



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DISEÑO DE ANDAMIOS MULTIFUNCIONALES Y A MULTIESCALA PARA
APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
LAURA G. HERNÁNDEZ TAPIA**

**TUTOR:
DR. MARCO ANTONIO ALVAREZ PEREZ**
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

CDMX., JUNIO

2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
Tabla de abreviaturas	7
CAPITULO I. Fundamento teórico	9
1.1 TEJIDO ÓSEO	9
1.1.1 Fisiología	9
1.1.2 Neovascularización	11
1.2 INGENERIA DE TEJIDO	14
1.2.1 Bioimpresión 3D	17
1.2.2 Biotinta	20
CAPITULO II. Diseño experimental	24
2.1 Justificación	25
2.2 Objetivo general	26
2.3 Objetivo específico	26
2.4 Hipótesis	26
CAPITULO III. Metodología	27
3.1 Cultivo celular	28
3.2 Preparación de una biotinta compuesta.	28
3.3 Propiedades mecánicas	28
3.4 Impresión de Andamios	29
3.5 Caracterización química de la biotinta (FTIR)	29
3.6 Actividad metabólica CCK-8	30
3.7 Ensayos de diferenciación celular	30
3.9 Estadística	31
CAPITULO IV. Resultados	33
4.1 Preparación de una biotinta compuesta.	34
4.2 Propiedades mecánicas	35
4.3 Caracterización química de la biotinta (FTIR)	37
4.4 Impresión de andamios	39



4.5 Proliferación celular	41
4.6 Ensayo de diferenciación (Alizarina roja)	44
4.7 Actividad de la fosfatasa alcalina	47
4.8 Análisis químico por FTIR de los andamios impresos con la biotinta bajo cultivo celular	46
5. DISCUSIÓN	48
6. CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACION	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
PRODUCTOS OBTENIDOS	59



AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: proyecto IN213821 que ha permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte del CONACYT del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación.

Y a CONACYT por la beca (331090 y CVU:622715) en el programa de maestría y doctorado en ciencias médicas odontológicas y de la salud.

A la UNAM mi segunda casa, por permitirme ser parte de ella y abrirme las puertas a la educación, formación y seno científico.

A mi tutor el Dr. Marco Antonio Alvarez Perez, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar con él, por compartirme sus conocimientos, enseñanzas y guiarme en el camino de la ciencia e investigación.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos y Dra. Patricia González Alva por la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico que nos han brindado en el laboratorio de Bioingeniería de tejidos.

A mi comité tutor integrado por el Ingeniero Carlos Alvarez Gayosso, el Dr. Amaury Pozos Guillen y la Dra. Janeth Serrano Bello, por brindarme de sus conocimientos, consejos y ayuda en cada evaluación semestral.

A mis amigos y compañeros de laboratorio con los que compartí gran parte de mi tiempo, por sus aportes, conocimientos, y diversión.

A mi familia por su apoyo, comprensión y palabras de aliento en los momentos indicados que necesitaba su ayuda.

A mis padres, Juan Honorio HB y Margarita TG, siendo los pilares de mi formación y que sin ellos no me hubiera sido posible concluir esta etapa.

Al dador de la vida, por que me mantuvo en este caminar dandome la fuerzas, salud y entendimiento hasta el día de hoy.



RESUMEN

La biofabricación de andamios tridimensionales (3D) es un proceso basado en la deposición aditiva que utiliza varios biomateriales que contienen o interactúan con células vivas y biomoléculas. El objetivo es fabricar tejidos funcionales para promover la regeneración y reparación a través de las denominadas biotintas.

Las biotintas suelen ser sistemas híbridos basados en hidrogeles biocompatibles con líneas celulares adultas o troncales mesenquimales. La caracterización y el ajuste de las propiedades de la biotintas antes, durante y después de la impresión son esenciales para desarrollar construcciones 3D reproducibles y estables.

Hasta la fecha, se han utilizado innumerables métodos computacionales, pruebas mecánicas y evaluaciones reológicas para predecir, medir y optimizar las propiedades de los biotintas y su capacidad de impresión, pero ninguno está debidamente estandarizado.

El presente estudio tuvo como objetivo investigar las propiedades fisicoquímicas de la composición de diversas biotintas basadas en alginato, gelatina, nanopartículas de óxido de circonio (Alg-Gel-ZrO₂) así como su efecto sobre las células óseas impresas en andamios cilíndricos. Los resultados mostraron que la concentración de gelatina al 8%, alginato al 2% y de ZrO₂ al 0.5 g (p/v), permitió la impresión de andamios con diámetro de 8.5 mm x 1 mm con una densidad celular de 1 x 10⁶ cel/mL. En los ensayos *in vitro* los osteoblastos fetales humanos (hFOB) y SaOS-2 mostraron una mayor proliferación y diferenciación celular durante los 21 días de cultivo celular. Las propiedades mecánicas de los andamios mejoraron con la integración de las nanopartículas obteniendo un módulo de Young similar al tejido óseo trabecular.

La conclusión obtenida hasta el momento de este trabajo de investigación apunta que los andamios fabricados 3D tienen el potencial de ser aplicados en tejido óseo para su regeneración. Así mismo establecer soluciones al campo de las biotintas funcionales. Sin embargo, es necesario poder llevar a cabo más caracterizaciones en modelos *in vivo* el cual podría arrojar datos hacia las aplicaciones clínicas efectivas de los productos biofabricados 3D.



ABSTRACT

The biofabrication of three-dimensional (3D) scaffolds is a process based on additive deposition that used several biomaterials that either contain or interact with living cells and biomolecules. The objective is to fabricate functional tissues to promote regeneration and repair through the referred bioinks.

The bioinks are typically hydrogels-based hybrid systems, biocompatibles with cell lines and stem cells. The characterizing and fine-tuning of bioink properties before, during, and after printing are essential in developing reproducible and stable bioprinted constructs. Numerous computational methods, mechanical tests, and rheological evaluations have been used to predict measure, and optimize bioinks and printability properties, but none are properly standardized.

The present study had the goal research the physicochemical properties of the composition of various bioink based on alginate, gelatin, and zirconium oxide nanoparticles (Alg-Gel-ZrO₂) as their effect on bone cells printed on cylindrical scaffolds. The results showed that the concentration of gelatin 8%, alginate 2%, and ZrO₂ nanoparticles 0.5 g (w/v), allowed the printing of scaffolds with a diameter of 8.5 mm and height of 1 mm with a cellular density 1x10⁶ cell/ml. On the in vitro assays, human fetal osteoblasts (hFOB) and SaOS-2 showed more significant cell proliferation and cell differentiation during the 21 days of cell culture. The scaffolds' mechanical properties improved with the integration of the nanoparticles, obtaining a Young modulus like to trabecular bone tissue.

The conclusion obtained so far from this research work indicates that 3D fabricated scaffolds can be applied to bone tissue for its regeneration. Besides, establish solutions to the field of functional bioinks. Nevertheless, it is necessary to carry out more characterizations in vivo models, leading to data towards practical clinical applications of 3D biofabricated products.



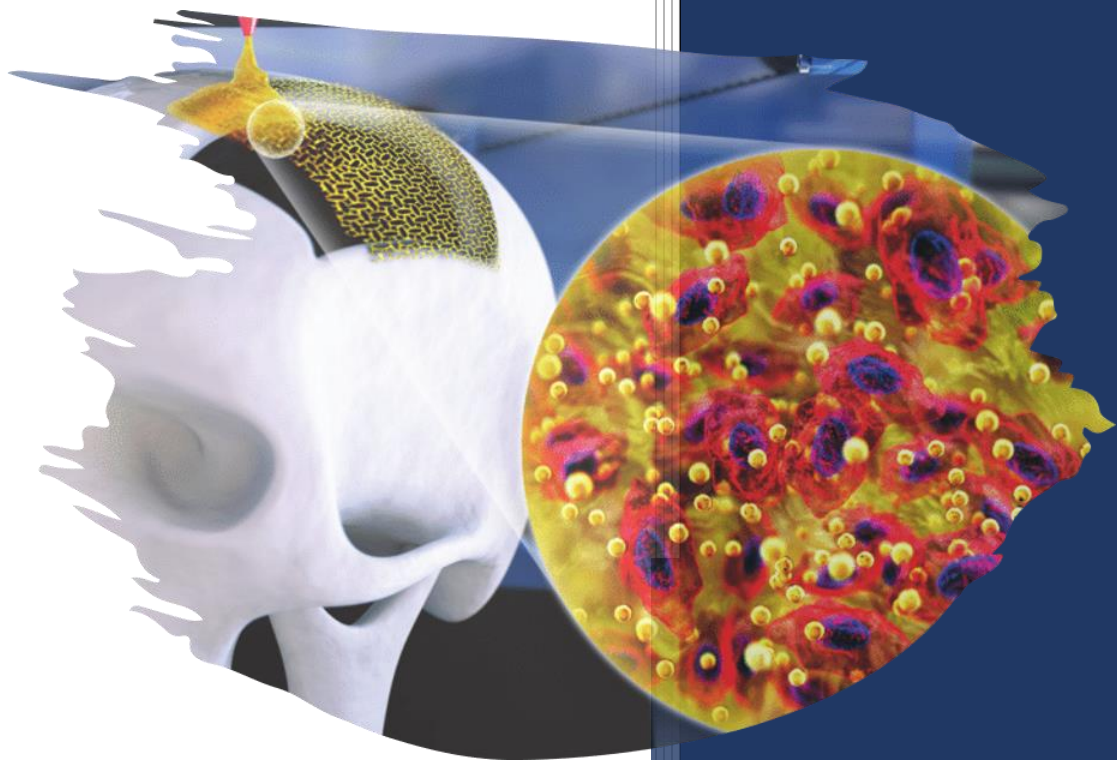
Abreviaturas

<i>HA</i>	Hidroxiapatita
<i>E</i>	Módulo de elasticidad
<i>GPa</i>	Gigapascales
<i>Mpa</i>	Megapascales
<i>Nm</i>	Nanometros
<i>Um</i>	Micrometros
<i>UMB</i>	Unidad multicelular basica
<i>HMGB-1</i>	Proteínas de alta movilidad del grupo 1
<i>IGF-1</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<i>TGF-β</i>	Factor de crecimiento transformante β
<i>PDGF</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<i>bFGF</i>	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
<i>PDGF-BB</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB
<i>M-CSF</i>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<i>RANKL</i>	Receptor de ligando del factor nuclear kappa-B
<i>3D</i>	Tridimensional
<i>MEC</i>	Matriz extracelular
<i>CAD</i>	Diseño asistido por computadora
<i>EBB</i>	Bioimpresión basada en extrusión
<i>IBB</i>	Bioimpresión basada en inyección de tinta
<i>DBB</i>	Bioimpresión basada en gotas
<i>Dmec</i>	Matriz extracelular descelularizada
<i>Nps</i>	Nanopartículas
<i>Fe₃O₄</i>	Magnetita
<i>KPa/s</i>	Kilopascales
<i>hFOB</i>	Osteoblastos fetales humanos
<i>CaCl₂</i>	Cloruro de calcio
<i>ZrO₂</i>	Oxido de circonio
<i>HUVECs</i>	Células endoteliales de la vena umbilical humana
<i>MSCs</i>	Células troncales mesenquimales
<i>RGD</i>	Péptidos RGD (Arginina-Glicina-Acido aspártico)
<i>FITR</i>	Espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier
<i>Ca⁺</i>	Calcio
<i>Ba⁺</i>	Bario
<i>ALP</i>	Fosfatasa alcalina
<i>Au</i>	Oro
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>uL</i>	Microlitros
<i>PBS</i>	Amortiguador de fosfatos salinos
<i>NADH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<i>ELISA</i>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<i>pNPP</i>	Solución de p-nitrofenil fosfato
<i>mM</i>	Milimolar
<i>DMEM</i>	Medio modificado dulbecco's



CAPÍTULO 1

Fundamento teórico



UNAM. Lab. Bioingeniería de tejidos



1.1 TEJIDO ÓSEO

1.1.1 Fisiología

El hueso es un tejido conectivo de arquitectura compleja y estructura jerárquica que va de una escala de nanómetros a micrómetros, es catalogado una estructura “composite” debido a que la fase orgánica le provee la flexibilidad y la inorgánica la dureza. Por lo cual se puede describir que la fase orgánica es fundamentalmente colágena tipo I (95%), proteoglicanos, proteínas no colagénicas y factores de crecimiento, así como una fase inorgánica (mineral) constituida por hidroxiapatita (HA) o $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$.^{1,2,3}

La rigidez del hueso proporciona la capacidad de soportar y proteger varios órganos, es por ello que el hueso es la estructura anatómica responsable del movimiento, protección, manutención de la homeostasis mineral y soporte del cuerpo humano.^{1,2}

El cuerpo humano adulto está compuesto por 206 huesos entre los cuales se clasifican en:

- Huesos largos: Soportan el peso del cuerpo; por ejemplo: clavículas, radios, metacarpios, tibia, falanges, fémures, humeros, metatarsianos, perones y cubitos.
- Huesos cortos: Ayudan al movimiento y estabilidad; por ejemplo: Tarsal y carpianos.
- Huesos planos: Protegen a los órganos internos; por ejemplo: cráneo, mandíbula, costillas y escapula.
- Huesos irregulares: Vertebrae, cóccix, sacro y hioides
- Huesos sesamoideos: Se encuentran dentro de los tendones como la rótula.²

El tejido óseo se clasifica de acuerdo con su estructura en:

a) Hueso cortical o compacto (20% porosidad): Es un hueso denso, sólido, localizado en la parte más superficial del tejido, organizado por osteonas que representa la unidad funcional de hueso en forma de sistemas cilíndricos que rodean el canal de Havers el cual contiene nervios y vasos sanguíneos y en conjunto es catalogado sistema haversiano.



Las propiedades mecánicas del hueso compacto son anisotrópicas, en función de la dirección de la fuerza aplicada (E), el valor de $E = 20 \text{ GPa}$ a lo largo del sistema haversiano y a lo largo del eje transversal el valor de $E = 8 \text{ GPa}$, con una fuerza a la compresión de $170 - 193 \text{ MPa}$ y un módulo elástico de $7-20 \text{ GPa}$.³

b) Hueso trabecular o calloso (50-90% de porosidad): Es un hueso de estructura esponjosa con cavidades interconectadas, localizado en la parte interna, su matriz consiste en una estructura tridimensional en forma de panal, de columnas finas interconectadas para formar las trabéculas, en la que los espacios entre trabéculas están rellenos con médula ósea. Este tipo de hueso imparte una flexibilidad en la carga de $E = 100 \text{ MPa}$, una resistencia a la compresión de $2 \text{ a } 12 \text{ MPa}$ y un módulo elástico de $0.1 \text{ a } 5 \text{ GPa}$.³

Ambos tipos de hueso son compuestos de matrices de redes complejas de canalículos, que conectan a las células óseas (osteocitos) que juegan un papel importante en la traducción de las tensiones mecánicas, que surgen de la carga física de todos los días, y en el proceso bioquímico celular para regular el remodelado óseo conocido como mecanotransducción.

En su escala nanométrica el hueso está constituido por una plétora de proteínas y polisacáridos, cuya composición principal son las fibrillas de colágena que se estabilizan con enlaces cruzados y con nanopartículas de minerales incrustadas entre las cabezas y las colas de las moléculas de colágena con diámetros entre $35 \text{ a } 60 \text{ nm}$ y hasta $1 \text{ }\mu\text{m}$ de longitud. Las moléculas de colágeno forman una matriz, de tal manera que las moléculas de colágena están escalonadas cada 67 nm con espacios de 50 nm entre las moléculas, en donde se encuentran las partículas de HA, mineral que tienen un tamaño aproximado de $50 \text{ nm} \times 50 \text{ nm} \times 2 \text{ nm}$ (Figura 1). Estas fibrillas están mineralizadas por los cristales de HA de manera anisotrópica.

2,4



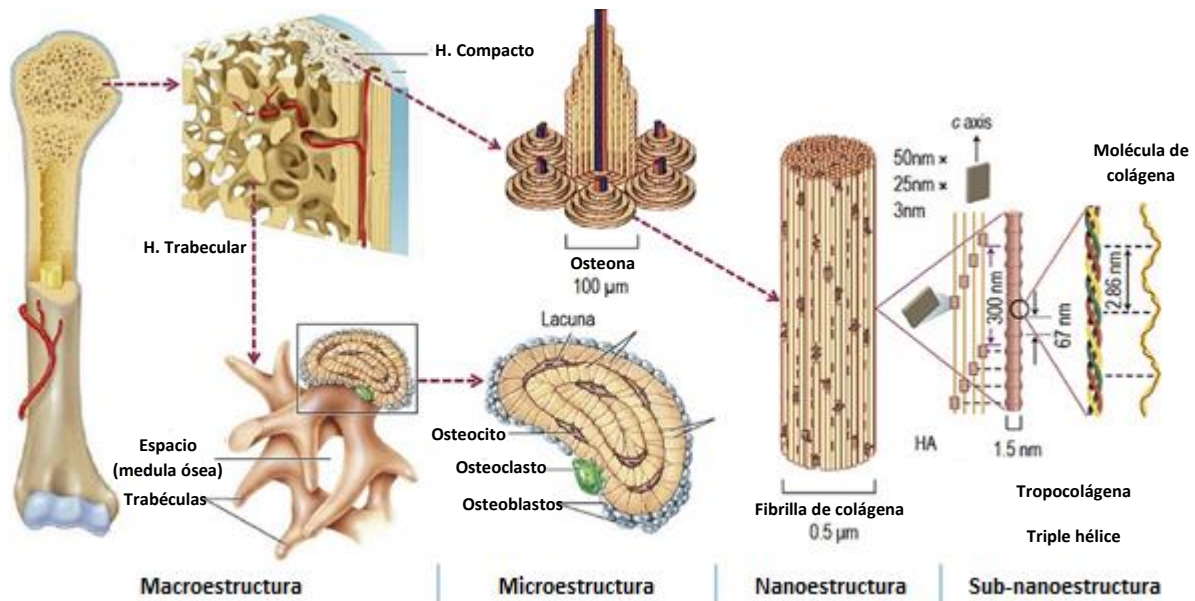


Figura 1. Estructura jerárquica del hueso.⁵

1.1.2 Neovascularización

El hueso está altamente vascularizado, su proceso de neovascularización juega un papel importante en el proceso del desarrollo óseo (osificación endocondral e intramembranosa), regeneración y remodelación. La neovascularización envuelve dos procesos, la angiogénesis y la vasculogénesis.⁶ La angiogénesis involucra la proliferación de células endoteliales locales para la producción de nuevos vasos sanguíneos, mientras que la vasculogénesis se encarga de la formación de la red vascular a partir de células progenitoras, angioblastos o hemangioblastoma. Los vasos sanguíneos juegan un papel muy importante ya que aporta al sistema óseo la oxigenación, nutrición y remoción de desechos de material biológico.^{6,7}

El desarrollo óseo puede ser por 2 tipos de procesos: osificación intramembranosa y endocondral. La osificación intramembranosa es el mecanismo principal que conduce al desarrollo de huesos planos. Este proceso está relacionado con una diferenciación directa de células troncales mesenquimales en osteoblastos, iniciando con una membrana fibrosa que posteriormente será reemplazada por hueso esponjoso; mientras que la osificación endocondral es típica de los huesos largos y la base craneal, este proceso tiene una etapa intermedia de cartílago.⁶⁻⁸

El desarrollo y mantenimiento de la formación de hueso endocondral e intramembranoso dependen de la red vascular ósea.^{6,7}

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en un proceso de continua remodelación. En la remodelación ósea participan células denominadas “*unidades multicelulares óseas*” (UMB, Figura 2), en las que se encuentran los osteoclastos, células encargadas de la reabsorción ósea, osteoblastos células formadoras de hueso y osteocitos células mecanosensoras que monitorean el estrés mecánico.^{7,10}

La remodelación tiene básicamente cuatro etapas:

1) Fase de activación; la cual inicia con la muerte celular de los osteocitos causada por microdaño óseo, la disminución de los niveles de esclerostina activa a la UMB. En esta fase las células precursoras de osteoclastos son reclutadas a la superficie ósea dañada, se producen señales de alerta para reclutar células inmunes y mediadores del proceso inflamatorio como angiopoyetinas, proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB-1), citocinas como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) inducen la diferenciación de osteoblastos, el factor de crecimiento básico de fibroblastos (b-FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activa la acción de los osteoclastos e inhiben a los osteoblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) junto con el IGF-I contribuyen a la inducción de la formación de callos, liberada de la matriz ósea, y la activación de la diferenciación de osteoblastos.

2) Fase de reabsorción, cuando el osteoclasto maduro degrada la matriz mineralizada, las principales señales se dan a partir del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el receptor activador de ligando del factor nuclear kappa-B (RANKL) que promueven la diferenciación de los precursores de osteoclastos y la supervivencia de los osteoblastos activos.

3) Fase de reversión, los osteoblastos activados son reclutados migrando a la zona dañada y los osteoclastos sufren apoptosis; terminando con la fase de formación, donde los osteoblastos depositan una nueva matriz ósea orgánica que posteriormente se mineraliza, donde algunos osteoblastos activos quedan



atrapados en la matriz que secretan y posteriormente se diferencian en osteocitos maduros. Todas estas fases juntas contribuyen a la formación de un hueso remodelado completo que es estructural y funcionalmente similar al anterior.^{10,11}

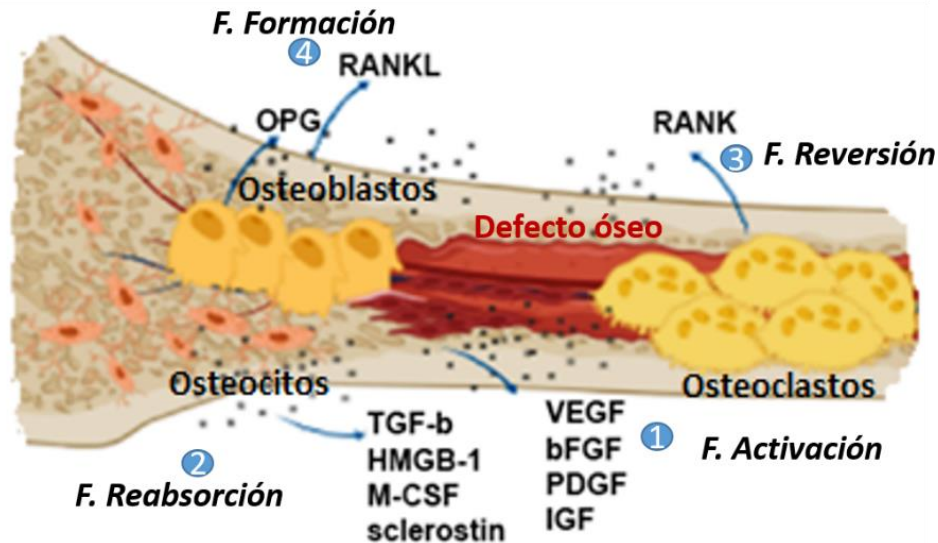


Figura 2. Esquema representativo de las moléculas expresadas durante el proceso de remodelación. Fuente propia.

La fisiología del tejido óseo se ve intervenida de individuo a individuo dependiendo de la zona anatómica, de la presencia de lesiones traumáticas y de enfermedades patológicas, incluidas la osteoporosis, la osteoartritis, la osteogénesis imperfecta y la enfermedad de Paget, que pueden afectar las funciones óseas normales provocando fracturas o defectos óseos⁸.

Aunque el hueso tiene la propiedad intrínseca de repararse a sí mismo, sí existe un daño que supera el punto crítico o el límite de la capacidad de autorrenovación del hueso (+ 2 cm)³, se necesitan estímulos externos para iniciar la regeneración ósea restaurando los volúmenes y las funciones normales del hueso.^{3,12,13}

Los tratamientos tradicionales para dichos defectos son los trasplantes de injertos óseos, representando el segundo procedimiento más común después de la sangre, con una demanda de más de 2.2 millones de injertos anualmente en todo el mundo en ortopedia y odontología⁸.

Debido a la alta demanda de cirugías, el valor de mercado de los injertos óseos y materiales relacionados que alcanzó los 2.400 millones de dólares en el 2016 y que se espera que rebase los 11.500 millones de dólares en el año 2025, la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa está en búsqueda de nuevas estrategias para lograr su regeneración funcional.³

Por otro lado, la extracción de hueso de sitios donantes autólogos o aloinjerto es un procedimiento costoso e invasivo, que se asocia con procedimientos quirúrgicos adicionales en pacientes de edad avanzada, con un mayor riesgo de infección y la posibilidad de transmisión de enfermedades o rechazo en el caso de los aloinjertos.¹ Por lo cual, las investigaciones en el campo de la ingeniería de tejido óseo existe una necesidad de realizar aportaciones con el desarrollo de nuevas estrategias en el diseño de andamios, con tratamientos efectivos y compatibles ante tal demanda que va en aumento.²

1.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejido es un campo multidisciplinario en donde conjuntamente trabajan los principios de las ciencias de los materiales, ciencias biológicas, y la traslación a la clínica.

La ingeniería de tejido óseo surge como un tratamiento terapéutico alternativo¹¹ cubriendo los problemas de insuficiencia de donantes, limitaciones de suministro y rechazo inmune de los injertos del tejido óseo. El objetivo es desarrollar sustitutos o constructos biológicos temporales que regeneren, mantengan o reemplacen la estructura y función del tejido dañado¹³ y entre sus estrategias esta la construcción de estructuras tridimensionales (3D), comúnmente denominados andamios óseos,^{12,13,14,15} que permitirán crear un entorno de apoyo en combinación con suplementos biológicos y células que imiten la matriz extracelular (MEC) del tejido nativo para el crecimiento del tejido óseo.¹³⁻¹⁸ Sin embargo, la ingeniería de tejido óseo aún está en la búsqueda de un sustituto óseo ideal que permita replicar los rasgos esenciales del hueso nativo como son:¹⁹

- Osteogénesis: Se define como la capacidad de un tejido reconstruido para formar tejido óseo nuevo. Este es el requisito clave para el uso clínico potencial de un material en regeneración osea.^{16,19}



- Osteoconductividad: Esta característica es definida como la habilidad de proveer una conexión tridimensional entre los capilares del hospedero, tejido perivascular y células osteoprogenitoras dentro del andamio o implante.^{16,19}

- Osteoinducción: Habilidad del material para estimular la especialización de las células indiferenciadas hacia un linaje osteoblástico.¹⁹

- Osteointegración: Habilidad de un material para integrarse y fusionarse con el hueso nativo después de ser implantados y remodelado.¹⁹

- Biocompatibilidad: De acuerdo con la sociedad europea de biomateriales en Chester (UK), en 1986: es definida como la habilidad del material para provocar una respuesta adecuada del organismo hospedero en una aplicación específica.^{16,19}

- Propiedades Fisicoquímicas: presentar excelentes propiedades químicas, físicas y mecánicas que permitan una adecuada reacción del tejido después de ser implantado.¹⁹

El diseño de un andamio para regenerar los tejidos óseos debe cumplir ciertos requisitos (Figura 3)^{12,20}

- Presentar un arreglo 3D altamente porosa con una red de poros interconectados. Los parámetros de la estructura (tamaño y distribución de los poros, forma y orientación de los poros, área superficial específica⁹, interconectividad de los poros, etc.) deben optimizarse para permitir la migración, crecimiento e integración de grandes cantidades de células así mismos que permita la transferencia de nutrientes, moléculas de oxígeno y desechos metabólicos.^{1,12, 14, 20}
- Deben tener señales físicas y/o químicas de superficie, adecuadas para la unión, diseminación, proliferación y diferenciación celular.^{1,12}
- Debe proporcionar propiedades mecánicas apropiadas (resistencia, tenacidad, elasticidad, etc.) que satisfagan las necesidades de diferentes tipos de células o que coincidan con las de los tejidos circundantes en los sitios de implantación.^{1,12,14,15,20.}



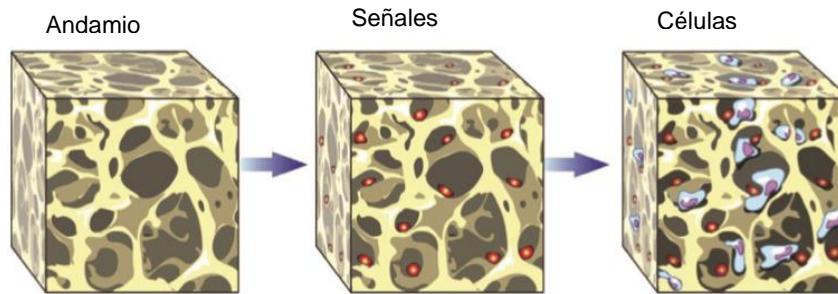


Figura 3. Diseño de andamio para tejido óseo. ¹²

Estas propiedades han demostrado un potencial para ayudar a la regeneración ósea, modulando el proceso de cicatrización y proveyendo un soporte mecánico para el proceso de colonización celular permitiendo en paralelo la producción de una nueva matriz extracelular ósea y la degradación del material por hidrólisis o actividad enzimática, logrando que el tejido pueda recubrir el defecto sin necesidad de una intervención clínica para removerlo.

Los materiales más usados para los sustitutos óseos son los polímeros naturales o sintéticos, cerámicos, metálicos y compuestos.^{3, 14,20}

El diseño y desarrollo de andamios que replacen la forma y función del tejido óseo es aún un desafío en el área de investigación¹⁵, convencionalmente, se han aplicado diversas técnicas, tales como lixiviación de sal, formación de gas, separación de fases, electrohilado, hilado por propulsión de gas y procesos combinados; sin embargo, los métodos tienen algunas limitaciones, como la baja capacidad de control del diseño de poro interno (tamaño de poro, interconectividad de poro) y formas 3D específicas.

Para superar las limitaciones de estos métodos, se ha usado una tecnología de fabricación avanzada, denominada impresión aditiva capa por capa o impresión 3D.^{3,21}

1.2.1 Bioimpresión 3D

La impresión tridimensional (3D) también conocida como fabricación aditiva o creación rápida de prototipos capa por capa, es una técnica versátil que permite la fabricación de andamios tridimensionales, con alta complejidad estructural, personalizados, con flexibilidad de diseño y manipulación de diversos materiales como polímeros, cerámicas, metales y compuestos.^{3,14}

La impresión 3D tiene un gran potencial para convertirse en una técnica de fabricación común en medicina, utilizando datos de pacientes a partir de tomografías computarizadas, resonancia magnética y archivos de diseño asistido por computadora (CAD).^{3,14,21,22}

Los archivos de diseño asistido por computadora (CAD) se utilizan para diseñar y editar los andamios en conjunto con programas utilizados para analizar las geometrías y restricciones de impresión como Slic3r que además permite generar una ruta de impresión conocida como código G, este código es el encargado de comunicar a la ruta de impresión los parámetros deseados como velocidad, ubicación, etc. a la impresora,²³ la cual consta de un cabezal y una boquilla que pueden moverse horizontalmente (direcciones X,Y) y verticalmente (dirección Z)¹ directamente con la impresora o con programas como lo es Repetier host que nos da una representación visual de la impresora 3D.^{23,24}

La impresión 3D ha ido evolucionando con varios métodos de deposición de tinta, en donde encontramos la técnica bioimpresión 3D o biofabricación.^{13,21} La biofabricación recibe el nombre debido a que se logra la impresión de andamios con tintas cargadas con células vivas, biomoléculas con o sin un material portador de manera simultánea (Figura 4)^{13, 22-27}

La bioimpresión 3D además de tener aplicaciones en la medicina regenerativa, también se usa para la síntesis de modelos complejos para el estudio de la biología del desarrollo, biología celular, farmacocinética personalizada y patogénesis de la enfermedad.^{21,24}



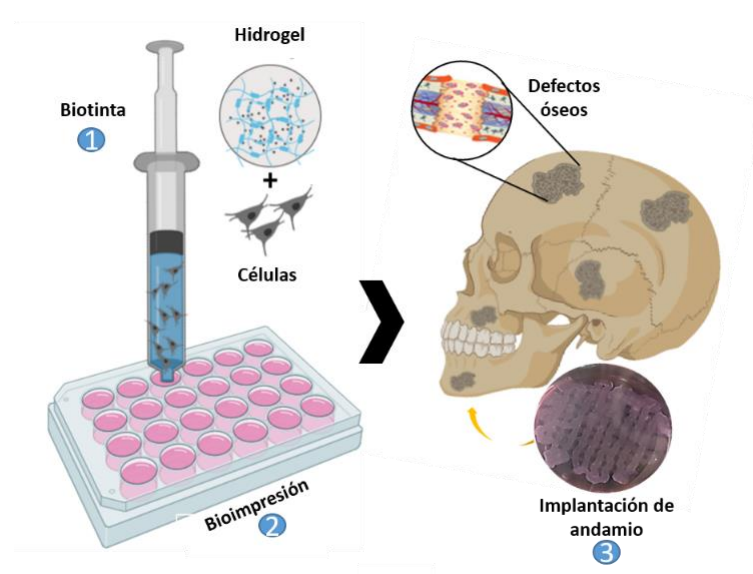


Figura 4. Representación esquemática de la aplicación de la bioimpresión 3D de andamios en la ingeniería de tejido óseo. Fuente propia.

Las ventajas que presentan los andamios 3D impresos son^{14,25,26}:

- Tener una forma personalizada,
- Tamaño de poro / porosidad a medida,
- Propiedades mecánicas ajustadas,
- Tener un control preciso de la distribución celular,
- Tener alta resolución, escalabilidad y rentabilidad.

Mecanismos de bioimpresión

Existen diferentes métodos para la bioimpresión 3D de andamios:²⁵

1) Bioimpresión basada en extrusión (EBB) consiste en la dispensar la biotinta utilizando una bomba de fuerza aérea, un solenoide o un émbolo.^{25,26}

La dispensación 3D se controla neumáticamente alterando la presión del aire, depositando continuos filamentos. Este método tiene una resolución relativamente pobre, entre 50 - 1000 μm como el óptimo²³, pero es particularmente adecuado para biotintas con altas viscosidades y alta densidad celular. Por ello, permite la producción de construcciones que se asemejan mejor a la densidad celular del tejido nativo, permitiendo preservar la viabilidad celular post-impresión del 40-90%^{26,27} y

mediante el uso de sistemas de impresión multicanal permiten obtener altos niveles de complejidad estructural y funcional, como cartílagos y hueso.²²

Las viscosidades habituales de las biotintas para este tipo de impresión se encuentran en el rango entre $6-30 \times 10^7$ mPa/s²³, esto hace que la técnica de EBB sea el método más utilizado para la fabricación de andamios debido a que es de un costo moderado en comparación con la resolución que proporciona^{27,28}

2) Bioimpresión basada en inyección de tinta (IBB) o también conocida como bioimpresión basada en gotas (DBB), permite la deposición de soluciones poliméricas, suspensiones coloidales y suspensiones celulares en forma de gotitas líquidas con un diámetro de 50 μm , utilizando biotintas de baja viscosidad (3-12 mPa/s) y baja densidad celular a velocidades de cizallamiento relativamente altas (10^5-10^6)^{25,27}. Actualmente se utilizan cuatro métodos diferentes para formar las gotas: chorro de tinta, chorro electrohidrodinámico, eyección de gotas acústicas y microválvulas^{3,22,25}. Las ventajas de este tipo de bioimpresión es su alta velocidad, bajo costo, y la viabilidad celular es $> 85\%$. Esta técnica tiene una resolución más alta que la EBB y es superior para generar microtejidos, sin embargo, tiende a una falta de precisión en la colocación y el tamaño de las gotas^{22,23,27,28}

3) Bioimpresión asistida por láser, técnica utilizada en ingeniería de tejidos con una garantía razonable, utiliza un pulso de luz dirigido a través de espejos sobre una capa de biotinta sobre el sustrato, su procesos de impresión esta basados en la estereolitografía, la construcción final se obtiene mediante ciclos repetidos de fotopolimerización del biomaterial líquido, se abstiene del contacto directo entre la biotinta y el dispensador, por lo cual evita la obstrucción del material y células, es de alta precisión y resolución, compatible con varios materiales de alta viscosidad (1–300 mPa/s) y tiene la capacidad de mantener una viabilidad celular $>95\%$, es de alto costo y el tiempo de impresión es largo.^{25,27}

El éxito de la bioimpresión y de las construcciones impresas está relacionado con diferentes factores relacionados con las biotintas y la naturaleza de la superficie del andamio^{27,28}



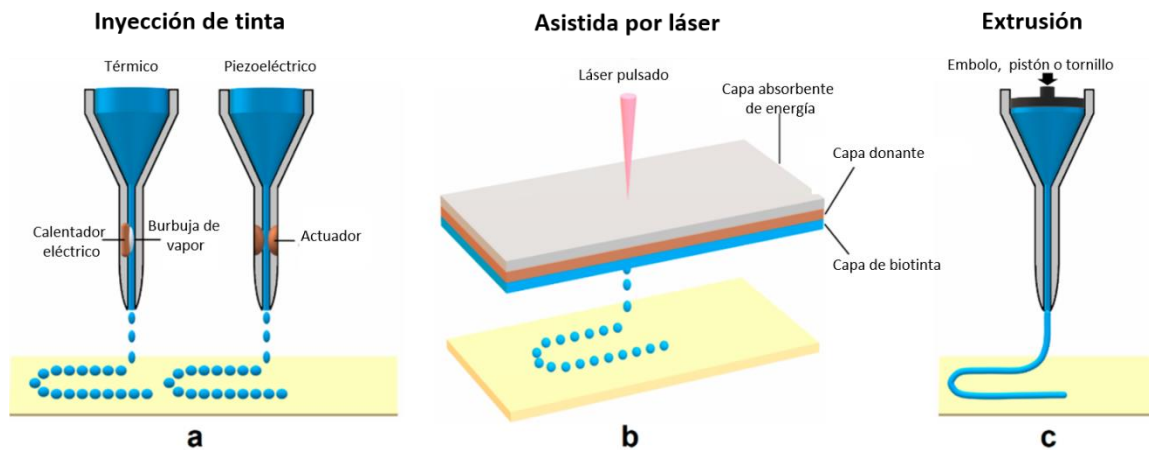


Figura 5. Métodos comunes de impresión. a) Bioimpresión por inyección de tinta, b) bioimpresión asistida por láser y c) Bioimpresión por extrusión.²⁸

1.2.3 BIOTINTA

La biotinta es el punto clave y componente principal de la bioimpresión 3D, la cual permitirá la encapsulación de las células, su viabilidad e integridad antes, durante y después del proceso de impresión²³⁻³¹

La biotinta es por sí misma una mezcla de biomateriales (hidrogeles) que deben tener la capacidad de ser impresos, la cual consta de dos etapas:²²

1. Etapa de pre-extrusión: Incluyen el precursor (proceso de obtención de la biotinta) y la viscosidad que es un parámetro crucial para la formulación de la biotinta ya que afecta tanto la fidelidad de impresión como la eficiencia de encapsulación celular, distribución celular y biocompatibilidad^{22,23,32}
2. Etapa de post-extrusión incluye la estabilidad fisiológica después de la reticulación de las estructuras impresas en 3D, y la fidelidad de impresión asociada con la resistencia mecánica para autosostener una estructura 3D después de la impresión^{22,23}

Los biomateriales de primera elección para la composición de las biotintas son los hidrogeles, los cuales por su propiedades químicas, biológicas y físicas tienen la capacidad de recapitular el microambiente celular e imitar la matriz extracelular^{3,18,22,33,34}

Los hidrogeles son redes poliméricas altamente hidrofílicas reticulados física (irreversibles) y químicamente (reversibles)²⁶, son absorbibles, y tiene una excelente integración con los tejidos circulares evitando una respuesta inflamatoria³ así como también pueden controlar varias funciones celulares como: la adhesión, migración, proliferación y diferenciación ^{18,33,34} y aumentar su efecto al ser cargados con agregados celulares, matriz extracelular descelularizada (dMEC), moléculas bioactivas y nanopartículas.²²

Los hidrogeles se clasifican de acuerdo con su origen: naturales o sintéticos, los más utilizados en el campo de la bioimpresión 3D son los hidrogeles naturales como la agarosa, alginato, quitosano, colágeno, gelatina, fibrina y ácido hialurónico (HA), que ofrecen bioactividad inherente, muestran un parecido estructural con la MEC, excelente biodegradabilidad y baja inmunogenicidad.^{3,33,34}

Uno de los hidrogeles que se usa ampliamente en la bioimpresión 3D es la gelatina, debido a que tiene una composición casi idéntica al colágeno, el componente principal de la MEC natural, tiene una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad.^{3,29} Sin embargo, la gelatina nativa no se ha utilizado sola para la bioimpresión 3D porque su gelificación depende de la transición sol-gel reversible que es dependiente de la temperatura, la cual afecta a la viscosidad de la impresión, por lo tanto se utiliza en combinación con otros polímeros como el alginato.^{3,23}

El alginato es un polisacárido derivado de algas marrón, constituido por el ácido manurónico y gulurónico, tiene una estructura similar a los glucosaminoglicanos encontrados en la MEC del cuerpo humano. Se utiliza comúnmente en biomedicina debido a su biocompatibilidad, baja citotoxicidad, bajo costo y gelación rápida en condiciones fisiológicas sin formar subproductos dañinos.^{3,23,34}

La gelación de alginato puede inducirse fácilmente en presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Ba^{2+} , formando puentes entre cadenas de polímeros, lo que permite el entrecruzamiento físico y la solidificación, dado que la gelación rápida



conduce a una buena capacidad de impresión, la mayoría de los métodos de bioimpresión actuales han utilizado alginato o alginato mezclado con otros biomateriales.^{32,36}

El principal inconveniente de los hidrogeles es su falta de resistencia mecánica, es decir son mecánicamente débiles, frágiles y quebradizos, lo cual ha limitado sus aplicaciones en ingeniería de tejido óseo, sin embargo, se han desarrollado hidrogeles con nanomateriales.³³

Los nanomateriales han ganado rápidamente interés dentro del área de ingeniería biomédica durante los últimos años, ya que su incorporación en una matriz de hidrogel se ha utilizado para agregar nuevas funcionalidades a las biotintas como propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, magnéticas, de respuesta a estímulos, control sobre el comportamiento celular, mejoras en la capacidad de impresión, y una alta área superficial específica, incluso pequeñas concentraciones de estos nanomateriales pueden afectar significativamente las propiedades de una red de hidrogel. Las propiedades únicas de los nanomateriales se han aprovechado para muchas aplicaciones biomédicas, incluidas la obtención de imágenes, la administración de fármacos, las terapias contra el cáncer y el desarrollo de biosensores.¹⁻⁹

Los nanomateriales inorgánicos de usados para el desarrollo de hidrogeles nanocompuestos incluyen nanopartículas (NPs) metálicas (Au, Ag, Cu, etc.), NPs cerámicas (sílice mesoporosa, óxido de zirconio, aluminato de zinc, etc.), NPs magnéticas (Fe_3O_4), y NPs de polímero (nanocelulosa, nanopoliétilenglicol (nanoPEG), nanometacrilato gelatina, etc.)¹

Las biotintas compuestas tienen una osteoconductividad excelente debido a su fase mineral similar a la del hueso humano²¹ y se ha reportado que la adición de estas nanopartículas mejora la adhesión y la proliferación celular.^{14,15}

Sin embargo, la búsqueda de las combinaciones para una biotinta depende del tejido a regenerar y del tipo de diseño e impresión a utilizar, por ello se ha englobado que una biotinta ideal debería tener una viscosidad en el rango de 30 mPa/s a 600 kPa/s, contener señalización celular y moléculas de unión celular para inducir una respuesta celular favorable, poseer propiedades mecánicas apropiadas para la



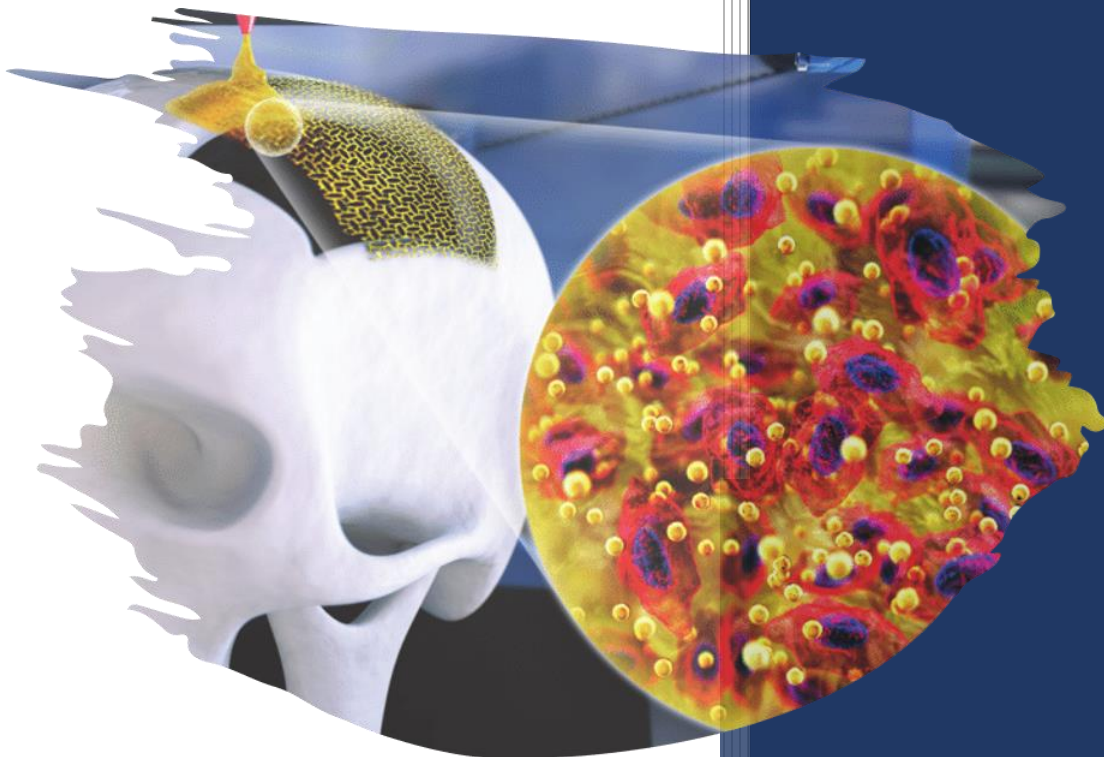
aplicación y exhibir procesos de gelificación rápidos (para mantener la resolución) y citocompatibles.^{21,37}

En el caso de tejido óseo se requiere biotintas compuesta para mejorar la capacidad de impresión razonable y obtener impresiones con una resolución relevante,¹³ fidedigna,²⁵ y con alta actividad celular que permita funciones celulares adecuadas e integración tisular,^{3,21,23} las cuales aún están lejos de ser ideales y es un campo de investigación nuevo que busca en la nanotecnología la mejora de los procesos de adición capa por capa.



CAPÍTULO 2

Diseño experimental



UNAM. Lab. Bioingeniería de tejidos



2.1 JUSTIFICACIÓN

Con los años la lista de requisitos para los materiales con aplicación biomédica ha cambiado sustancialmente, las especificaciones deseadas han evolucionado a partir de ser considerados bioinertes, no degradables y no inmunogénicos para buscar materiales bioactivos, biodegradables e inmunomoduladores.

Recientemente las técnicas de biofabricación aditiva a escala nanométrica y micrométrica en tres dimensiones proporciona un enfoque novedoso para la regeneración de tejidos utilizando andamios de tejido biomiméticos personalizados, permitiendo la combinación de varios biomateriales para crear andamios celulares compuestos, complejos con propiedades mecánicas adaptables y función biológica controlada espacialmente.

Como elementos básicos de la biofabricación se encuentran:

- 1) Andamios o materiales de sustrato base,
- 2) biotintas que funcionan como matriz extracelular para las líneas celulares y
- 3) modelos computacionales coadyuvantes para la elaboración del andamio.

Sin embargo, la falta de biotintas adecuadas ha sido identificada como un importante obstáculo para el rápido progreso del campo de la biofabricación 3D abriendo oportunidades y retos asociados a la búsqueda de biopolímeros, biocerámicos específicos para el diseño de andamios ideales para la regeneración del tejido óseo.



2.2 OBJETIVO GENERAL

Obtención de un andamio tridimensional por la tecnología de fabricación aditiva para aplicación en la ingeniería de tejido óseo.

2.3 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- ❖ Estandarizar una biotinta a base de polímeros y cerámicos para bioimpresión 3D.
- ❖ Diseñar y fabricar andamios por fabricación aditiva 3D.
- ❖ Caracterización de los andamios 3D.
- ❖ Determinar las propiedades mecánicas del andamio 3D.
- ❖ Determinar la respuesta de viabilidad/proliferación celular en los andamios 3D.
- ❖ Evaluar la diferenciación celular en los andamios 3D.

2.4 HIPÓTESIS

La síntesis de una biotinta compuesta permitirá la obtención de andamios multifuncionales y a multiescala por la técnica de fabricación aditiva como estrategia para la ingeniería de tejido óseo.



Capítulo II

1. Tipo de estudio: Estudio experimental *in vitro*
2. Criterios de inclusión: Andamios 3D con una densidad celular 1×10^6
3. Criterios de exclusión: Andamios durante su manipulación se rompan.
4. Criterios de eliminación: Andamios 3D contaminados

Tabla de Variables dependientes

VARIABLES	Definición conceptual	Definición operación	Naturaleza de la variable	Escala de medición de la variable
XTT	Ensayo de viabilidad celular	Ensayo colorimétrico que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio a partir de una enzima deshidrogenasa mitocondrial y de la presencia de NADH presentes solamente en células metabólicamente activas	Cuantitativa Continua	Razón
Tinción alizarina roja	Tinción de nódulos de calcio	Detección visual de la deposición de las sales de calcio mediada por las células usando el kit de tinción de alizarina roja S	Cualitativa dicotómica	Nominal
Fosfatasa alcalina	Actividad de la enzima fosfatasa alcalina	Ensayo colorimétrico, se basa en la defosforilación de pNPP por la enzima ALP	Cuantitativa Continua	Razón
Extrusión	Prueba mecánica de un fluido.	Ensayo que mide la fuerza de extrusión de un fluido viscoso	Cuantitativa Continua	Razón



Capítulo II

Compresión	Prueba mecánica de un material	Ensayo que mide la fuerza aplicada a un material hasta su ruptura.	Cuantitativa Continua	
------------	--------------------------------	--------------------------------------------------------------------	-----------------------	--

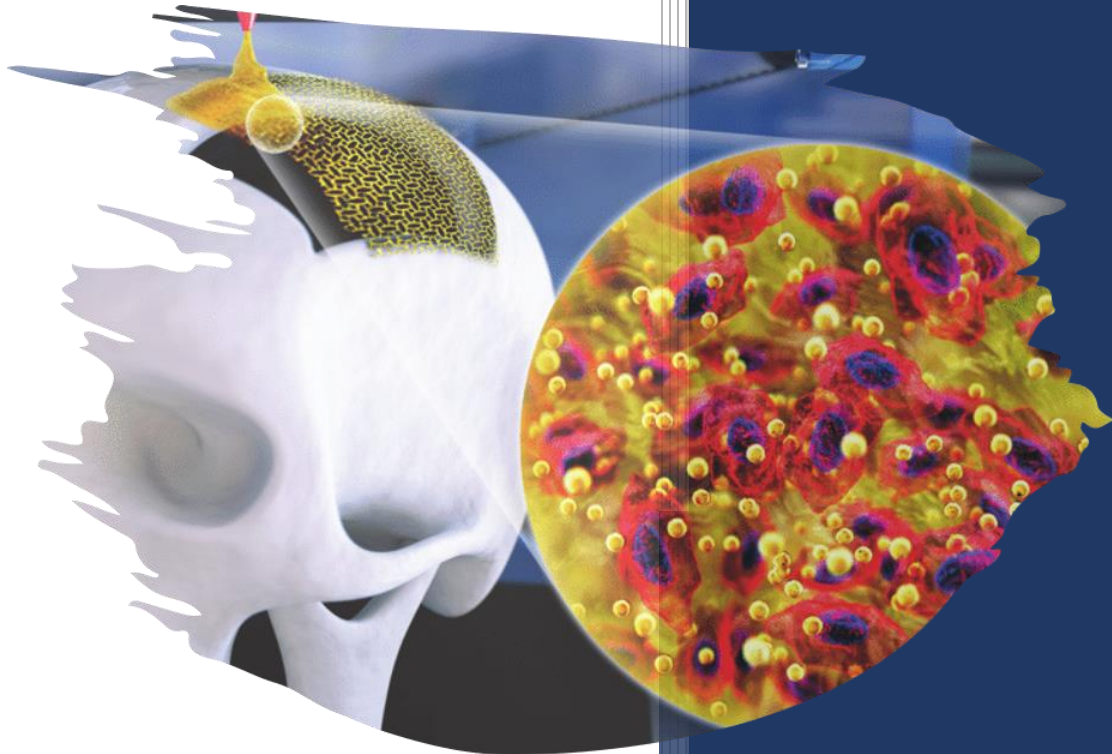
Tabla de Variables independientes

Variables	Definición conceptual	Definición operación	Naturaleza de la variable	Escala de medición de la variable
Biotinta	Hidrogeles naturales biocompatibles y biodegradables	Mezcla de biomateriales (hidrogeles) que deben tener la capacidad de ser impresos	Cualitativa policotómica	Nominal
Técnica de impresión 3d	Bioimpresión por extrusión	Impresión de andamios con tintas cargadas con células vivas, biomoléculas con o sin un material portador de manera simultánea	Cualitativa dicotómica	Nominal



CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA



UNAM. Lab. Bioingeniería de tejidos



3.1 Cultivo celular

En este trabajo fueron utilizadas líneas celulares osteoblásticas humanas: MG-63 (ATCC® CRL-1427™, Manassas, VA, USA), Saos-2 (ATCC® HTB-85™, Manassas, VA, USA) y osteoblastos fetales humanos (hFOB 1.19 ATCC® CRL-11372) todas mantenidas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Corning, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB 10%, Corning NY, USA) y antibióticos (estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL and fungisona 0.3 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100 mM de piruvato de sodio. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. El medio fue removido cada 3 días, hasta alcanzar un 90% de confluencia celular. Las líneas celulares fueron usadas en el pasaje 3 al 6.

3.2 Preparación de una biotinta compuesta.

Alginato de sodio al 2% estéril (120,000–190,000 g/mol and M/G ratio of 1.56, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA); gelatina tipo B al 10% estéril (Bovine skin type-B, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA), fueron disueltos en suero fetal bovino (SFB) a una temperatura de 37°C. A la biotinta se colocó 0.5 g de nanopartículas de óxido de circonio (ZrO₂, (p/v)). Posterior a su desarrollo composite, se les adicionó una densidad celular de 1x10⁶ cel/mL e inmediatamente transferidas a la jeringa de impresión para el desarrollo de los andamios impresos 3D.

3.3 Propiedades mecánicas

a) Ensayo de extrusión

La biotinta con y sin presencia de una densidad celular (1x10⁶ cel/mL) fue colocada en una jeringa 5 mL, posteriormente se colocó en una máquina de prueba universal Instron. Para el ensayo de extrusión se utilizaron dos velocidades la primera ajustada a 15 mm/min y la segunda a 25mm/min que son determinadas vía software de impresión. Para cada ensayo de extrusión se utilizaron 5 mL de las biotintas.



b) Ensayo de compresión

Las propiedades mecánicas del andamio se determinaron mediante pruebas de compresión en la máquina de tracción universal (Instron Modelo 5567, Reino Unido). Los ensayos se les aplicaron compresiones con una carga de 100 N, con una velocidad de 1 mm/min^{-1} . El diseño de las muestras fueron cilindros con un diámetro de 9 mm y 5mm de altura. Para el estudio, se realizaron dos grupos: 1) las muestras de Alginato-Gelatina y 2) las muestras de Alginato-Gelatina-ZrO₂. Cada grupo constaba de 10 muestras las cuales se promediaron para calcular el módulo de Young ($E = \sigma / \epsilon$) donde E = módulo de Young, σ = tensión y ϵ = presión.

3.4 Impresión de Andamios

Los andamios (8.5 mm de diámetro x 1 mm de grosor) fueron diseñado en los programas CAD y Slicer. Se diseñó digitalmente un código G en MATLAB (Versión 9.4.0.813654, The MathWorks, Inc., Natick, MA, EE. UU.) para imprimir en serie un andamio en cada pozo del plato de cultivo celular de 24 pozos. Los parámetros para la bioimpresión en 3D fueron establecido de la siguiente manera: el patrón de rejilla cartesiana tuvo una distancia entre filamentos de 500 μm para permitir el transporte de masa, cuatro capas de 250 μm de altura, una velocidad de impresión de 10 mm/s y una presión de 110 kPa. Los andamios fueron impresos por extrusión de tinta, capa por capa (*Pastecaster, BCN3D Technologies, Barcelona, España*) y con una boquilla de 250 μm . Después de la impresión, los andamios fueron gelificados en 50 μL de solución de CaCl₂ (100 mM, Lach-Ner, Neratovice, República Checa) a 10°C para la reticulación iónica de alginato. Inmediatamente, se añadieron 500 μL de medio de cultivo celular y se incubaron a 37°C durante 21 días.

3.5 Caracterización química de la biotinta (FITR)

La caracterización química de la biotinta se llevó a cabo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FITR), así como los andamios impresos 3D después de someterlos a cultivo celular con y sin presencia de la densidad celular una vez terminado cada tiempo de incubación (14 y 21 días). Este análisis nos permitió evaluar cada uno de sus componentes en su forma nativa en manera de



hidrogel y de composite. Para ello, las muestras se lavaron con agua bidestilada tres veces y analizadas el equipo de FITR marca Shimatzu IR affinity (México). Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en los intervalos de 4000 a 500 cm^{-1}

3.6 Actividad metabólica CCK-8

La proliferación celular se evaluó con el kit CCK-8, ensayo colorimétrico que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio a partir de una enzima deshidrogenasa mitocondrial y de la presencia de NADH presentes solamente en células metabólicamente activas. Esta reducción permite el cambio de color de amarillo a anaranjado. Brevemente, los andamios impresos 3D fueron lavados con PBS, después se le adiciono una solución de CCK-8 (10 μL por cada 100 μL de medio) incubándose a 37°C por 2 horas y pasado el tiempo la solución fue trasferida a un plato de 96 pozos y leído en un lector de (ELISA) a una longitud de onda de 450nm. La concentración del producto de formazán es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

3.7 Ensayos de diferenciación celular

Para evaluar la bioactividad de las células osteoblásticas una vez realizado la impresión de los andamios 3D por la combinación de la biotinta se realizaron las siguientes evaluaciones:

3.7.1 Actividad de fosfatasa alcalina

La actividad ALP se evaluó mediante un kit de ensayo colorimétrico ALP (Abcam, Cambridge, Reino Unido) que se basa en la desfosforilación de pNPP por la enzima ALP que genera un color amarillo. Brevemente, los andamios 3D fueron lavados con PBS, después fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5 mL para ser lisados con una solución de 0.1% de tritón X-100 (ALP assay buffer) por 15 min en agitación y centrifugado a 4°C a 13,000 rpm por 15 minutos. De la solución supernadante se colocaron 60 μL en una placa de 96 pozos por triplicado y se ajustó el volumen de las muestras a 80 μL con (ALP assay buffer). Se mezcló cuidadosamente y se agregaron 50 μL de la solución de p-nitrofenil fosfato pNPP (5mM) a cada pozo

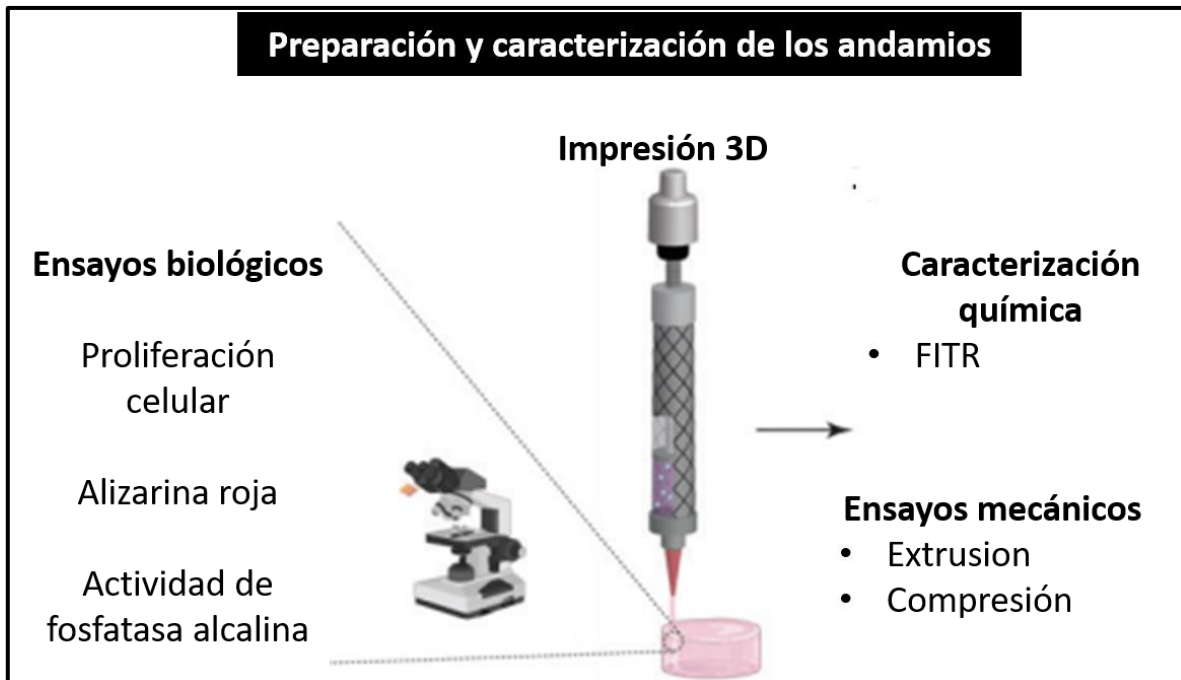


muestra control y experimental e incubados a 25°C por 60 minutos, protegiendo la placa de 96 pozos de la luz con papel aluminio, pasado el tiempo de incubación de reacción, se agregaron 20 µL de solución stop (NaOH) y las muestras fueron leídas a una absorbancia a 405nm. La actividad de ALP se calculó como el pNPP generado por las muestras durante la incubación por unidad de volumen de muestra por minuto de reacción. Para obtener la actividad de la ALP se realizó una curva estándar con la enzima ALP proporcionada en el kit de ensayo, que reaccionó con diluciones en serie de pNPP.

3.7.2 Alizarina roja

El fenotipo osteoblástico se determinó mediante la detección visual de la deposición de las sales de calcio mediada por las células usando el kit de tinción de alizarina roja S (ARS) con una solución de 40 mM pH 4.2 (Osteogenesis kit, Millipore). Los andamios 3D fueron lavados cuidadosamente con PBS y fijados con 4% de paraformaldehído por 15 minutos, después fueron lavados tres veces con agua destilada. Para detectar el mineral, los andamios impresos fueron teñidos con alizarina roja por 30 minutos, pasando el tiempo de incubación fue retirada la solución de ARS y se realizaron varios lavados con agua destilada para remover el exceso de colorante y fotografiado con un microscopio estereoscópico (Olympus DSX-HRSU, Tokio, Japón). Para cuantificar la ARS, los andamios se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se les adicionaron 200µL de ácido acético al 10% por 30 minutos en agitación. Pasado el tiempo los tubos fueron incubados a 85°C por 10 minutos, posteriormente pasados a hielo por 5 minutos y centrifugados a 13,000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 75 µl de hidróxido de amonio al 10% para detener la reacción. La solución fue leída con una absorbancia de 405 nm y se realizó una curva con concentraciones conocidas de ARS.



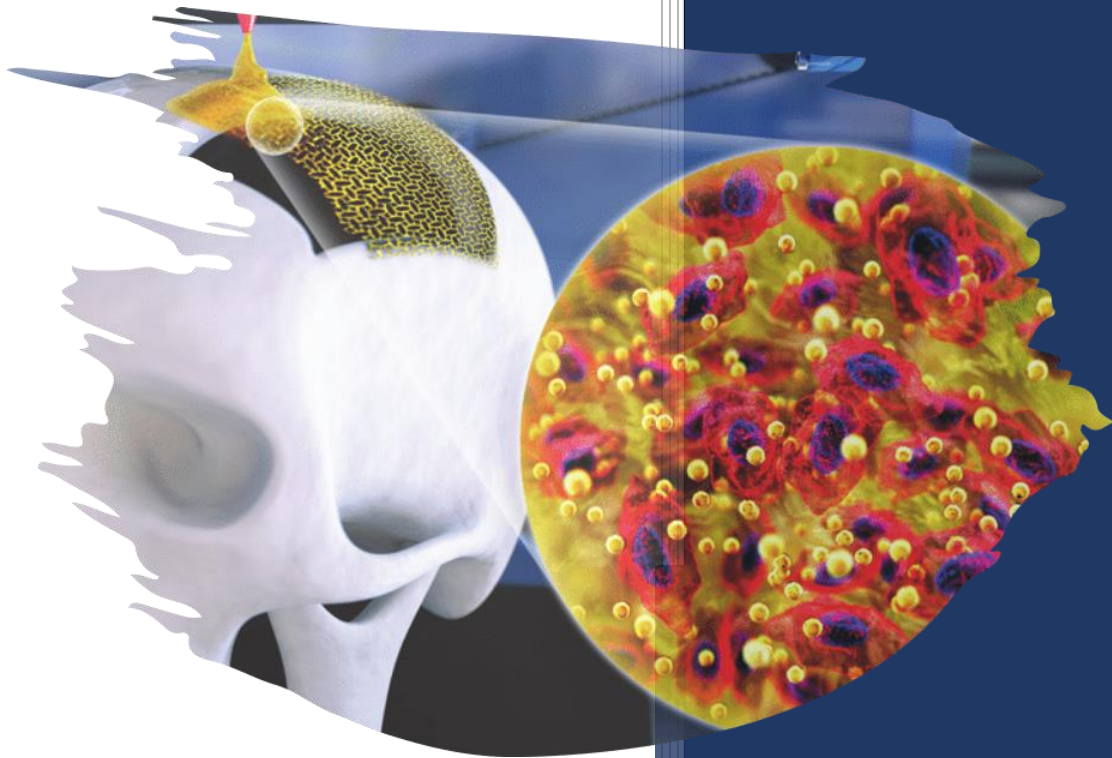


3.8 Estadística

Los resultados de los ensayos de CCK-8, ALP, ARS y pruebas de compresión fueron analizados en el paquete estadístico GraphPad Prism. Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas con ANOVA de 2 vías y Turkey Post-Hoc para la comparación entre grupos, representando la significancia \pm desviación estándar. La significancia estadística fue definida con una $p < 0.05$ para un intervalo de confianza del 95%.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS



UNAM. Lab. Bioingeniería de tejidos



4.1 Preparación de una biotinta compuesta.

Para comenzar la síntesis de la biotinta se llevaron a cabo combinaciones de los 3 materiales elegidos (alginato, gelatina y nanopartículas). Cabe destacar que dicha combinación nos arroja que se aumenta la viscosidad de la biotinta, no permitiendo que fluya contra la gravedad (Figura 6a). Esto es una gran ventaja ya que se mantiene la integridad de la biotinta y ello puede permitir la extrusión por parte de la bioimpresora para el diseño de andamios 3D. Previamente para poder validar que no se obstruyera la jeringa, se realizaron impresiones a manera de gota, donde se puede observar que la composición y concentración de los polímeros utilizados son las óptimas (Figura 6b). Asimismo, evaluamos el proceso de gelificación con cloruro de calcio (CaCl_2) a una concentración de 10 mM durante 5 minutos. Permitiendo la gelificación total de los andamios impresos de diferentes diámetros circulares (Figura 6b).

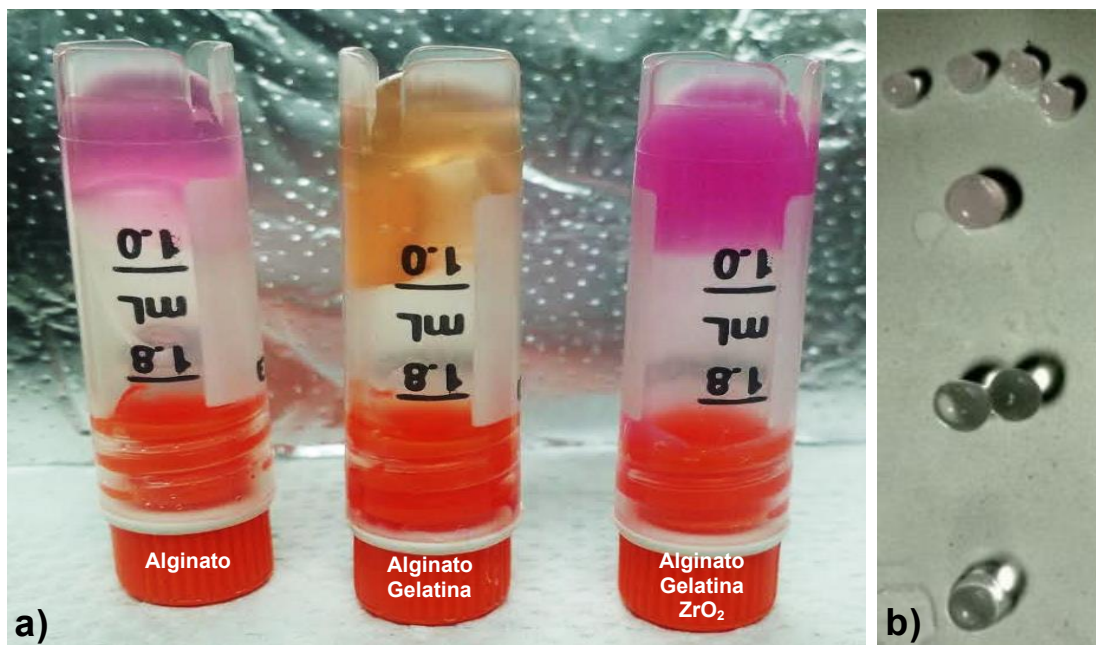


Figura 6. Biotinta antes y después de su gelificación. a) Fluidez de diferentes biotintas. b) Perlas gelificadas después de 5 minutos en cloruro de calcio (CaCl_2).

4.2 Propiedades mecánicas

a) Ensayo de extrusión

Se midió la fuerza de extrusión de la biotinta con y sin la presencia de una densidad celular de 1×10^6 cel/ ml. En la figura 7 se muestra el grafico que corresponde a la extrusión de la biotinta durante una fuerza aplicada, como se observa, la adición de células no afecta la fuerza de extrusión y en contraste la alta rapidez de extrusión requiere más fuerza para imprimir la biotina.

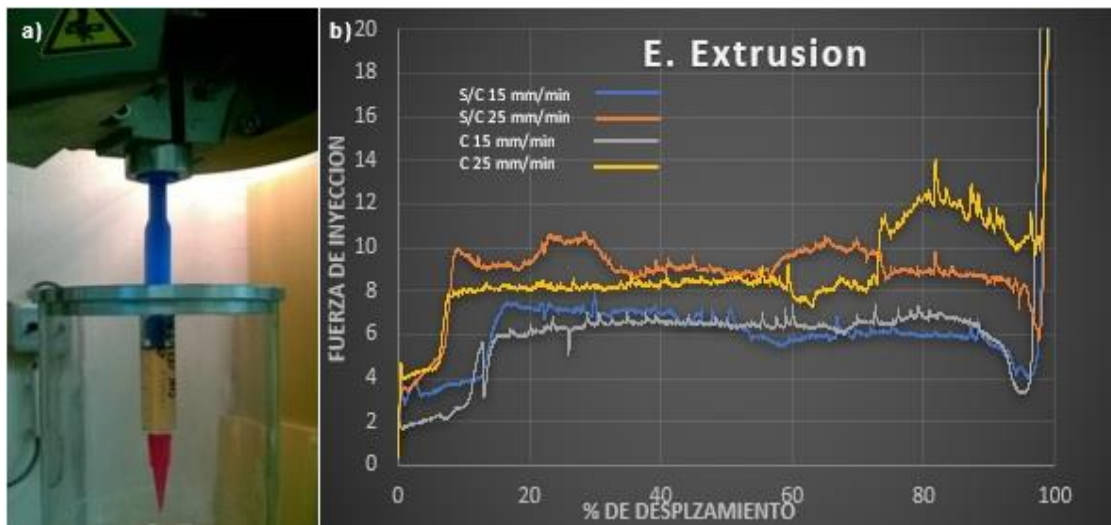


Figura 7. Ensayo de extrusión. a) Fotografía de la biotinta dentro de la jeringa de extrusión. b) curvas de la fuerza de inyección registrada en biotintas con y sin células a dos diferentes velocidades de extrusión 15mm/min y 25mm/min.

b) Ensayo de compresión

En la figura 8 podemos observar la Curva esfuerzo-deformación de los andamios, la cual nos indica la fuerza aplicada en los andamios hasta su total deformación llegando a la ruptura, en la figura 8b se muestra el comportamiento que tuvieron los andamios con nanopartículas óxido de zirconio, los cuales tiene una deformación mayor que los andamios solos antes de la ruptura.

Con los datos arrojados de la curva se obtuvo el valor promedio del módulo, para los andamios con nanopartículas de óxido de zirconio su módulo de Young obtenido fue de 75.10 ± 5.635 MPa, mientras que de los andamios solos fue de 45.99 ± 3.734 MPa, sin embargo, el valor del módulo de Young tangente en los andamios con las

nanopartículas de óxido de zirconio fue de 251.5 ± 17.54 MPa y el de los andamios solos fue de 201.5 ± 18.68 MPa.

Ambos andamios mantuvieron una similar tensión en la última carga, que es la máxima tensión a la que se ha sometido el material durante el ensayo. Los andamios con nanopartículas presentaron una tensión promedio de 0.9540 ± 0.05 MPa y los andamios solos de 0.9333 ± 0.05383 , estas propiedades nos hablan de cuanto resiste el material hasta su ruptura. Como se muestra en el gráfico 8b y 8d los andamios con nanopartículas presentan una mayor tensión máxima con un mayor porcentaje de deformación en comparación con los andamios sin nanopartículas, así mismo el módulo de Young es mayor en los andamios con nanopartículas.

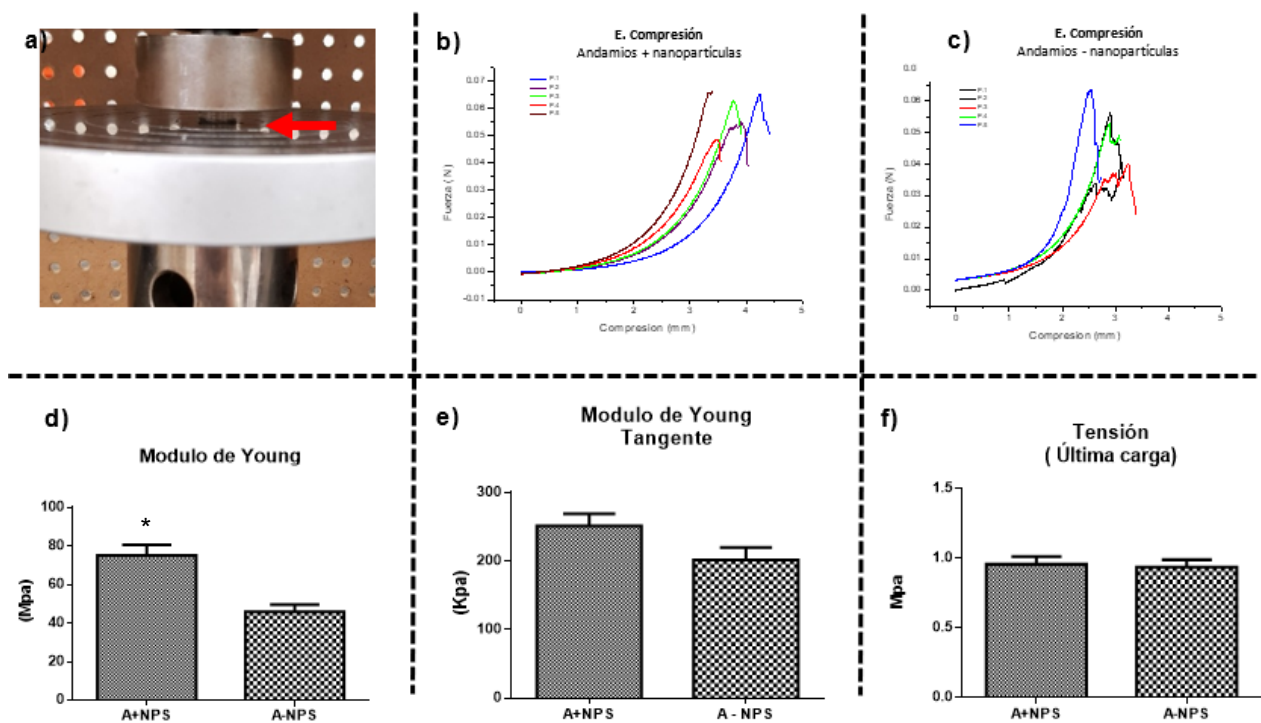


Figura 8. Ensayo de compresión. a) Muestra cilíndrica de la biotinta (alginato-gelatina-ZrO₂) con diámetro de 9mm x 5mm de grosor, colocado en las platinas de la maquina Instron. B) Curva fuerza-deformación de los andamios con ZrO₂, mostrando su comportamiento al aplicar una fuerza sobre ellos hasta su ruptura C) Curva fuerza-deformación de los andamios sin ZrO₂ y su comportamiento al aplicar una fuerza sobre ellos hasta su ruptura. d) Gráfica del módulo de Young o elástico de los andamios con y sin nanopartículas de ZrO₂ medido en Megapascales. E) Gráfica de módulo de Young tangente o inicial de los andamios con y sin nanopartículas de ZrO₂, medido en kilopascales. F) Gráfica de la tensión máxima, fuerza aplicada en la última carga ante la ruptura de los andamios con y sin nanopartículas de ZrO₂.



4.3 Caracterización química de la biotinta (FTIR)

Como se muestra en el espectrograma del alginato en la figura 9, al combinarlo con agua destilada, se observa que disminuye la intensidad de los picos característicos de sus grupos funcionales que son: el enlace C-H ($2062\text{ cm}^{-1} - 2932\text{ cm}^{-1}$), el grupo carboxilo COO- en 1610 cm^{-1} , el enlace C-O ($1299\text{ cm}^{-1} - 1337\text{ cm}^{-1}$) y el enlace C-O-C en 1094 cm^{-1} , aumentando la banda del enlace O-H en 3454 cm^{-1} que corresponde al agua.³⁸

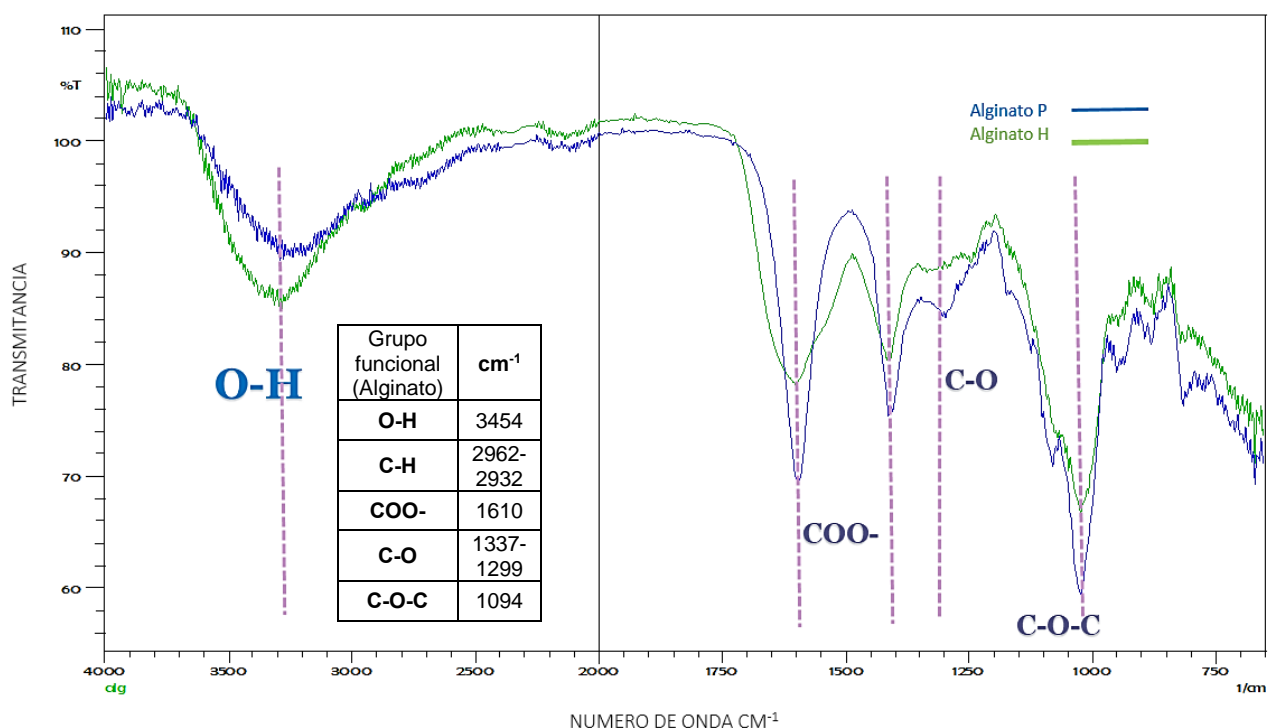


Figura 9. FTIR del alginato de sodio. El espectrograma en color azul corresponde al alginato de sodio (polvo) y el espectrograma en color verde corresponde al alginato de sodio (hidrogel).

En el siguiente espectro se muestran dos espectrogramas, uno donde se observan las bandas características de los grupos funcionales de la gelatina, en 1630 cm^{-1} que corresponde a Amida I, en 1550 y 1453 cm^{-1} a Amida II y en 1029 cm^{-1} al enlace C-O-C³⁸. El otro espectrograma corresponde a la combinación del alginato, gelatina con las nanopartículas de ZrO_2 , donde podemos observar que las bandas



características del alginato tienen mayor intensidad que las de la gelatina por lo que en el espectrograma de la biotinta ambos picos se superponen.

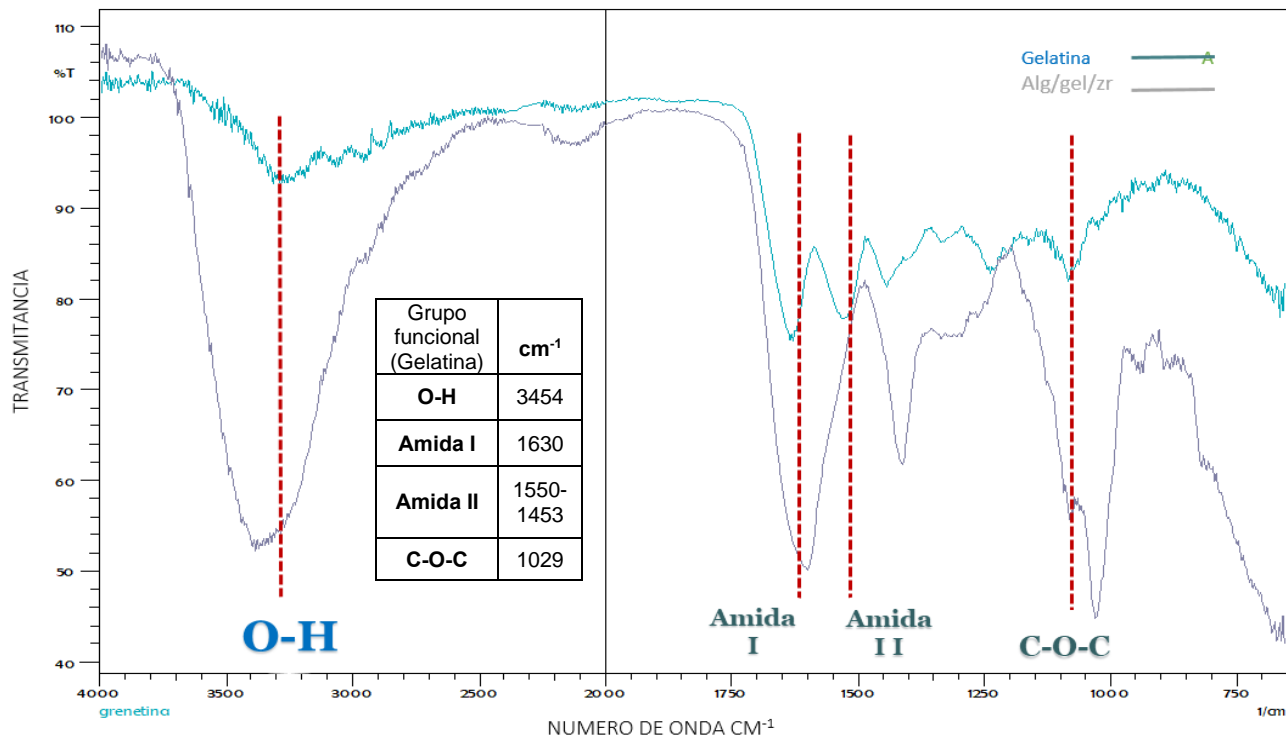


Figura 10. Espectrogramas de FTIR de la gelatina (polvo) y la biotinta (Alginato, Gelatina y ZrO₂). Espectrograma en color azul corresponde a la Gelatina y en color gris, espectrograma de la biotinta.

Por último, en la figura 11 se muestra los espectrogramas de la gelatina, alginato y al llevar a cabo la combinación para el diseño de la biotinta, mostrando la diferencia de los espectros al ser combinados. Además, en el espectro de la biotinta se observa la banda característica del enlace Zr-O en 758 cm⁻¹.³⁸



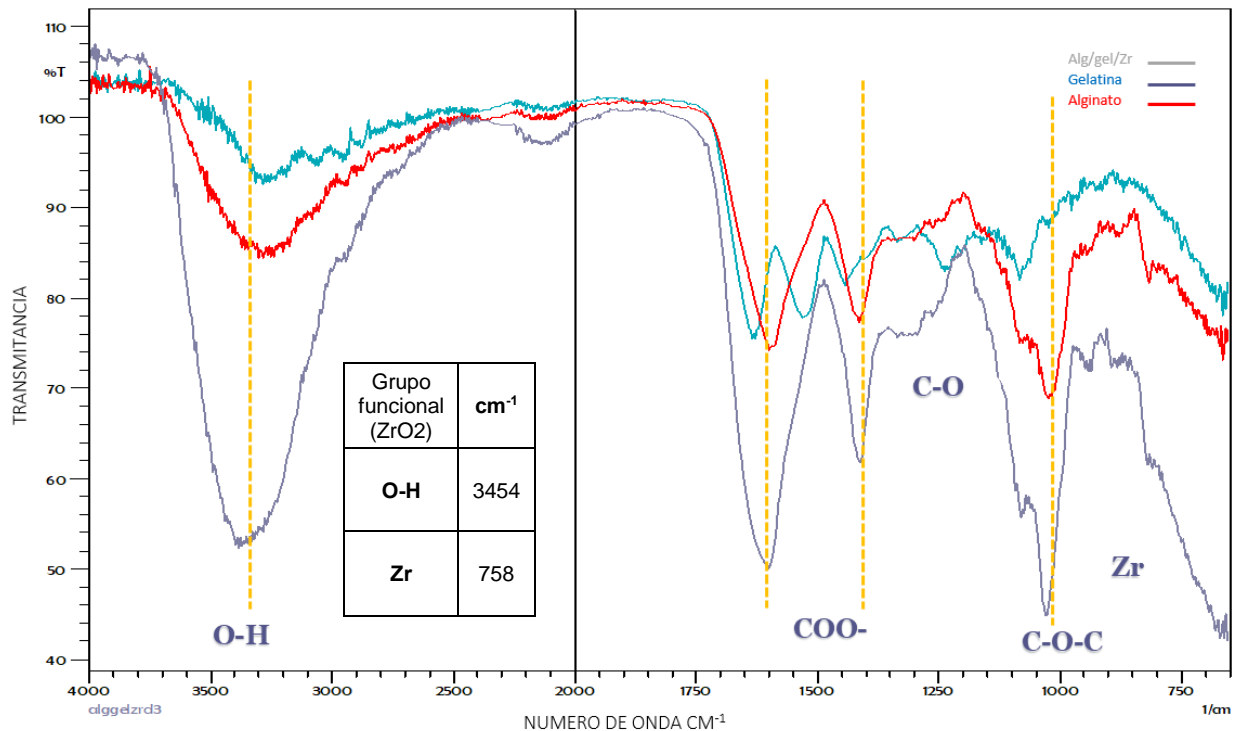


Figura 11. Comparación del FTIR de la biotinta y sus componentes. Espectrograma en color gris correspondiente a la biotinta, espectrograma en color rojo que corresponde al Alginato de sodio y en color azul el espectrograma de la gelatina.

4.4 Impresión de andamios

Por los ensayos de extrusión se obtuvieron datos que nos han permitido llevar al diseño de andamios en 3D (Figura 12). Asimismo, las propiedades mecánicas de la biotinta en conjunto con su viscosidad han llevado a optimizar la extrusión que han permitido que los andamios mantuvieran su geometría antes y después del proceso de entrecruzamiento con la solución de cloruro de calcio (100 mM). Las variables usadas para lograr la impresión de los andamios cilíndricos 3D con dimensiones de 8.5 mm de diámetro con un grosor de 1 mm se pueden reportar como:

- 1) Overlapping de 0.0
- 2) Multiplayer de 3.0
- 3) Boquilla de 250 μm.
- 4) Cama de la impresora sin temperatura

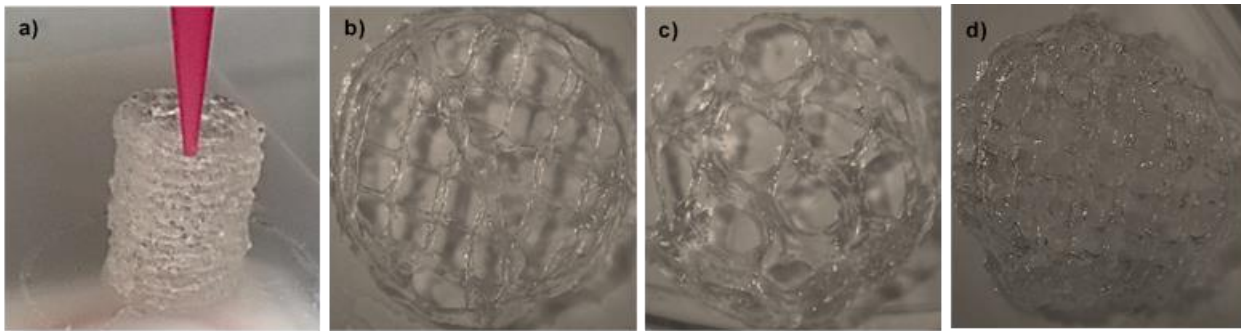


Figura 12. Impresión de andamios 3D. a) andamio cilíndrico relleno retineo, b) andamio cilíndrico con relleno tipo “honeycomb”. c) Andamio rectilíneo de hidrogel. d) Andamio cilíndrico relleno lineal.

Los andamios impresos con la presencia de las líneas celulares (MG-63, SaOS-2 y hFOB) a una densidad (1×10^6 cel/mL) fueron impresos en serie; donde el tiempo total de extrusión de la biotinta fue de 21 minutos el cual no afectó la integridad ni la arquitectura de los andamios antes de entrecruzarse. La deposición automática permitió la biofabricación repetida con fidelidad del patrón cartesiano, facilitando el desarrollo en serie de construcciones directamente en la placa de cultivo celular de 24 pozos, reduciendo el riesgo de contaminación de las muestras (Figura 13).

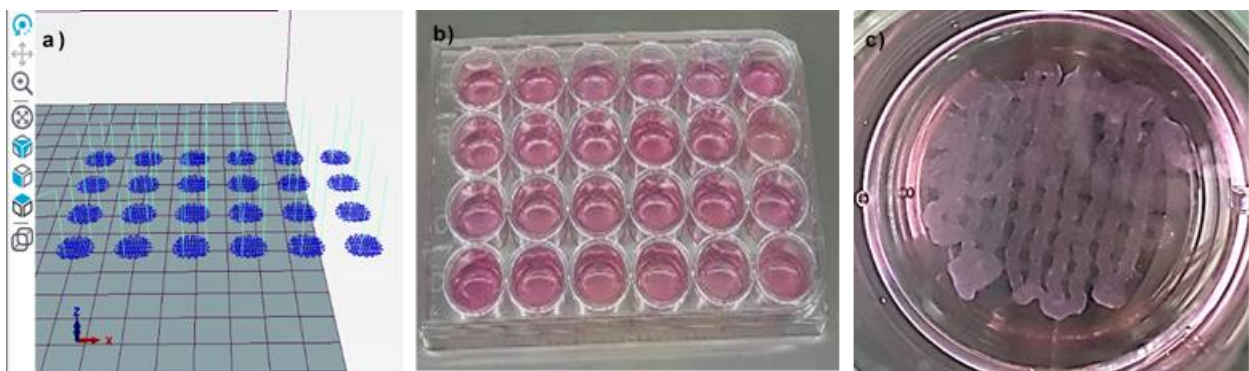


Figura 13. Impresión de andamios en serie. a) Trayectoria x-y-z de impresión en el plato de cultivo de 24 pozos. b) Impresión seriada en platos de 24 pozos bajo condiciones estériles. c) Pos-impresión, andamio en medio de cultivo.

Los andamios fueron observados bajo el microscopio óptico como se muestra en la figura 14, donde observamos que a los días 7 y 21 de incubación los andamios se encontraban estructuralmente estables.

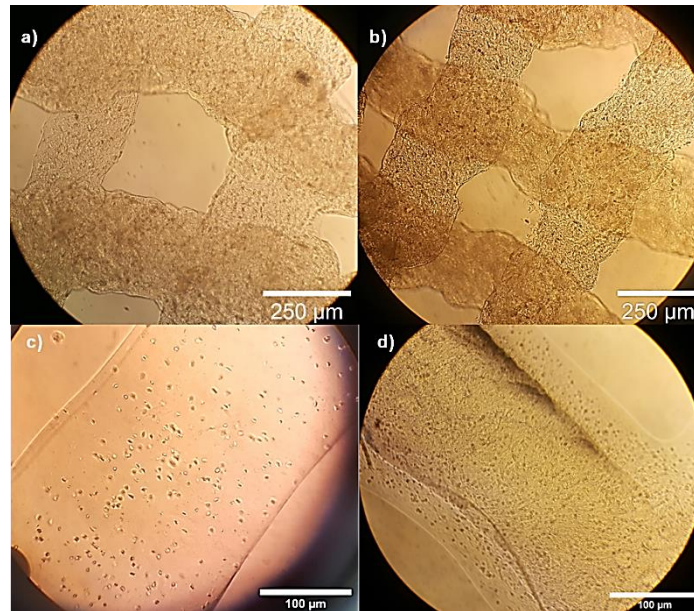


Figura 14. Andamios 3D de hidrogel con células. a, b) Imágenes ópticas del andamio a 10x al día 7 y 21 respectivamente. c, d) imágenes ópticas del andamio a 40x al día 7 y 21 respectivamente. El puntillero negro corresponde a las células encapsuladas.

4.5 Proliferación celular

Como un primer acercamiento a evaluar la respuesta celular de la biofabricación, se utilizaron células fetales osteoblásticas con la finalidad de estandarizar el proceso. Por ello, se muestra la cinética de proliferación de las células hFOB post-impresión evaluada a 14 días de cultivo (Figura 15).

En la gráfica se comparan las cinéticas de proliferación con las combinaciones de las biotintas usando como control de la cinética a la superficie del plato de cultivo celular. Como se observa en la gráfica, la biotinta correspondiente a la combinación alginato/gelatina/ZrO₂ presenta una mayor proliferación hasta los 14 días de cultivo, en comparación con la biotinta de alginato/gelatina y el control donde a los 14 días

mostraron una disminución en la proliferación. Sin embargo, por microscopía óptica se puede apreciar el comportamiento de las células encapsuladas en la biotinta durante 14 días, donde al día 1 se observan células redondeadas y con el tiempo tienden a agruparse, mostrándose en estructuras tipo esferoides al día 14.

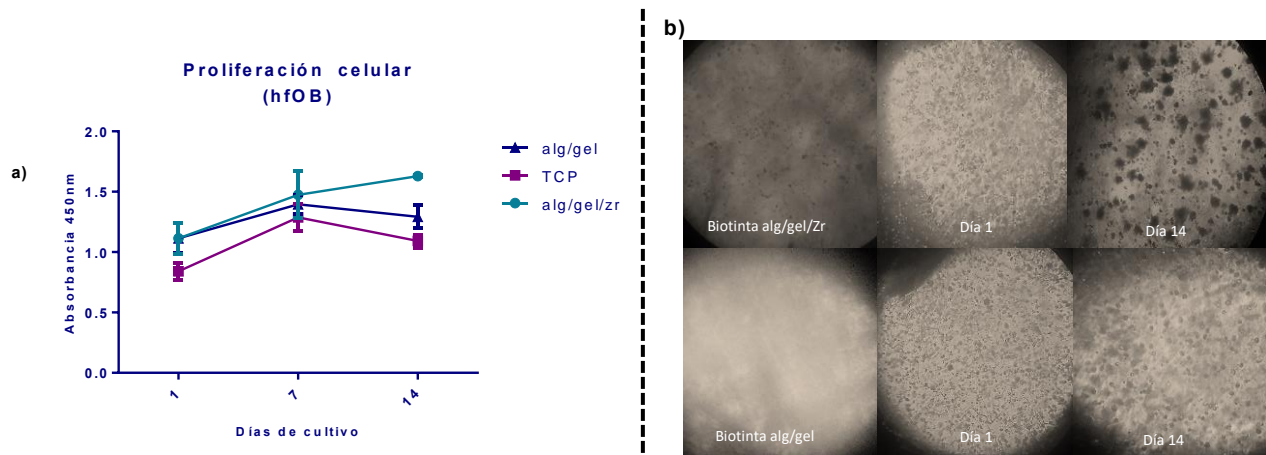


Figura 15. Respuesta celular. a) Proliferación de las células hFOB en diferentes biotintas, entrecruzadas con CaCl_2 por 1 minuto. b) Imágenes de microscopio óptico de las células hFOB encapsuladas en la biotinta e incubadas por 14 días en medio de cultivo.

Por otro lado, la cinética de proliferación utilizando células osteoblásticas adultas como las células MG-63 y SaOS-2 a los días 1, 7, 14 y 21 en condiciones de medio de cultivo celular normal y de medio de cultivo osteogénico, muestra que el patrón de proliferación de las células MG-63 fue más rápida que las células SaOS-2, logrando una fase estacionaria a los 14 días, en contraste las células SaOS-2 que tuvieron su máxima proliferación hasta el día 21 y fue mayor en medio osteogénico que en medio normal. La diferencia de proliferación no fue estadísticamente significativa en ambas líneas (Figura 16).

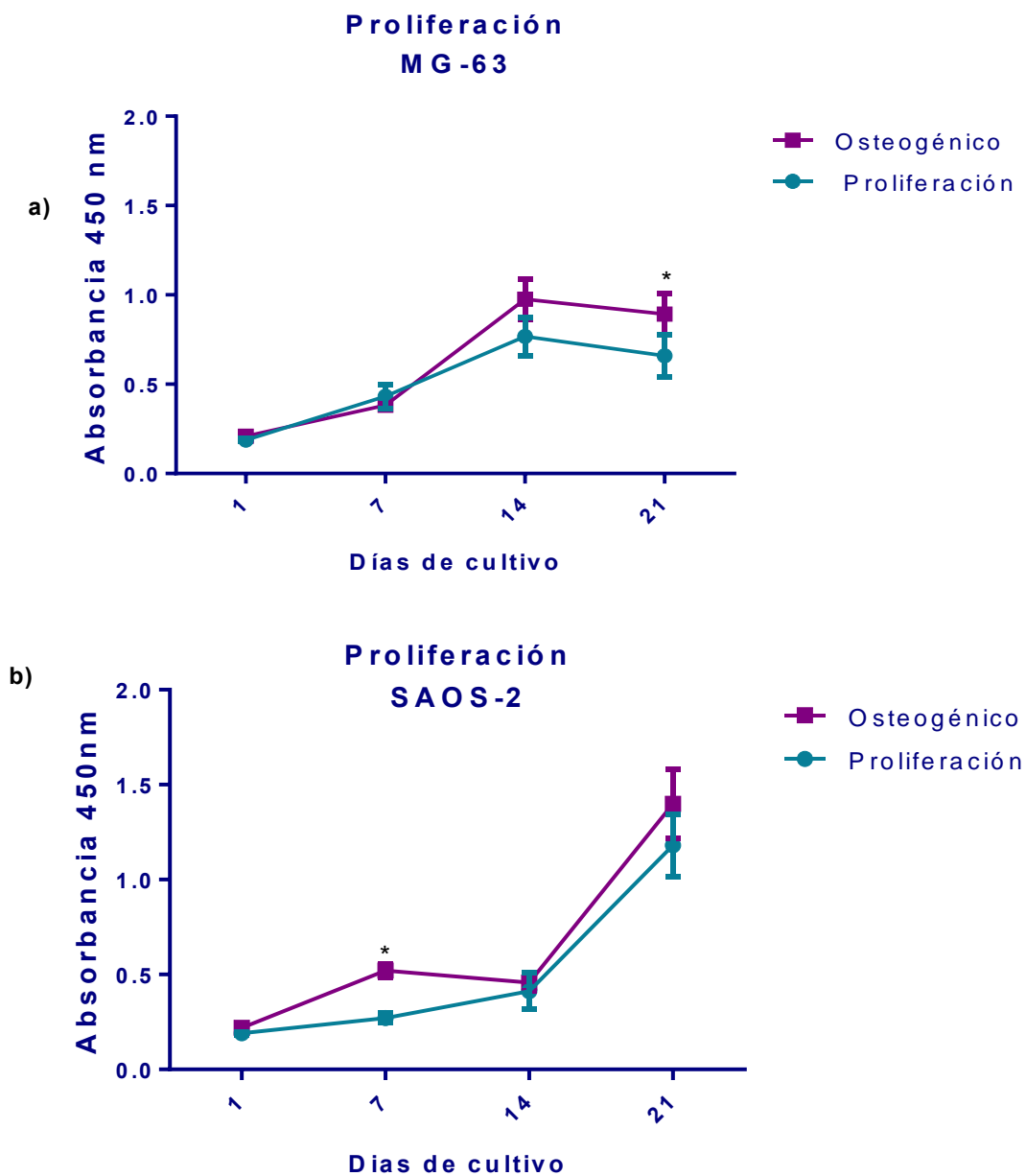


Figura 16. Proliferación celular. a) Proliferación de las células MG-63. b) Proliferación de las células SaOS-2 en medio de cultivo de proliferación y osteogénico. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$.



4.6 Ensayo de diferenciación (Alizarina roja)

Los resultados obtenidos durante el ensayo de alizarina roja mostraron la presencia de nódulos de calcio teñidos en color rojo, indicando la diferenciación de las células encapsuladas en la biotinta (alginato/gelatina y con presencia de las nanopartículas de ZrO_2). La presencia de depósitos fue proporcional con el tiempo de incubación y del medio de cultivo usado. Se observó mayor presencia de nódulos hasta el día 21, y en cuanto al tipo de medio de cultivo, hubo mayor concentración de depósitos en el medio osteogénico que en medio de proliferación. Sin embargo, en el caso de las células MG-63, no se aprecia una presencia de nódulos de calcio, en contraste con las células hFOB y SaOS-2, donde la presencia de los nódulos de calcio fue más evidente (Figura 17).

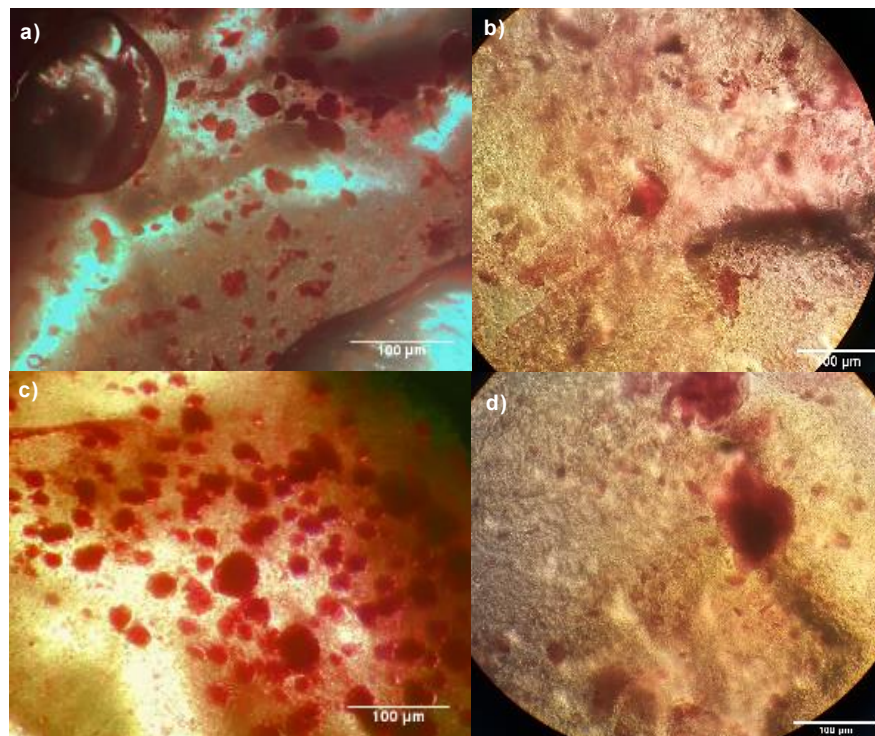


Figura 17. Imágenes ópticas a 40x de los andamios con células hFOB y SaOS-2 dando positiva la tinción de alizarina roja. a) nódulos de calcio teñidos presentes en los andamios con células hFOB al día 21 con medio normal. b) nódulos de calcio teñidos presentes en los andamios con células SaOs-2 al día 21 en medio normal. c) tinción positiva de Alizarina roja en andamios con células hFOB al día 21 en medio osteogénico. d) tinción positiva de alizarina roja en andamios con células SaOS-2 al día 21 en medio osteogénico. Se muestra en color rojo los nódulos teñidos.

4.7 Actividad de la fosfatasa alcalina

En la figura 18 se muestra la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de las células MG-63 y SaOS-2 evaluada a los días 7, 14, y 21 días de cultivo. Como se observa en la gráfica, la actividad de ALP en los andamios con células MG-63 fue mínima en ambos tipos de medio celular y no presento ningún cambio a lo largo de los 21 días de cultivo, en comparación con la actividad de ALP de los andamios con las células SaOS-2 donde se aprecia que la actividad de la enzima fue 2 veces mayor e incrementándose su máxima actividad al día 21 de cultivo.

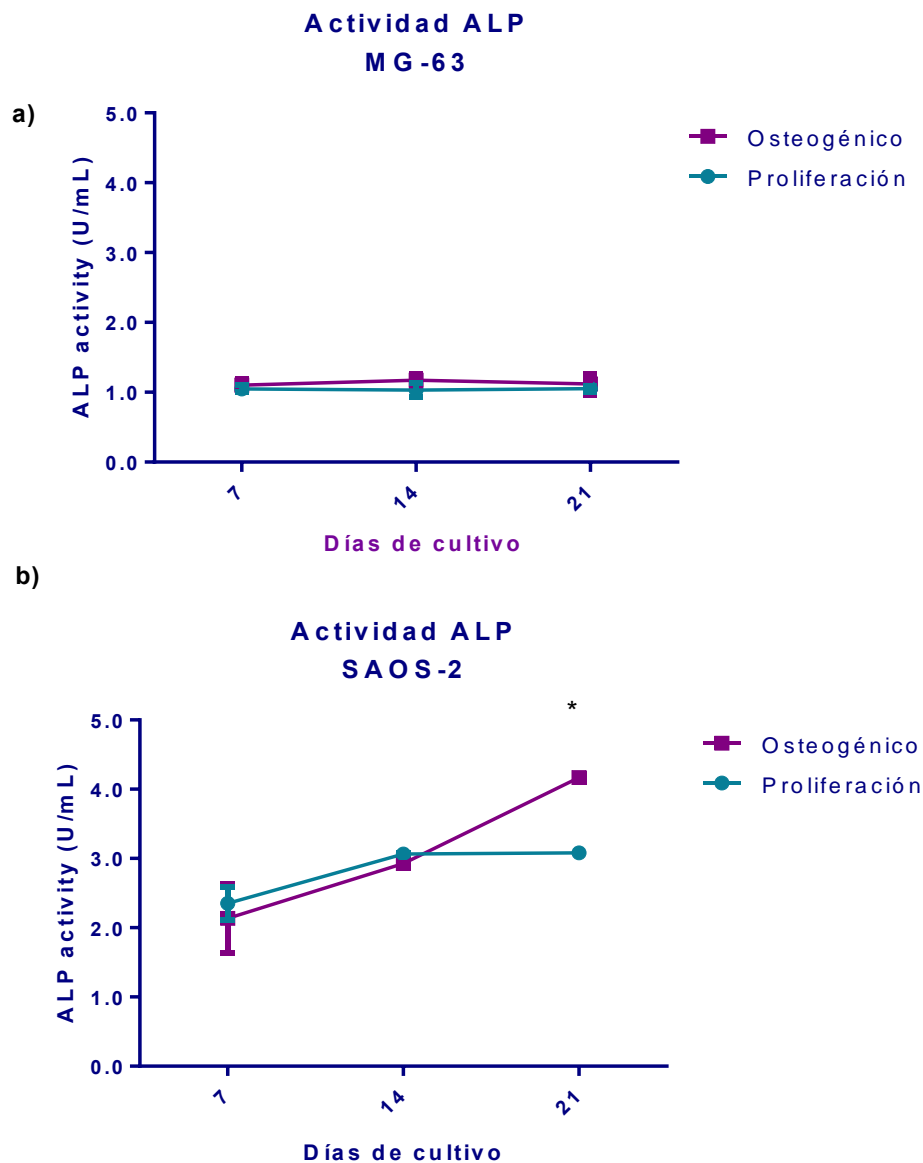


Figura 18. Actividad de fosfatasa alcalina de las células MG-63 y SaOS-2. a) Andamios con células MG-63 y b) andamios con células Saos-2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en *p<0.05.



4.8 Análisis químico por FTIR de los andamios impresos con la biotinta bajo cultivo celular

Terminando los periodos de incubación a los 14 y 21 días de cultivo los andamios 3D impresos con la biotinta (Alg/Gel/ZrO₂/hFOB) fue analizada por FITR. En la figura 19 y 20 se muestran los espectrogramas correspondientes a cada día y comparados con la biotinta sin presencia de células. Al día 14 el espectrograma muestra bandas nuevas en 1127 cm⁻¹ correspondiente a fosfolípidos, las bandas en 921 cm⁻¹ correspondiente a prolina y las bandas en 960 cm⁻¹ al grupo PO₄. Mientras que al día 21 se muestra las mismas bandas que el día 14 y nuevas en 1453 cm⁻¹, 1531 cm⁻¹, correspondientes a la Amida I y II de la colagena, bandas en 1575 cm⁻¹ que corresponden a los lípidos y bandas en 750 cm⁻¹ que corresponde también al grupo fosfato. En el espectro de la biotinta del día 21 se observa baja intensidad en las bandas de los componentes, lo que nos puede indicar una probable degradación de los compuestos y formación de matriz extracelular mineralizada.

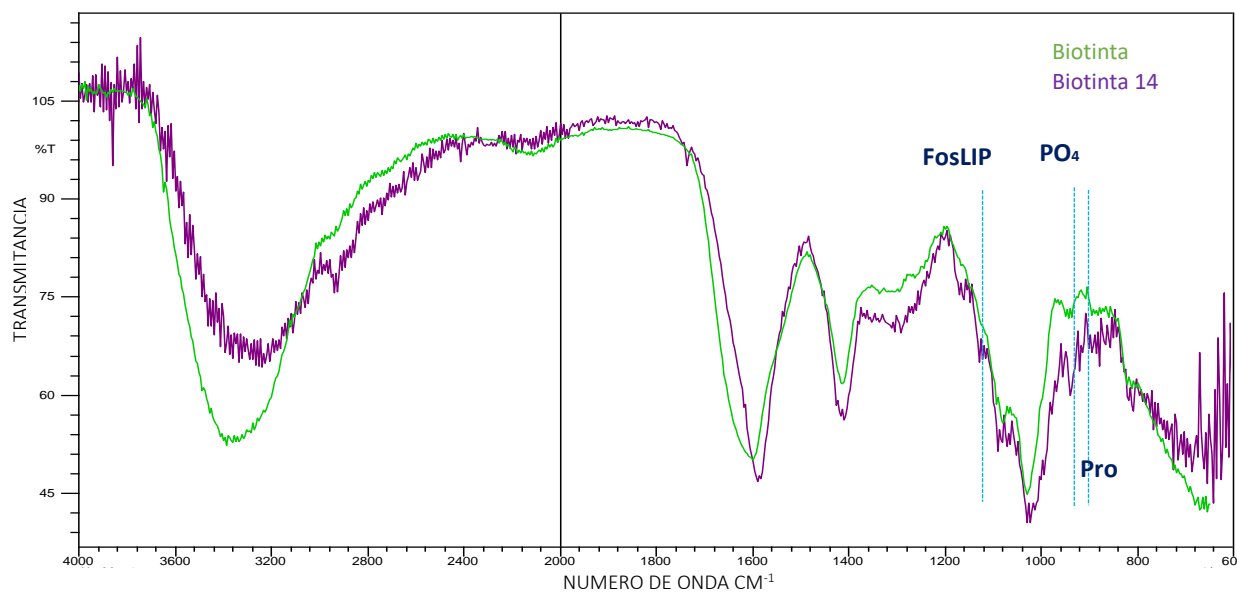


Figura 19. Análisis químico por FTIR. a) Espectrograma en color morado corresponde a la biotinta incubada hasta el día 14 y en verde corresponde a la biotinta sin células.

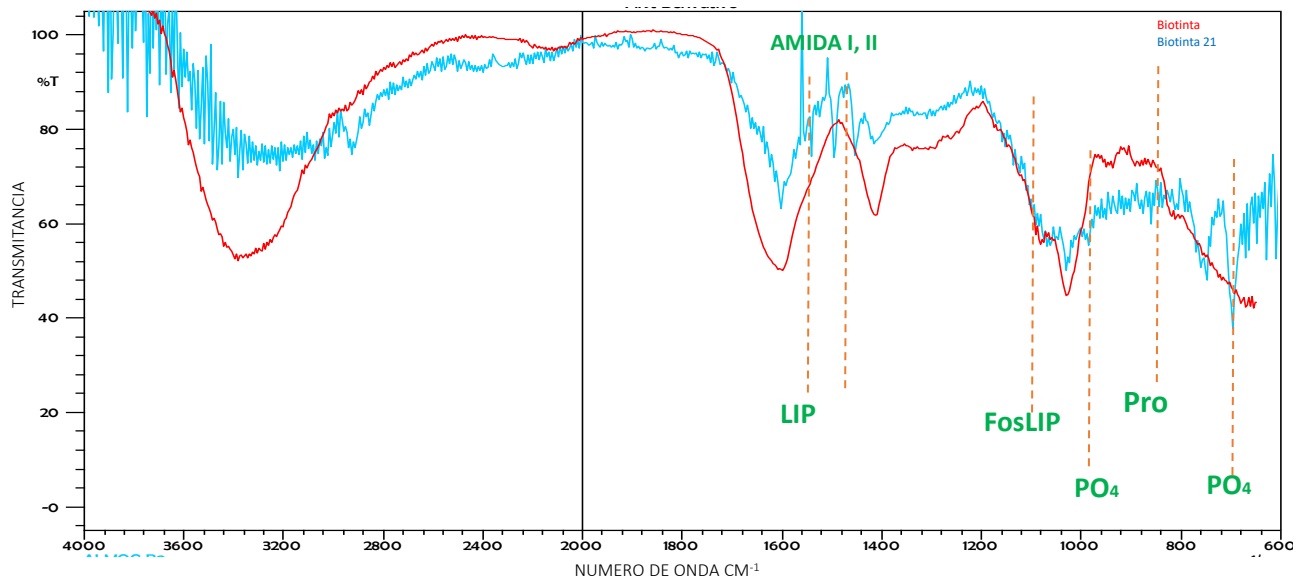
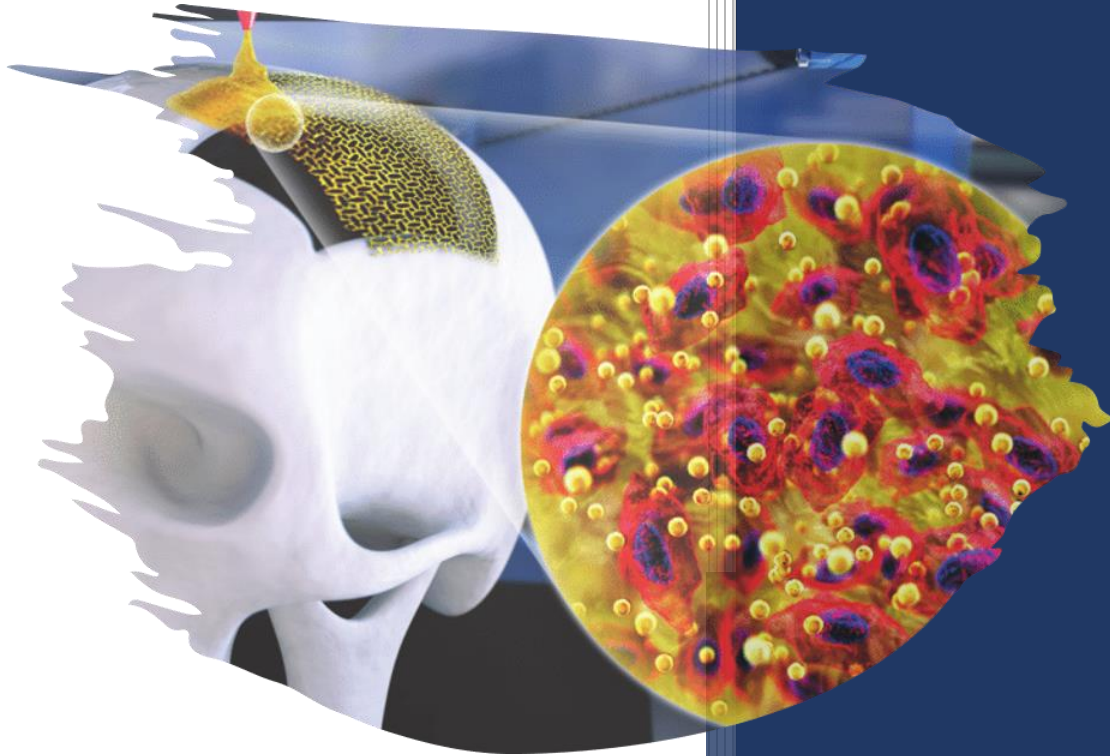


Figura 20. Espectrograma en color azul corresponde a la biotinta incubada hasta el día 21 y en rojo el espectrograma de la biotinta sin células.



CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN



UNAM. Lab. Bioingeniería de tejidos



5. DISCUSIÓN

En este estudio fueron biofabricados andamios 3D cargados con células hFOB, MG-63 y SaOs-2, usando la tecnología de bioimpresión 3D. Actualmente los andamios celulares junto con la innovación científica han estado en el centro de atención para la modulación del comportamiento, función y orientación de diferentes células, en el contexto de la ingeniería de tejidos³⁹.

La fabricación de andamios con la impresión directa de células emerge como una estrategia para la reparación de tejidos, permitiendo la homogeneidad y multicelularidad en todo el andamio, logrando una mejor interacción entre las células y una mayor rapidez en la formación de su matriz extracelular.

La composición de la biotinta y su similitud con las propiedades físicas y químicas al tejido nativo es un gran factor para lograr el éxito de la reparación tisular, es por lo que en este trabajo la biotinta que se desarrolló para la impresión de los andamios fue compuesta por gelatina que presenta señales con un alto nivel de reconocimiento celular y el alginato debido a su rápida gelificación, tratando de simular la fase orgánica de la matriz extracelular del tejido óseo, además que son polímeros naturales ampliamente utilizados para la encapsulación celular.

La fase inorgánica se trató de mimetizar por medio del uso de las nanopartículas de óxido de circonio con un tamaño de aproximadamente de 50nm, las cuales ayudan a reforzar la resistencia mecánica de la biotinta y dándole estabilidad. Cao y colaboradores, demostraron que la presencia de nanopartículas al 10% en un hidrogel mejoraba las propiedades mecánicas del biomaterial compuesto y promovía la formación de hueso nuevo en animales.⁹

Por otro lado, en nuestros estudios usamos la reticulación con CaCl_2 , la cual no afectó la composición de la biotinta, ya que todos los espectros característicos de la gelatina, alginato y ZrO_2 exhibieron los mismos picos, con sus bandas de absorción características³⁸. Como lo reportado por Hernández-Tapia y colaboradores donde mencionan que la densidad de la reticulación de la biotinta es otro factor importante que puede dificultar la migración de las células encapsuladas y su capacidad para colonizar homogéneamente la biotinta,²⁴ por ello investigamos el potencial de encapsulación y el comportamiento funcional de diversas líneas celulares óseas



dentro de la biotinta de alginato-gelatina-ZrO₂, ya que se ha reportado que existe un efecto positivo con una alta tasa de supervivencia celular después de la encapsulación celular y una buena proliferación de células como las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs),⁴⁰ células troncales mesenquimales (MSCs)⁴¹ y fibroblastos.

Luo y colaboradores, reportan que la respuesta celular positiva observada en las biotintas composites es debido a que se funcionaliza las cadenas poliméricas y se obtiene una sinergia de sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, en el caso del alginato es un polímero flexible, en que se pueden acoplar en sus cadenas los péptidos RGD (Arg-Gly-Asp) característicos de la gelatina mejorando la viabilidad celular y promoviendo la proliferación celular^{40,41}. Asimismo, la incorporación de una biocerámica como el ZrO₂ que mejora y aumenta la proliferación celular debido al aumentando del área superficial permitiendo mayores puntos de contactos para las células y mejorando las propiedades mecánicas⁴²

Nuestros resultados indican una viabilidad celular por arriba del 85% después de la encapsulación permitiendo la proliferación y diferenciación de las células. La proliferación de las células en nuestra biotinta fue creciente hasta el día 14 de cultivo celular y corroborando con las imágenes comenzaron a formar aglomeraciones relacionadas al depósito de mineral. Asimismo, la biotinta muestra que las células pueden tener una buena interacción célula-célula permitido por la porosidad y baja rigidez de la biotinta, dando más espacio para la adhesión celular y migración^{43,44}

Por otro lado, se ha demostrado que la formación de agregados en las biotintas promueve el crecimiento celular, síntesis de biomoléculas y diferenciación, debido al aumento de contactos célula-célula y por otro, por la reorganización del citoesqueleto de actina. Esto garantiza que las células creen un “microambiente” circundante y por tanto las señales biomecánicas o bioquímicas de las células vecinas representan una forma de estimular la osteodiferenciación⁴⁰. Esto último lo puede corroborar nuestros resultados por medio de la tinción con alizarina roja. Dichos datos indican la presencia de depósitos de calcio formados dentro de la biotinta a los 14 y 21 días de cultivo y que fue analizado por FTIR donde se



obtuvieron las bandas con mayor intensidad correspondientes a la estructura proteica en 1630 y 1543 cm^{-1} (N-H) para la amida I y la amida II respectivamente, bandas de absorción en 1621 y 1557 cm^{-1} (C-N) y bandas correspondientes a la hidroxiprolina, prolina, y fosfatos, sin embargo también disminuyeron las bandas de absorción características del alginato al día 21, lo cual nos puede indicar un proceso de degradación de la biotinta y la formación de una matriz extracelular mineralizada³⁹.

En general los resultados obtenidos de la encapsulación celular demostraron una metodología simple y de bajo costo, lo cual continuamos con la impresión de andamios evaluando la respuesta celular de células SaOS-2, y células MG-63, las cuales están diseñadas para modelos de estudio, con características de proliferación y producción de matriz ilimitada⁴³. Nuestros datos confirman que la encapsulación por la impresión 3D de los andamios no afecto su viabilidad y presentaron una cinética exponencial hasta el día 21. Sin embargo, es claro que las células SaOS-2 se pueden utilizar en modelos de diferenciación celular para evaluar más adelante la expresión de genes en los andamios impresos 3D debido a que su recuperación metabólica fue más rápida y con una alta actividad de ALP en comparación con los pre-osteoblastos u osteoblastos inmaduro. Todavía se desconocen los motivos de estas observaciones y se requieren más estudios para comprender los motivos de la pérdida de la función de los osteoblastos inmaduros. Sin embargo, con estos los resultados logrados hasta el momento con esta tesis doctoral podemos mencionar que la impresión 3D con la biotinta es sencilla con respuestas celulares que imitan lo que pasa in vivo, dándonos resultados con alta fidelidad de biomimetismo ya que los comportamientos celulares como; la adhesión, extensión, proliferación y migración celular, se consideran indicadores cruciales para modelos 3D in vitro.

Por último, otro factor importante para la funcionalidad ideal del andamio celular es su resistencia mecánica, que tenga la capacidad de soportar las células durante la formación de su propia matriz, tejido de novó y en paralelo su degradación. Los andamios con nanopartículas tuvieron un módulo de Young a la compresión (45.99 MPa) similar al hueso esponjoso, de acuerdo con diversos autores la fuerza de



compresión y módulo de Young del hueso trabecular del ser humano es de 3-30 MPa y 50-100 MPa respectivamente^{46,47}. En este trabajo se obtuvieron andamios 3D que pueden ser usados de manera segura y confiable ya sea como modelos de tejido óseo *in vitro* o como injertos óseos en medicina regenerativa en modelos de reconstrucción de defectos óseos *in vivo* en calvaria de rata y así mismo pueden ser una opción atractiva que abre nuevas rutas para la reconstrucción de tejidos, permitiendo su aplicación en otras áreas donde una estructura análoga de tejido fabricada por nuestro método de bioimpresión pueda servir para modelos de fisiología humana, para la administración de fármacos *in vitro* o modelos de cáncer recreando las características microambientales representativas de los tumores.



6. CONCLUSIONES

1) Los biopolímeros de alginato, gelatina permitieron desarrollar una biotinta con capacidad de mantener la integridad y viabilidad celular.

2) La presencia de las nanopartículas de óxido de circonio mejoran las propiedades mecánicas de la biotinta, aumentando el módulo de Young, y manteniendo su tensión máxima.

3) El uso de una biotinta composite permite la creación de un microambiente similar a la matriz extracelular del tejido óseo, y ayuda a la respuesta celular de las células hFOB, MG-63 y SaOS-2.

4) La biofabricación de andamios por bioimpresión 3D permite obtener estructuras complejas y compuestas cargadas de células con una viabilidad celular por arriba del 85%.

5) La evaluación de la respuesta de biocompatibilidad y bioactividad de los andamios 3D impresos con presencia de células hFOB, MG-63 y SaOS-2 indica que la impresión de los andamios depende en gran medida de la madurez de los osteoblastos.

5) Los andamios 3D fabricados podrían potencialmente usarse para aplicaciones de regeneración de tejido óseo en cirugía ortopédica y/o reconstructivas.



PERSPECTIVA DE LA INVESTIGACIÓN

- 1) Las perspectivas a futuro de este trabajo van encaminadas al diseño e impresión de andamios o constructos biológicos especializados para poder ser implantados en defectos óseos específicos de tamaño crítico, donde se puedan imprimir acorde al defecto y/o personalizados.
- 2) El modelo de defecto crítico se propone en clavarias de rata Wistar donde se pueda evaluar si la impresión personalizada de la biotinta composite permite la regeneración tisular y la funcionalidad del mismo.
- 3) Por medio del empleo de la microtomografía computarizada (μ -CT) poder evaluar la fase mineral y la calidad del mismo sin alterar el proceso de regeneración o reparación ósea.
- 4) Realizar análisis de expresión de genes durante el proceso de regeneración en el modelo de defectos tamaños críticos, teniendo en cuenta un adecuado número de muestras y permiso del comité de ética para la investigación.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li J, Wu Ch, Chu PK, Gelinsky M. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications, *Materials Science and Engineering: Reports*.2020;140:1-76.
2. Lopes D, Martins CC, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*.2018;185:240-275.
3. Qasim M, Chae DS, Lee NY. Advancements and frontiers in nano-based 3D and 4D scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14:4333-4351.
4. Zimmermann EA, Ritchie RO. Bone as a Structural Material. *Adv Healthc Mater*. 2015; 4(9):1287-304.
5. Meskinfam M. Polymer scaffolds for bone regeneration. *Characterization of Polymeric Biomaterials*, Woodhead Publishing; 2017: 441–475.
6. Filipowska J, Krzysztof AT, Niedzwiedki L, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*. 2017;20(3):291-302.
7. Prisby RD. Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone. *J Endocrinol*. 2017;235(3):1-40
8. Chu TMG, Liu SSY, Babler WJ. Craniofacial biology, orthodontics, and implants. In *basic and applied bone biology*. *Biomedical Sciences and Comprehensive Care*. 2014; 225-42
9. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int J Oral Sci*.2020; 12(6):1-15
10. Arias CF, Herrero MA, Echeverri LF, Oleaga GE, López JM. Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms. *PLoS One*. 2018;13(9):1-19
11. Guarino V, Alvarez-Perez MA. Current Advances in Oral and Craniofacial Tissue Engineering. *Current Advances in Oral and Craniofacial Tissue Engineering*. Taylor & francis group. 2020;120-138
12. Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 84:1-29
13. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*.2020; 226:1-93



-
14. Wang C, Huang W, Zhou Y, He L, He Z, Chen Z, He X, Tian S, Liao J, Lu B, Wei Y, Wang M. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*. 2020; 5(1):82-91.
 15. Neufurth M, Wang X, Wang S, Steffen R, Ackermann M, Haep ND, Schröder HC, Müller WEG. 3D printing of hybrid biomaterials for bone tissue engineering: Calcium-polyphosphate microparticles encapsulated by polycaprolactone. *Acta Biomater*. 2017; 64:377-388.
 16. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2018; 15(80):1-30.
 17. Wei S, Ma JX, Xu L, Gu XS, Ma XL. Biodegradable materials for bone defect repair. *Mil Med Res*. 2020; 7(1):2-25.
 18. Udomluck N, Koh WG, Lim DJ, Park H. Recent Developments in Nanofiber Fabrication and Modification for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2019; 21(1):1-16
 19. Kawecki F, Clafshenkel WP, Fortin M, Auger FA, Fradette J. Biomimetic Tissue-Engineered Bone Substitutes for Maxillofacial and Craniofacial Repair: The Potential of Cell Sheet Technologies. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(6):1-16
 20. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2019;15(84):16-33.
 21. Kim W, Kim G. Collagen/bioceramic-based composite bioink to fabricate a porous 3D hASCs-laden structure for bone tissue regeneration. *Biofabrication*. 2019;12(1):1-13
 22. Ji S, Guvendiren M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017; 5(23):1-8
 23. Deo KA, Singh KA, Peak CW, Alge DL, Gaharwar AK. Bioprinting 101 Design, Fabrication and Evaluation of Cell-laden 3D Bioprinted Scaffold Tissue Eng Part A. 2020;26(5-6):318-338.
 24. Hernández-Tapia LG, Fohlerová Z, Žídek J, Alvarez-Perez MA, Čelko L, Kaiser J, Montufar EB. Effects of Cryopreservation on Cell Metabolic Activity and Function of Biofabricated Structures Laden with Osteoblasts. *Materials (Basel)*. 2020; 13(8):1-14.
 25. Kyle S, Jessop ZM, Al-Sabah A, Whitaker IS. 'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(16):1-16
 26. Mora-Boza A, Lopez-Donaire ML. Preparation of Polymeric and Composite Scaffolds by 3D Bioprinting. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1058:221-245.



-
27. Genova T, Roato I, Carossa M, Motta C, Cavagnetto D, Mussano F. Advances on Bone Substitutes through 3D Bioprinting. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(19):1-28
 28. Dwivedi R, Mehrotra D. 3D bioprinting and craniofacial regeneration. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020;10(4):650-659.
 29. Xie Z, Gao M, Lobo AO, Webster TJ. 3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid. *Polymers.* 2020; 12(8):1-27
 30. Marques CF, Diogo GS, Pina S, Oliveira JM, Silva TH, Reis RL. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(3):1-12
 31. Cidonio G, Cooke M, Glinka M, Dawson JI, Grover L, Oreffo ROC. Printing bone in a gel: using nanocomposite bioink to print functionalised bone scaffolds. *Mater Today Bio.* 2019; 4:1-12
 32. Chimene D, Miller L, Cross LM, Jaiswal MK, Singh I, Gaharwar AK. Nanoengineered steoinductive bioink for 3D bioprinting bone tissue. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020; 12(14):15976-15988.
 33. Chimene D, Kaunas R, Gaharwar AK. Hydrogel bioink reinforcement for additive manufacturing: A Focused Review of Emerging Strategies. *Adv Mater.* 2020 ;32(1):1-22.
 34. Giuseppe MD, Law N, Webb B, Macrae RA, Liew LJ, Sercombe TB, Dilley RJ, Doyle BJ. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2018; 79:150-157.
 35. Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, Kim DH, Cho DW. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun.* 2014; 5:3935.
 36. Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci.* 2018; 6(5):915-946.
 37. Kjar A, McFarland B, Mecham K, Harward N, Huang Y. Engineering of tissue constructs using coaxial bioprinting. *Bioact Mater.* 2020; 6(2):460-47.
 38. Sarker B, Papageorgiou DG, Silva R, Zehnder T, Gul-E-Noor F, Bertmer M, Kaschta J, Chrissafis K, Detsch R, Boccaccini AR. Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *J Mater Chem B.* 2014;2(11):1470-82.
 39. Nemati S, Rezaabakhsh A, Khoshfetrat A, Nourazarian A, Avci CB, Bagca BG, Sardroud HA, Khaksar M, Ahmadi M, Delkhosh A, Sokullu E, Rahbarghazi R. Alginate-gelatin encapsulation of human endothelial cells



-
- promoted angiogenesis in in vivo and in vitro milieu. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017;114: 2920-30.
40. Luo Z, Zhang S, Pan J, Shi R, Liu H, Lyu Y, Han X, Li Y, Yang Y, Xu Z, Sui Y, Luo E, Zhang Y, Wei S. Time-responsive osteogenic niche of stem cells: A sequentially triggered, dual-peptide loaded, alginate hybrid system for promoting cell activity and osteo-differentiation. *Biomaterials*. 2018; 163:25-42.
 41. Anandan D, Mary Stella S, Arunai Nambiraj N, Vijayalakshmi U, Jaiswal AK. Development of mechanically compliant 3D composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(12):3267-74.
 42. Sa MW, Nguyen BB, Moriarty RA, Kamalidinov T, Fisher JP, Kim JY. Fabrication and evaluation of 3D printed BCP scaffolds reinforced with ZrO₂ for bone tissue applications. *Biotechnol Bioeng*. 2018; 115(4):989-999.
 43. Yao B, Hu T, Cui X, Song W, Fu X, Huang S. Enzymatically degradable alginate/gelatin bioink promotes cellular behavior and degradation in vitro and in vivo. *Biofabrication*. 2019;11(4):1-11
 44. Sarker B, Singh R, Silva R, Roether JA, Kaschta J, Detsch R, Schubert DW, Cicha I, Boccaccini AR. Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel. *PLoS One*. 2014; 9(9):1-12
 45. Nemati S, Alizadeh Sardroud H, Baradar Khoshfetrat A, Khaksar M, Ahmadi M, Amini H, Saberianpour S, Delkhosh A, Akbar Movassaghpour A, Rahbarghazi R. The effect of alginate-gelatin encapsulation on the maturation of human myelomonocytic cell line U937. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(1):25-35.
 46. Huang G, Wang L, Wang S, Han Y, Wu J, Zhang Q, Xu F, Lu TJ. Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels. *Biofabrication*. 2012;4(4):
 47. Razak SIA, Sharif NFA, Rahman WAW. Biodegradable polymers and their bone applications: A review. *Int. J. Basic Appl.Sci* 2012;12:31-49.



Productos logrados durante los Estudios de Doctorado:

1) Publicaciones

- **Hernández-Tapia LG**, Fohlerová Z, Žídek J, Alvarez-Perez MA, Čelko L, Kaiser J, Montufar EB. Effects of Cryopreservation on Cell Metabolic Activity and Function of Biofabricated Structures Laden with Osteoblasts. *Materials (Basel)*. 2020; 13(8):1-14.
- Montufar EB, Tkachenko S, Casas-Luna M, Škarvada P, Slámečka K, Diaz-de-la-Torre, koledova Z, **Hernández-Tapia LG**, Kaiser KJ. Benchmarking of additive manufacturing technologies for commercially pure titanium bone tissue engineering scaffolds: processing microstructure property relationship. *Additive Manufacturing*. 2020; 36:101516.

2) Capítulos de Libros

- **Hernandez- Tapia LG**, Pérez-Sánchez L, Hernández-González R, Serrano-Bello J. Craniofacial Regeneration-Bone. En:Guarino V, Alvarez-Perez M. *Current advances in oral and craniofacial tissue engineering*. Routledge;2020.p. 119-138.
- Vazquez-Vazquez Febe, **Hernandez-Tapia LG**, Chanes-Cuevas OA, Alvarez-Alvarez MA, Pozos-Guillen AJ. Airflow electrofluidodynamics. En: Guarino V, Ambrosio L. *Electrofluidodynamic Technologies (EFDTs) for Biomaterials and Medical Devices*. Woodhead Publishing;2018. p. 123-138.

3) Congresos

- 29th annual meeting, European society for biomaterials (ESB 2018). Presentación poster.
- Congreso nacional e internacional de posgrado de investigación en odontología 2019. Presentación Oral.
- XXVI Encuentro Nacional y XVII Iberoamericano de Investigación en Odontología. León, Guanajuato.2019

