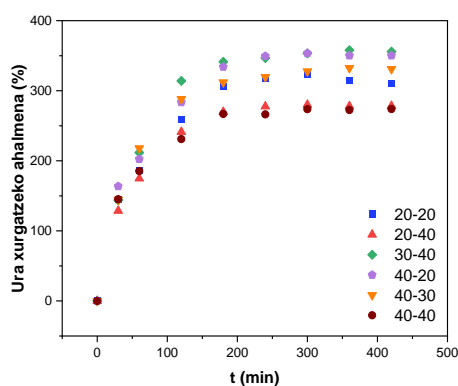
XRD frogan ereduaren morfologia amorfoa dela zehaztu zen, ez direlako gailur definituak zehazten, egitura kristalino baten isla izango litzatekena. Gainera, eredu guztiek antzeko jokabidea erakutsi zuten eta ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkeztu, 8. irudian ikusten den bezala.



8. irudia: XRD grafikoak ereduaren formulazioaren arabera.

4.5.- Ura xurgatzeko ahalmena eta iragazkortasuna

Ura xurgatzeko ahalmen entseguan liofilizatuta zeuden laginen ur hartze ahalmena ebaluatu zen. Neurtze sistematikoen bitartez, denbora ezberdinetan zehar uretan 37 °C-tan zeuden laginak pisatu eta haien hasierako pisuarekin alderatu ziren. 9. irudiko grafikoko datuak aztertuz, ikusi zen batez beste haien hasierako pisua laukoizten zutela. Beraz, emaitzei erreparatuz, egokiak direla esan daiteke, laginak inkubazio medio batean jartzerakoan haren xurgapena bermatuko dutelako, zelulen biziraupena sustatuz. Halaber, oreka puntua hiru ordutan lortu zuten, xurgatze abiadura azkarra adieraziz. Datu hauek, gainera, aurreko SEM entseguan poroek izan zezaketen funtzioari buruz egindako suposizioa onartzen dute.



9. irudia: Ura xurgatzeko ahalmena ereduaren formulazioaren arabera.

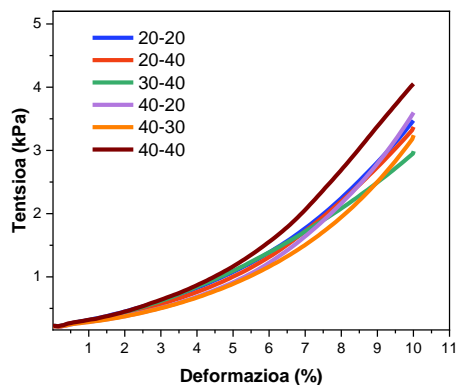
Bestalde, iragazkortasuna funtsezkoa da zauri kronikoetan, oxigeno-fluxua bermatzeko, exudatua kanporatzeko eta biofilmen sorrera saihesteko. Ikerketen arabera, 840-2500 g/m² 24 h arteko WVTR balioak egokiak dira hezetasun handiko zaurientzat (38). Lan honetan, 1506 g/m² 24 h-ko batz besteko WVTR balioak neurtu ziren, iragazkortasun balio eraginkorrak erakutsiz.

4.6.- Propietate mekanikoak

Tintaren garapenerako erabilitako materialak, biobateragarriak izanik ere, propietate mekaniko egokiak eduki behar dituzte, inprimatu ostean egitura egonkor eta funtzionalak osatzeko. Horretarako, txerri jatorriko gelatina egitura euskarri gisa erabili zen, tintak likatasun eta propietate erreologiko egokiak izan zitzaizkien. Soja proteinaren eginkizuna inprimagarritasunari lotuta zegoen, izan ere, proteina globularra izanik, tintari beharrezkoak ziren propietate mekaniko osagarriak eskaini zizkion. Ondorioz, tinta inprimatzerakoan, geruzaz geruza eraikiz, konstruktua sendoa osatzeko gaitasuna erakutsi zuen, aurreko entsegu batzuetan soja gabe ezin izan zena lortu. PVA eta PEG400-ren funtzioak, berriz, laginak inprimatu osteko egonkortasunari eta mantentze-ezaugarri biologikoei zegozkien. Biotintek barnealdean zelulak edukiko zituztenez, inkubagailuan, 37 °C-tan eta kultura medioan, egonkor mantendu behar ziren. PEG pisu molekular ezberdinekin egindako probetan, ikusi zen lagin solidoena eta egonkorrena PEG400-arekin izan zela, beste hiru lehengaiekin sorturiko sare tridimentsionalean elkarrekintza fisiko sendoak ezartzeko gaitasuna erakutsi zuelako.

Konpresio entseguetan ikusten da deformazioa handitzean laginaren erresistentzia handitzen dela (10. Irudia) eta horrek materialaren izaera elastikoa adierazten du. Ondorioz, inprimatu osteko sendotasuna erakustez gain, barne egitura solido baten isla da. Bestalde, konpresio datuei dagokienez (2. Taula), ez da desberdintasun esanguratsurik azaldu tinta ezberdinen artean.

Bestalde, Young modulua material baten zurruntasuna adierazten duen parametroa da, eta aplikatutako tentsioaren eta sortutako deformazioaren arteko erlazioa neurtzen du. Beraz, materiala zenbat eta zurrunagoa izan, orduan eta handiagoa izango da Young-en modulua. Kasu honetan, helburua giza dermisaren antzeko Young-en moduluak lortzea zen, 0,1 eta 10 kPa artekoak, eta tintek oso antzekoak diren emaitzak erakutsi dituzte, dermisaren antzekotasun handia erakutsiz (39).

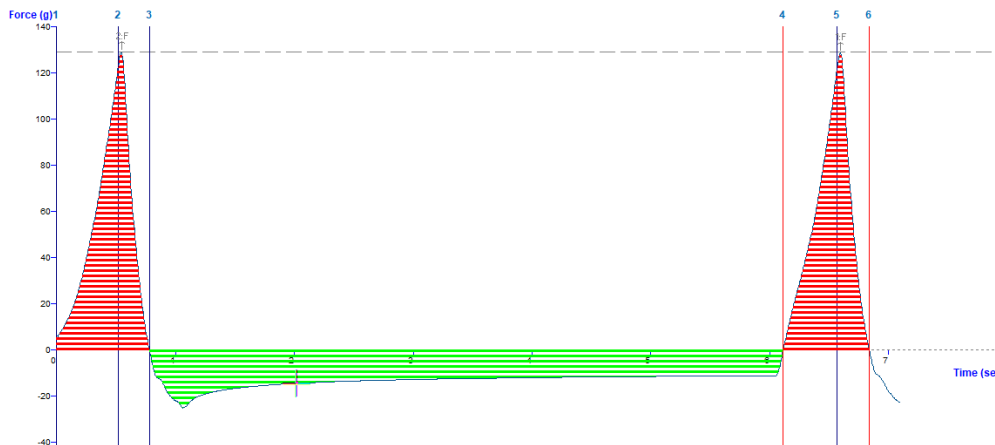


10. irudia: Konpresio entseguko grafikoak ereduaren formulazioaren arabera.

2. taula: Batz besteko indar maximoa eta Young modulua ereduaren formulazioaren arabera.

Eredua	Indar maximoa (g)	Young modulua (kPa)
20-20	99	15,5
20-40	102	12,2
30-40	91	7,7
40-20	104	8,9
40-30	93	8,9
40-40	110	10,8

TPA entseguetan, %10-eko deformazioa bi aldiz aplikatu zen. 11. irudian ikus daitekeen bezala, azalera gorriko bi gailurrek materialak jasandako indar maximoa adierazten dute (gogortasuna), gramotan neurtuta. Honek adierazten du materialak indar bera bi aldiz jasotzean, bere hasierako formara itzultzeko gaitasuna duela, barne egitura kaltetu gabe. Hau da, bi deformazio-ziklotan zehar, laginak antzeko erresistentzia-maila mantentzen du. Eragin hau datuetan frogatzeko, bigarren azalera gorria (4-6 tarteetako azalera gorria) lehendabiziko deformazio azalerarekin (1-3 tarteetako azalera gorria) zatitu zen eta kohesio datuak eskuratu ziren. 3. taulan irudikatu denez, formulazio ezberdineko eredu guztiek, 1 inguruko kohesio baloreak erakusten dituzte; hau da, ia %100 berreskurapen mekanikoa. Gainera, indar maximoak antzekoak izan ziren eta ez ziren desberdintasun esanguratsurik agertu haien artean. Bestalde, irudian agertzen den azalera berdea (3-4 tartearen artekoa), materialaren itsaskortasuna adierazten du. Izan ere, indarra aplikatzean materialak itsaskortasun-portaera erakutsi zuen, eta hori oso interesgarria da produktu hau zuzenean azalean aplikatzeko.

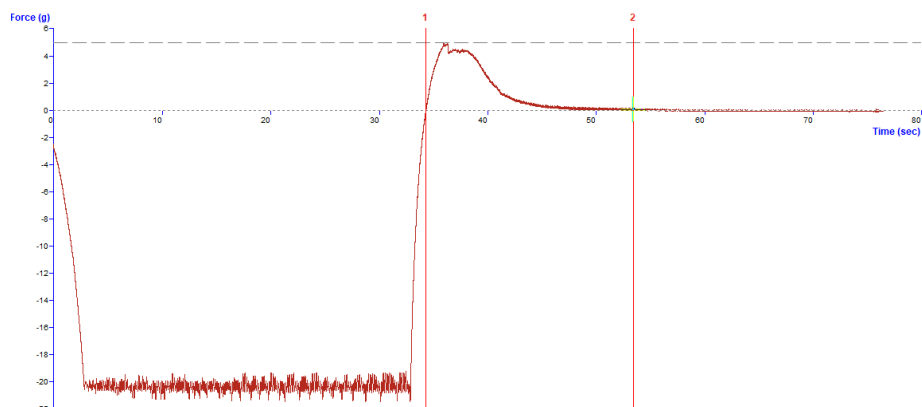


11. irudia: TPA entseguko kurba.

3. Taula: Bataz besteko gogortasuna eta kohesio balioak ereduaren formulazioaren arabera.

Eredua	Gogortasuna (g)	Kohesioa
20-20	113	0,964
20-40	114	0,965
30-40	113	0,955
40-20	118	0,998
40-30	106	0,999
40-40	102	0,915

Propietate mekanikoen azkenengo entseguan, mukoitsaskortasun frogak egin ziren. Bertan, txerri muzin disoluzio batez bustirik zegoen paper batean lagina ezarri zen, 30 segunduz 0,2 N-eko indarra aplikatuz. 12. irudian ikusten den bezala, indarra aplikatu ostean, laginak indar gailur maximo bat adierazi zuen. Gailur hori, lagina paperetik bereizteko behar zuen indar maximoa da eta ondoko azalera guztiz desitsasteko egin behar den lana da. Emaitzak oso esanguratsuak izan ziren, materialaren itsaskortasun-portaera onuragarria delako apositu eta tratamendu ezberdinak testatzeko. Datu guzti hauek 4. taulan adierazita daude eta ez dira desberdintasun nabarmenak ikusten ereduaren artean.



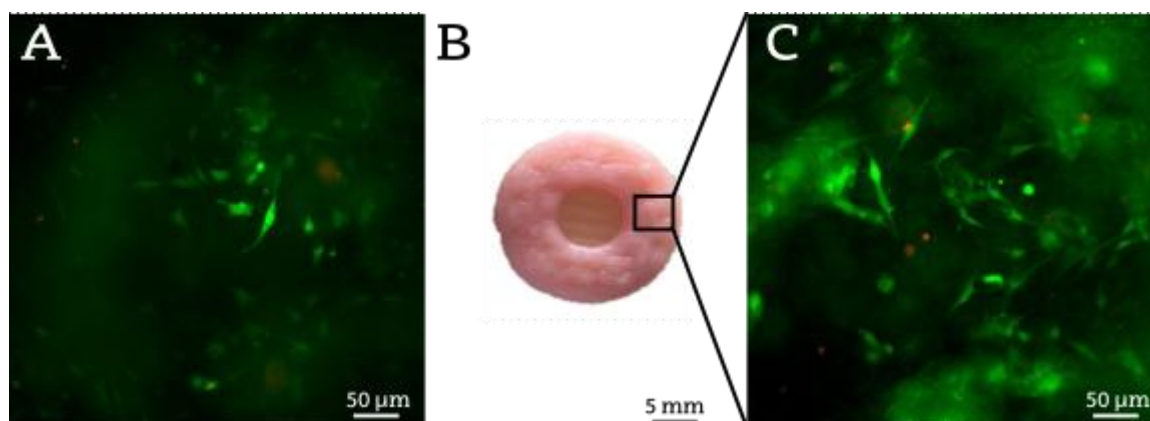
12. irudia: Mukoitsaskortasun entseguko kurba.

4. taula: Bataz besteko indar maximoa eta lana erduen formulazioaren arabera.

Eredua	Indar maximoa (g)	Lana 10 ⁵ (J)
20-20	4,1	2,97
20-40	5,5	2,89
30-40	3,8	2,01
40-20	4,3	2,26
40-30	3,3	2,18
40-40	3,6	2,70

4.7.- Biobateragarritasuna

13A irudian ikusten da biotinta eta kultura medioa biobateragarriak direla zelulentzako. Izan ere, berdeak ageri diren zelulak fibroblastoei dagozkielako eta haien forma luzangak egonkortasun egoera baten isla direlako. Gainera, ia ez dira eremu gorriak bereizten, zelulen heriotza irudikatuko lituzketenak. Bestalde, estrusio-prozesuan zehar zelulek presio handiak jasaten dituzte, zelula batzuen heriotza suposatuz. 13C irudian ikusten den bezela, zelula batzuk hiltzen diren arren (seinale gorriak), inprimatu osteko LIVE/DEAD testean batez ere zelula biziak (seinale berdeak) ikusten dira. Gainera, 13B irudiak erakusten du biotinta inprimagarria dela zelulekin, eta diseinatutako egitura behar bezala inprima daitekeela. Horrek adierazten du bioinprimaketarako hautatutako parametroek zelulen biziraupena egokia bermatzen dutela, esperimentuko helburuetan jasotako baldintzak betez.



13. irudia: A: Tinta eta medioaren biobateragarritasun entsegua. B: Zelulekin inprimatutako lagina C: Lagina inprimatu osteko biobateragarritasun entsegua.

5. ONDORIOAK

Proiektu honetan garatutako tintek biobateragarritasun eta inprimagarritasun propietate egokiak erakutsi dituzte. Izan ere, tinta horiek propietate erreologiko aproposak dituztela frogatu dira, eta horrek inprimagarritasuna bermatzeaz gain, formulazioan erabilitako osagaien kontzentrazioa egokia dela adierazten du. Inprimatutako laginek, gainera, erreplikagarriak eta forma uniformeak izan dute,

egituraren egonkortasuna eta prozesuaren fidagarritasuna berretsiz. Bestalde, karakterizazio fisiko-kimikoak tintaren osagaien arteko elkarrekintzak fisikoak direla frogatu ditu eta karakterizazio morfologikoak ereduaren egitura porotsua erakutsi du. Era berean, ura xurgatzeko ahalmena eta iragazkortasuna ebaluatu dira, eta lortutako emaitzak definituriko aplikaziorako onuragarritzat jo dira. Bestalde, propietate mekanikoez erakutsi dute inprimatutako ereduak sendoak eta egonkorak direla, hasieran identifikatutako erronka teknikoa gainditu dela egiaztatuz. Azkenik, biobateragarritasun entseguek zelulen bideragarritasuna erakutsi dute, baieztatuz lan honen helburu nagusiak bete direla.

6. GARAPEN IRAUNKORRERAKO HELBURUAK

Gradu amaierako lan honen garapenak, 2030 agendan Nazio Batuen Erakundeek zehaztutako Garapen Iraunkorrerako Helburuekin (GIH) bat egiten du. Proiektu honen bidez, ikerketa zientifikoa garatzeaz gain, gizartearen, ingurumenaren eta osasunaren aldeko ekarpena islatu nahi izan da. Horregatik, egindako lanak hainbat GHI-ekin bat egiten du (40).

Lehenik eta behin, osasuna eta ongizatearen oinarriekin (3. GIH) bat egiten du. Izan ere, zauri kroniko *in vitro* eredu baten garapenak, entsegu aurrekliniko eta klinikoan arteko korrelazioa handitzea du helburu, terapia eta egungo tratamenduen eraginkortasuna hobetzeko. Ondorioz, eragin zuzena edukiko luke pazienteetan, haien ospitaleratze-denborak murriztuko liratekeelako eta osasun-gastua txikiagoa izango litzatekelako.

Honen harira, proiektua berdintasunaren eta diskriminazio ezaren printzipioetan oinarrituta diseinatu da (10. GIH), pertsona guztiek; jatorria, egoera pertsonala edo gizarte-egoera edozein izanik ere, teknologia hau eskuratu eta baliatu ahal izatea bermatzeko.

Era berean, iraunkortasunaren ikuspegitik (12. eta 13. GIH), terapia eraginkorren garapenak, ingurumen-inpaktua txikitzen lagunduko lukete, bereziki osasun-materialaren eta hondakin kopuruaren murrizketa nabarmenari esker. Gainera, erabilitako proteinak elikagai industriaren hondakinen eratorriak izanik, ekonomia zirkularra sustatuko lukete, hondakin klinikoan tratamendutik eratorritako emisioak gutxituz.

Halaber, osasunaren eta ingeniartzaren arteko lankidetzaren sustatzen da (17. GIH). Eredu hauek, tratamendu eraginkorragoak garatzeko baliagarriak direlako, pazientearen ongizatea eta osasun-sistemaren jasagarritasuna hobetuz.

Azkenik, etika eta oinarrizko eskubideen ikuspegitik (15. GIH), animalia-ereduen entseguak ordezkatu ditzakeen proiektu bat izanik, aurrerapen nabarmen bat izango litzateke etikaren ikuspegitik. Gainera, perspektiba horretatik, 3R printzipioekin bat egingo luke, animalien esperimendazioaren ordezkapena, murrizketa eta hobekuntza sustatuz (41).

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Graves N, Phillips CJ, Harding K. A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds. *Br J Dermatol.* 2022-ko abuztua; 187(2):141-8.
- 2) Falanga V, Isseroff RR, Soulika AM, Romanelli M, Margolis D, Kapp S, et al. Chronic wounds. *Nat Rev Dis Primer.* 2022-ko uztaila; 8(1):50.
- 3) Martinengo L, Olsson M, Bajpai R, Soljak M, Upton Z, Schmidtchen A, et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol.* 2019-ko urtarrila; 29:8-15.
- 4) Carter MJ, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, Cartwright D, Fife CE. Chronic wound prevalence and the associated cost of treatment in Medicare beneficiaries: changes between 2014 and 2019. *J Med Econ.* 2023-ko Abendua; 26(1):894-901.
- 5) Bowers S, Franco E. *Chronic Wounds: Evaluation and Management.*
- 6) Probst S, Allet L, Depeyre J, Colin S, Buehrer Skinner M. A targeted interprofessional educational intervention to address therapeutic adherence of venous leg ulcer persons (TIEIVLU): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2019-ko Abendua; 20(1):243.
- 7) Tsai YJ, Lin CH, Yen YH, Wu CC, Carvajal C, Molte NF, et al. Risk factors for pressure ulcer recurrence following surgical reconstruction: A cross-sectional retrospective analysis. *Front Surg.* 2023-ko martxoa; 10:970681.
- 8) Ogurtsova K, Morbach S, Haastert B, Dubský M, Rümenapf G, Ziegler D, et al. Cumulative long-term recurrence of diabetic foot ulcers in two cohorts from centres in Germany and the Czech Republic. *Diabetes Res Clin Pract.* 2021-ko otsaila; 172:108621.
- 9) Luo Y, Liu C, Li C, Jin M, Pi L, Jin Z. The incidence of lower extremity amputation and its associated risk factors in patients with diabetic foot ulcers: A meta analysis. *Int Wound J.* 2024-ko uztaila; 21(7):e14931.
- 10) Sharma A, Shankar R, Yadav AK, Pratap A, Ansari MA, Srivastava V. Burden of Chronic Nonhealing Wounds: An Overview of the Worldwide Humanistic and Economic Burden to the Healthcare System. *Int J Low Extrem Wounds.* 2024-ko apirila; 15347346241246340.

- 11) Díaz-Herrera MÁ, González-Durán M, Rodríguez-Martínez FJ, Tujillo-Flores G, Tuset-Mateu N, Verdú-Soriano J, et al. The financial burden of chronic wounds in primary care: A real-world data analysis on cost and prevalence. *Int J Nurs Stud Adv*. 2025-eko ekaina; 8:100313.
- 12) Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, et al. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value Health*. 2018-ko urtarrila; 21(1):27-32.
- 13) McCosker L, Tulleners R, Cheng Q, Rohmer S, Pacella T, Graves N, et al. Chronic wounds in Australia: A systematic review of key epidemiological and clinical parameters. *Int Wound J*. 2019-ko otsaila; 16(1):84-95.
- 14) Sen CK. Human Wound and Its Burden: Updated 2022 Compendium of Estimates. *Adv Wound Care*. 2023-ko urtarrila; 12(12):657-70.
- 15) Mamun AA, Shao C, Geng P, Wang S, Xiao J. Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. *Front Immunol*. 2024-ko maiatza; 15:1395479.
- 16) Bonnici L, Suleiman S, Schembri-Wismayer P, Cassar A. Targeting Signalling Pathways in Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2023-ko abendua; 25(1):50.
- 17) Pastar I, Balukoff NC, Marjanovic J, Chen VY, Stone RC, Tomic-Canic M. Molecular Pathophysiology of Chronic Wounds: Current State and Future Directions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2023-ko apirila; 15(4):a041243.
- 18) Samdavid Thanapaul RJR, Shvedova M, Shin GH, Crouch J, Roh DS. Elevated skin senescence in young mice causes delayed wound healing. *GeroScience*. 2022-ko ekaina; 44(3):1871-8.
- 19) Nassiri S, Zakeri I, Weingarten MS, Spiller KL. Relative Expression of Proinflammatory and Antiinflammatory Genes Reveals Differences between Healing and Nonhealing Human Chronic Diabetic Foot Ulcers. *J Invest Dermatol*. 2015-ko ekaina; 135(6):1700-3.
- 20) Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008-ko abendua; 8(12):958-69.
- 21) Ho tacká A, i nár I, tefkovi ová M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010-ko urtarrila; 55(1):75-8.
- 22) Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen* [Internet]. 2003-ko martxoa [citado 4 de junio de 2025-eko ekainaren 4-ean zitatua]; 11(s1). Eskuragarri: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1524-475X.11.s2.1.x>

- 23) Dissemond J, Chadwick P, Weir D, Alves P, Isoherranen K, Lázaro Martínez JL, et al. M.O.I.S.T. Concept for the Local Therapy of Chronic Wounds: An International Update. *Int J Low Extrem Wounds*. 2024-ko apirila; 15347346241245160.
- 24) Las Heras K, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions. *J Controlled Release*. 2020-ko abendua; 328:532-50.
- 25) Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AAA, Dudhipala N. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*. 2022-ko abuztua; 11(15):2439.
- 26) DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ*. 2016-ko maiatza; 47:20-33.
- 27) Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimers Dement Transl Res Clin Interv*. 2017-ko azaroa; 3(4):651-7.
- 28) Mallya D, Gadre MA, Varadharajan S, Vasanthan KS. 3D bioprinting for the construction of drug testing models-development strategies and regulatory concerns. *Front Bioeng Biotechnol*. 2025-eko otsaila; 13:1457872.
- 29) Pagnotta G, Kalia S, Di Lisa L, Cicero AFG, Borghi C, Focarete ML. Progress towards 3D bioprinting of tissue models for advanced drug screening: In vitro evaluation of drug toxicity and drug metabolism. *Bioprinting*. 2022-ko abuztua; 27:e00218.
- 30) Hwang TJ, Carpenter D, Lauffenburger JC, Wang B, Franklin JM, Kesselheim AS. Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. *JAMA Intern Med*. 2016-ko abendua; 176(12):1826.
- 31) Ineichen BV, Furrer E, Grüniger SL, Zürcher WE, Macleod MR. Analysis of animal-to-human translation shows that only 5% of animal-tested therapeutic interventions obtain regulatory approval for human applications. Boutron I, editor. *PLOS Biol*. 2024-ko ekaina; 22(6):e3002667.
- 32) Liang K. Tissue Bioprinting: Promise and Challenges. *Bioengineering*. 2023-ko abendua; 10(12):1400.
- 33) Zhang H, Wang Y, Zheng Z, Wei X, Chen L, Wu Y, et al. Strategies for improving the 3D printability of decellularized extracellular matrix bioink. *Theranostics*. 2023; 13(8):2562-87.
- 34) Yang K, Wang L, Vijayavenkataraman S, Yuan Y, Tan ECK, Kang L. Recent applications of three-dimensional bioprinting in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2024-ko azaroa; 214:115456.

- 35) Shopova D, Yaneva A, Bakova D, Mihaylova A, Kasnakova P, Hristozova M, et al. (Bio)printing in Personalized Medicine—Opportunities and Potential Benefits. *Bioengineering*. 2023-ko otsaila; 10(3):287.
- 36) Budai L, Budai M, Fülöpné Pápay ZE, Vilimi Z, Antal I. Rheological Considerations of Pharmaceutical Formulations: Focus on Viscoelasticity. *Gels*. 2023-ko ekaina; 9(6):469.
- 37) Chemistry LibreTexts [Internet]. 2014 [2025-eko ekainaren 4-an zitatua]. Infrared Spectroscopy Absorption Table. Eskuragarri: https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table
- 38) Romano E, Campagnuolo C, Palladino R, Schiavo G, Maglione B, Luceri C, et al. Technical Evaluation of a New Medical Device Based on Rigenase in the Treatment of Chronic Skin Lesions. *Bioengineering*. 2023-ko abuztua; 10(9):1022.
- 39) Achterberg VF, Buscemi L, Diekmann H, Smith-Clerc J, Schwengler H, Meister JJ, et al. The Nano-Scale Mechanical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Dermal Fibroblast Function. *J Invest Dermatol*. 2014-ko uztaia; 134(7):1862-72.
- 40) Agenda 2030 y ODS – ODS [Internet]. 2025 [2025-eko ekainaren 4-an zitatua]. Eskuragarri: <https://ods.uam.es/agenda-2030-y-ods/>
- 41) Tremoleda JL. Comentarios sobre la Directiva Europea 2010/63/EU para la protección de animales de laboratorio. *Rev Bioét Derecho*. 2012-ko urtarrila; (24):61-72.