



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

SÍNTESIS DE UNA BIOTINTA COMO ESTRATEGIA PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS ÓSEOS.

TESIS

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

Presenta:

M. EN C. DIANA SOFÍA NOLASQUEZ CRUZ

Tutor:

**DR. AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLEN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

Comité tutor:

**DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNAM
DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción 1 y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado "Síntesis de una biotinta como estrategia para la regeneración de tejidos óseos" que presenté para obtener el grado de Doctorado en Ciencias es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Diana Sofia Nolasquez Cruz

Número de cuenta: 308246173

Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén

Vo. Bo. Tutor principal

DEDICATORIAS

A MI FAMILIA:

Por ser siempre los principales motivadores de mis sueños, gracias por que nunca dudaron de mi capacidad y siempre me motivaron a seguir adelante. A mis padres Carmen Josefina y Arturo, a mis hermanos Ana Gabriela y Octavio Arturo.

A MI SOBRINA NATALIA VALENTINA:

Pequeño ser que llego para revolucionar mi vida, espero que esto te sirva como motivación para que luches por tus sueños.

A MI TÍA ERIKA SOLEDAD:

Gracias por tus sabios consejos y por tu apoyo incondicional.

A ÍÑIGO GAITÁN SALVATELLA:

Por aguantarme en los días malos, por siempre creer en mí, por tu cariño y apoyo incondicional, por ser la luz en mi camino y mi compañero en esta gran aventura.

A MIS QUERIDOS "FORKYS":

Lucia, José Luis, Febe, Osmar, Adrián, Margarita y Laurita +
Por brindarme su amistad y ser excelentes compañeros de laboratorio.

"Hay dos grandes días en la vida de una persona;
el día que nacemos y el día en que descubrimos para qué"
- William Barclay -

AGRADECIMIENTOS

A MI TUTOR EL DR. AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLEN:

Por su amistad, orientación y apoyo para la realización de este proyecto.

AL DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ:

Por ser guía en mi formación académica, por sus consejos y por abrirme las puertas del laboratorio de bioingeniería de tejidos de DEPeI FO.

A LA DRA. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA:

Por su colaboración en este proyecto, por sus enseñanzas y apoyo, por compartirme de su experiencia; no existen palabras para agradecerle la confianza puesta en mí.

AL DR. DANIEL CHAVARRÍA BOLAÑOS de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica por su colaboración para la realización de ensayos de caracterización.

AL DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS miembro de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por tu aporte mediante la donación de la línea celular para ensayos biológicos.

A mi comité tutor el Dr. Rene García Contreras y la Dra. Argelia Almaguer por su tiempo, observaciones y apoyo brindado en cada evaluación semestral.

INSTITUCIONALES

A mi universidad, máxima casa de estudios y mi segunda casa. Orgullosamente egresada de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de maestría y doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud (PMDCMOS), UNAM.

Al proyecto DGAPA UNAM PAPIIT IN213821 y IN202924

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado con número de apoyo 752220 y número de cvu: 854964

Índice

| | |
|---|----|
| Índice de figuras | 3 |
| Índice de abreviaturas | 4 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 8 |
| I. Introducción | 9 |
| II. Marco teórico | 11 |
| 1. Tejido óseo | 12 |
| 1.1 Matriz extracelular ósea | 12 |
| 1.2 Células del hueso | 13 |
| 1.2.1 Osteoblastos | 13 |
| 1.2.2 Células de revestimiento óseo | 14 |
| 1.2.3 Osteocitos | 15 |
| 1.2.4 Osteoclastos | 15 |
| 2. Regeneración del tejido óseo | 16 |
| 3. Estructura jerárquica del hueso | 19 |
| III. Antecedentes | 23 |
| 4. Ingeniería de tejidos | 24 |
| 5. Descelularización | 27 |
| 5.1 Métodos de descelularización | 28 |
| 5.2 Evaluación de la descelularización | 30 |
| 6. Bioimpresión 3D | 30 |
| 6.1 Biotintas | 31 |
| 6.2 Tecnologías de bioimpresión 3D | 33 |
| 6.2.1 Bioimpresión basada en inyección de tinta | 33 |
| 6.2.2 Bioimpresión asistida por láser | 34 |
| 6.2.3 Bioimpresión basada en extrusión | 35 |
| IV. Justificación | 36 |
| V. Diseño experimental | 37 |
| 1. Pregunta de investigación | 37 |
| 2. Hipótesis | 37 |
| 3. Objetivos | 37 |
| 3.1 Objetivo general | 37 |
| 3.2 Objetivos específicos | 37 |
| VI. Metodología | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Obtención de matriz extracelular descelularizada de vejiga urinaria porcina (dMEC-UBM) | 39 |
| 1.1 Fuente tisular | 39 |
| 1.2 Protocolos de descelularización | 39 |
| 2. Evaluación del proceso de descelularización dMEC-UBM | 41 |
| 2.1 Procesamiento histológico | 41 |
| 2.2 Tinción con DAPI | 41 |
| 2.3 Cuantificación de ADN | 41 |
| 3. Caracterización fisicoquímica y ultraestructural dMEC-UBM | 42 |
| 3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 42 |
| 3.2 Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)... | 42 |
| 3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 42 |
| 3.4 Análisis termogravimétrico (TGA) | 42 |
| 4. Síntesis de biotinta | 42 |
| 4.1 Cultivo celular | 42 |
| 4.2 Síntesis polvo de dMEC | 43 |
| 4.3 Síntesis de biotintas | 43 |
| 4.4 Caracterización térmica (DSC/TGA) de la biotinta | 43 |
| 5. Bioimpresión 3D | 44 |
| 5.1 Diseño del andamio | 44 |
| 5.2 Bioimpresión de andamios 3D | 44 |
| 6. Biocompatibilidad del andamio 3D bioimpreso | 44 |
| 6.1. Ensayo de viabilidad celular | 44 |
| 7. Análisis estadístico | 45 |
| VII. Resultados | 46 |
| 1. Eficiencia de la descelularización de la vejiga urinaria porcina | 47 |
| 2. Caracterización de dMEC-UBM | 51 |
| 3. Evaluación de la biocompatibilidad del andamio 3D bioimpreso... | 54 |
| VIII. Discusión | 61 |
| IX. Conclusiones | 67 |
| X. Bibliografía | 68 |

Índice de figuras

1. Matriz extracelular ósea
2. Células del hueso
3. Estructura jerárquica del hueso
4. Anatomía y estructura del tejido óseo
5. Tipos de injertos
6. Triada de la ingeniería de tejidos
7. Paradigma central de la ingeniería de tejidos
8. Descelularización
9. Métodos de descelularización
10. Biotinta
11. Propiedades óptimas de las biotintas
12. Tecnologías de bioimpresión 3D
13. Bioimpresión asistida por láser
14. Bioimpresión basada en extrusión
15. Resumen gráfico de la metodología
16. Protocolos de descelularización de MEC-UBM
17. Eficiencia macroscópica de la descelularización
18. Tinción histológica H&E
19. Tinción DAPI
20. Cuantificación de ADN
21. Caracterización por SEM de dMEC-UBM
22. Caracterización por FT-IR de dMEC-UBM
23. Perfil de calorimetría diferencial de barrido de dMEC-UBM
24. Perfil termogravimétrico de dMEC-UBM
25. Síntesis de polvo dMEC-UBM
26. Perfil de calorimetría diferencial de barrido de las tintas
27. Perfil termogravimétrico de las tintas
28. Diseño del andamio 3D
29. Distribución de las células en el andamio
30. Evaluación de la distribución celular por marcaje CellTracker-DAPI
31. Viabilidad celular del andamio 3D bioimpreso
32. Seguimiento de viabilidad

Índice de abreviaturas

Siglas

| | |
|----------|--|
| CENATRA | (Centro Nacional de Trasplantes) |
| CONAHCYT | (Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología) |
| DEPeI | (División de Estudios de Posgrado e Investigación) |
| DGAPA | (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) |
| FDA* | (Administración de Alimentos y Medicamentos) |
| FO | (Facultad de Odontología) |
| OMS | (Organización Mundial de la Salud) |
| ONT | (Organización Nacional de Trasplantes) |
| PAPIIT | (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) |
| PMDCMOS | (Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud) |
| UNAM | (Universidad Nacional Autónoma de México) |

Símbolos

| | |
|------------------|--|
| Ca | Calcio |
| cm ⁻¹ | Centímetros a la menos uno |
| cm ² | Centímetros cuadrados |
| g | Gramos |
| H | Hidrogeno |
| Hz | Hertzios |
| L | Litros |
| mBar | Milibar |
| min | Minutos |
| mg | Miligramos |
| M/G | Proporción bloques |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mM | Minimolar |
| mol | Moles |
| nm | Nanómetros |
| O | Oxígeno |
| P | Fosforo |
| pL | Picolitros |
| ps | Picosegundos |
| RGD | Motivos unión (arginina-glicina-ácido aspártico) |
| s | Segundos |
| Tg | Temperatura de transición vítrea |

| | |
|----|-------------------------|
| Tm | Temperatura de fusión |
| U | Unidades |
| °C | Grados Celsius |
| % | Porcentaje peso volumen |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| µm | Micrómetros |

Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| 2D | Bidimensional |
| 3D | Tridimensional |
| ANOVA* | Análisis de varianza |
| ACTB* | Beta actina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ALG | Alginato |
| ALP* | Fosfatasa alcalina |
| BMP's* | Proteínas morfogenéticas óseas |
| BSA* | Albumina sérica bovina |
| BSP* | Sialoproteína ósea |
| CAD* | Diseño asistido por computadora |
| COL1* | Colágena tipo 1 |
| DAPI | (4',6-diamidino-2-fenilindol) |
| DICOM* | Imágenes digitales y comunicaciones en medicina |
| DMP1* | Proteína de matriz de dentina 1 |
| dMEC | Matriz extracelular descelularizada |
| DSC* | Calorimetría de barrido diferencial |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FACIT* | Colágenos asociados a fibrillas con triples hélices interrumpidas |
| FGF* | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| FT-IR* | Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier |
| GM-CSF* | Factor estimulante de colonia granulocito-macrófago |
| H&E | Tinción hematoxilina-eosina |
| hGF-MSC* | Células troncales mesenquimales de tejido gingival humano |
| IGF-1* | Factor de crecimiento insulínico tipo 1 |
| IGF-2* | Factor de crecimiento insulínico tipo 2 |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| LAB* | Bioimpresión asistida por láser |

| | |
|--------|--|
| M-CSF* | Factor estimulante de colonias de macrófagos |
| MEC | Matrix extracelular |
| MRI* | Imágenes de resonancia magnética |
| MSC* | Células troncales mesenquimales |
| OCN* | Osteocalcina |
| OPG | Osteoprotegerina |
| OPN | Osteopontina |
| PAA* | Ácido peracético |
| PBS | Buffer de fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de polimerasa |
| PDGF* | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PTH | Hormona paratiroidea |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SEM | Microscopia electrónica de barrido |
| SFB | Suero fetal bovino |
| STL* | Formato de archivo para estereolitografía |
| TBS* | Buffer (PBS/Tween20) |
| Tg | Temperatura de |
| TGA* | Termogravimetría |
| TGFβ* | Factor de crecimiento transformante β |
| Tm | Temperatura de |
| UBM* | Matriz de vejiga urinaria |
| VEGF* | Factor de crecimiento vascular endotelial |

* Por sus siglas en ingles

Resumen

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación interdisciplinario enfocado en brindar alternativas para restaurar mantener o mejorar un órgano o tejido que se pueda encontrar enfermo, dañado o perdido. Dentro de dichas estrategias se incluye la bioimpresión 3D, la cual consiste en el desarrollo de andamios capaces de madurar en equivalentes de tejido a través del uso de los principios y técnicas de la impresión 3D. La idea de bioimprimir órganos y tejidos es un enfoque actualmente en desarrollo que ofrece de una alternativa prometedora a los injertos obtenidos a través de un proceso de donación, es decir de origen alogénico. Para tener éxito, el biomaterial cargado con células también llamado biotinta, debe cumplir con una serie de requisitos dentro de los cuales se incluyen: imprimibilidad, diversas propiedades mecánicas, biocompatibilidad, biodegradación entre otros.

Debido a todos estos requisitos actualmente la lista de materiales compatibles con el proceso de bioimpresión y con las células es limitado. Por ende, el uso de matrices descelularizadas se plantea como una herramienta viable para la optimización de biotintas no solo por la preservación de componentes de matriz sino por la alternativa que ofrece para utilizar tejidos de origen alogénico que han sido descartados para su uso como trasplante e incluso brinda la opción de utilizar tejidos de origen xenogénico.

En el presente trabajo, se obtuvieron matrices descelularizadas de mucosa de vejiga urinaria porcina por medio de la implementación de protocolos para descelularización de tejidos basados en el uso de los detergentes dodecilsulfato sódico (SDS) y tritón x-100; dichas matrices se caracterizaron por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), caracterización térmica por termogravimetría (TGA) y calorimetría de barrido diferencial (DSC). Posteriormente se sintetizó una biotinta a partir de alginato de sodio (ALG) y el polvo de matriz descelularizada obtenido. Finalmente demostramos la citocompatibilidad de la biotinta por su capacidad de mantener la viabilidad celular de andamios 3D bioimpresos con tecnología de bioimpresión basada en extrusión.

Abstract

Tissue engineering is an interdisciplinary field of research focused on providing alternatives to restore maintain or improve an organ or tissue that may be found to be damaged or lost. These strategies include 3D bioprinting, which consists of the development of scaffolds capable of maturing into tissue equivalents through the use of the principles and techniques of 3D printing. The idea of bioprinting organs and tissues is an approach currently under development that offers a promising alternative to grafts obtained through a donation process i.e. of allogeneic origin. To be successful, the biomaterial loaded with cells also called bioink, must meet a series of requirements within which include: printability, various mechanical properties, biocompatibility, biodegradation among others.

Due to all these requirements, the list of materials compatible with the bioprinting process and with the cells is currently limited. Therefore, the use of decellularized matrices is proposed as a viable tool for the optimization of bioinks not only for the preservation of matrix components but for the alternative it offers to use tissues of allogeneic origin that have been discarded for use as transplantation and even provides the option of using tissues of xenogenic origin.

In the present work, decellularized matrices of porcine urinary bladder mucosa were obtained through the implementation of protocols for tissue decellularization based on the use of sodium dodecyl sulfate (SDS) and triton x-100 detergents; These matrices were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and thermal characterization by thermogravimetry (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Subsequently, a bioink was synthesized from sodium alginate (ALG) and the decellularized matrix powder obtained. Finally, we demonstrate the cytocompatibility of bioink for its ability to maintain cell viability of bioprinted 3D scaffolds with extrusion-based bioprinting technology.

1. Introducción

I. Introducción

La regeneración es un proceso que se lleva a cabo en el cuerpo humano a lo largo de la vida si bien algunos órganos y tejidos se regeneran continuamente mientras que otros presentan una capacidad limitada de auto reparación, por ese motivo después de sufrir de un daño extenso debido a una lesión o enfermedad esta capacidad de regeneración de los tejidos puede no ser suficiente para hacer frente al daño y en algunos casos se forma un tejido cicatricial afuncional, en cuyo caso la mejor opción terapéutica es llevar a cabo algún tipo de injerto o trasplante el cual se define como el acto de transferir células tejidos u órganos de un sitio a otro con la finalidad de sustituir un órgano o tejido dañado por otro sano para restituir las funciones perdidas.

De acuerdo con el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) el listado de órganos y tejidos trasplantables incluye: pulmones, corazón, riñón, hígado, páncreas, mucosa de intestino y estómago, sangre, cornea, dermis, tejido óseo entre otros. Este procedimiento medico representa uno de los adelantos terapéuticos más importantes de las últimas décadas dentro del campo de la salud, se considera una terapia exitosa cuya principal dificultad hoy en día no es la técnica quirúrgica, el posible rechazo o el tratamiento de las complicaciones, sino la escasez de órganos que provoca un aumento de la morbilidad de decenas de miles de pacientes cada año.

La publicación oficial del Newsletter Transplant un reporte anual elaborado por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) de España en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe más reciente correspondiente al año 2022 reporta un total de 39,309 trasplantes realizados entre 16 países de América latina y 27 países de la unión europea con un cifra estimada de 139,040 trasplantes realizados a nivel mundial; sin embargo estas cifras cubren alrededor del 13% de las necesidades de trasplantes en el mundo cifradas por la OMS en más de 1 millón cada año.

La demanda creciente de tejidos y órganos para trasplante ha ampliado los campos de investigación generando diversos enfoques en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa; este campo de investigación abarca una amplia gama de disciplinas que trabajan en diversas estrategias para la regeneración o sustitución de tejidos y órganos dañados por la edad, defectos congénitos y enfermedades o traumatismos. Dichos enfoques incluyen el uso de células, biomoléculas y biomateriales, para reemplazar eficazmente el tejido faltante tanto estructural como funcionalmente.

II. Marco teórico

II. Marco teórico

1. Tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo complejo que desempeña diversas funciones en el cuerpo humano (figura 1), dentro de ellas se incluyen **funciones mecánicas** como soporte y protección de tejidos blandos, brindar de la estructura principal para la unión de músculos, ligamentos y tendones permitiendo el movimiento y la locomoción; **funciones sintéticas** ya que es la estructura de almacenamiento de la medula ósea proporcionando de un nicho de células troncales hematopoyéticas; así como **funciones metabólicas** debido a que sirve como un depósito no solo de minerales sino también de factores de crecimiento y citocinas, participando en el equilibrio ácido-base y en la regulación de calcio y fósforo. (Ansari, 2019; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015)

1.1 Matriz extracelular ósea

La matriz extracelular del tejido óseo consiste en una red compleja y organizada compuesta por una fase inorgánica que corresponde aproximadamente al 70% del peso total y una fase orgánica del 20-21% (figura 1) con un estimado de 9-10% de contenido de agua. La fase inorgánica se encuentra compuesta por iones de fósforo y calcio en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. También se encuentran presentes cantidades significativas de bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio.

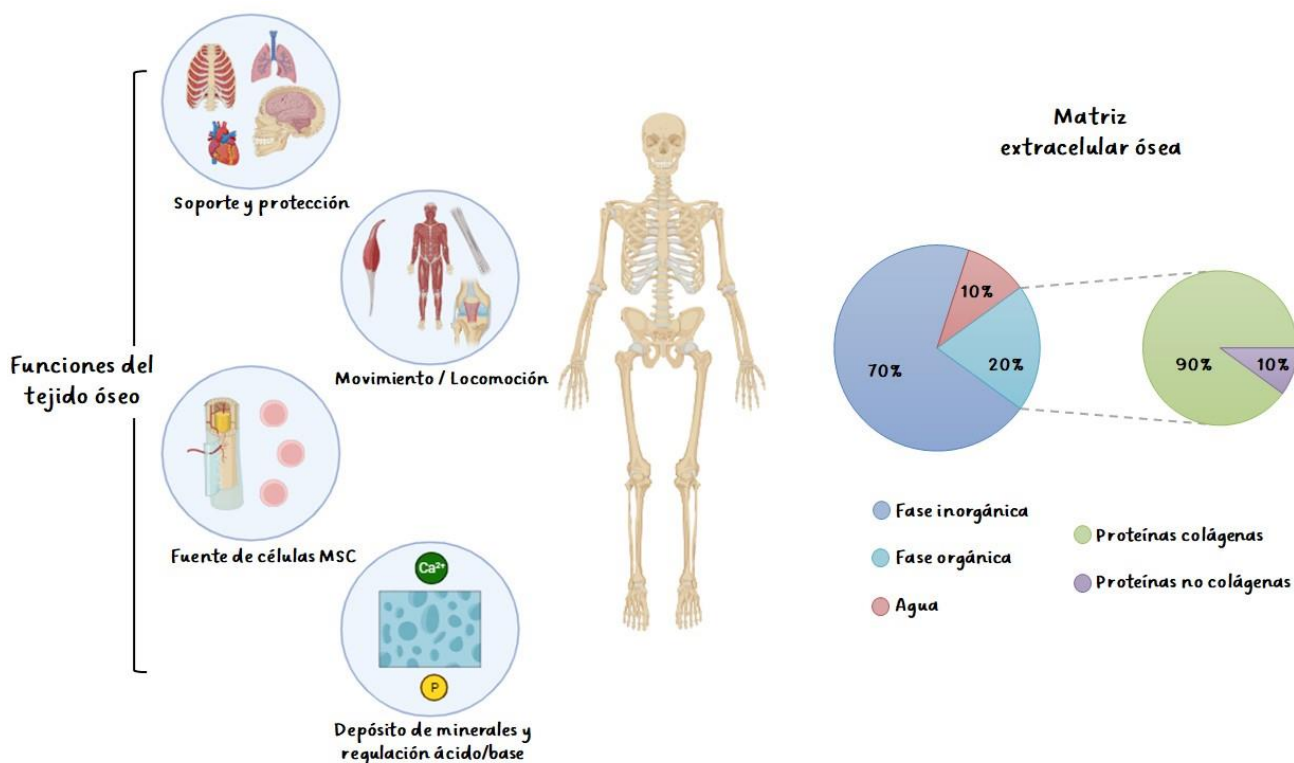


Figura 1. Matriz extracelular ósea. De lado izquierdo se muestran representaciones de las diversas funciones del tejido óseo y de lado derecho la composición de la matriz extracelular del tejido óseo y las proporciones correspondientes. Imagen creada con BioRender.com

La fase orgánica se constituye por proteínas colágenas y proteínas no colágenas; dentro de las proteínas colágenas el 90% consiste en colágena tipo I (COL1), pero se cuenta con la presencia de otros tipos como III, IV, V, VI y FACIT (un grupo de colágenas no fibrilares que sirven como puentes moleculares, en esta familia se incluyen los tipos IX, XII, XIV, XIX y XXI); las proteínas no colágenas abarcan proteoglicanos, proteínas glicosiladas, glucoproteínas, lípidos y factores de crecimiento (Clarke, 2008; Collins et al., 2021; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001).

La presencia de componentes orgánicos aporta la flexibilidad al tejido mientras que los componentes inorgánicos proporcionan la rigidez y resistencia. Las propiedades y funciones mecánicas, biológicas y químicas de los huesos dependen su estructura jerárquica y la organización precisa de las fases tanto orgánica como inorgánica (Clarke, 2008; Collins et al., 2021; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001).

1.2 Células del hueso

El hueso es un tejido dinámico compuesto por células metabólicamente activas, como se muestra en la figura 2, los componentes celulares presentes consisten en los elementos hematopoyéticos de la medula ósea, células precursoras osteogénicas, osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteoclastos y osteocitos. La medula ósea contiene una pequeña población de células troncales mesenquimales pluripotentes capaces de dar lugar a distintos linajes celulares como hueso, cartílago, tejido adiposo y tejido conjuntivo fibroso, distinta de la población de células troncales hematopoyéticas que da lugar a los linajes de células sanguíneas. Son estas células las responsables de dar origen a las células osteoprogenitoras bajo las condiciones ambientales adecuadas (Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008).

1.2.1 Osteoblastos

Los osteoblastos representan entre el 4-6% del total de células presentes en el tejido óseo, son células cuboidales de entre 15-30 μm de tamaño con un núcleo esférico y se localizan a lo largo de la superficie ósea (figura 2), presentan características morfológicas asociadas a células sintetizadoras de proteínas que incluyen un abundante retículo endoplásmico rugoso y prominente aparato de Golgi. Son células metabólicamente activas capaces de secretar proteínas de la matriz osteoide que posteriormente se mineraliza dando lugar a la formación del tejido óseo; dentro de dichas proteínas se incluye COL1 y proteínas no colágenas como fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteonectina, osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP); la síntesis de tales proteínas se consideran marcadores del estado de diferenciación osteoblástico.

Además, los osteoblastos también secretan una gran variedad de citocinas como la interleucina 6 y 11, factores estimuladores de colonias como el factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor estimulante de colonia de macrófago (M-CSF). También secretan osteoprotegerina (OPG) y diversos factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factor de crecimiento transformante beta (TGF β) factor de crecimiento tipo insulina (IGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

A medida que cesa su actividad formadora de tejido óseo algunos osteoblastos se convierten en osteocitos mientras que otros como se muestra en la figura 2, permanecen en la superficie

perióstica o endóstica del hueso como células de revestimiento (Ansari, 2019; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001). Los osteoblastos se derivan de células troncales mesenquimales (MSC) de la medula ósea y otros tejidos conectivos; dicho proceso de diferenciación celular hacia el linaje osteoprogenitor requiere de la expresión de genes específicos (la vía canónica Wnt/ β catenina y proteínas asociadas), incluida la síntesis de proteínas BMPs y la expresión de los factores de transcripción asociados (Ansari, 2019; Florencio-Silva et al., 2015).

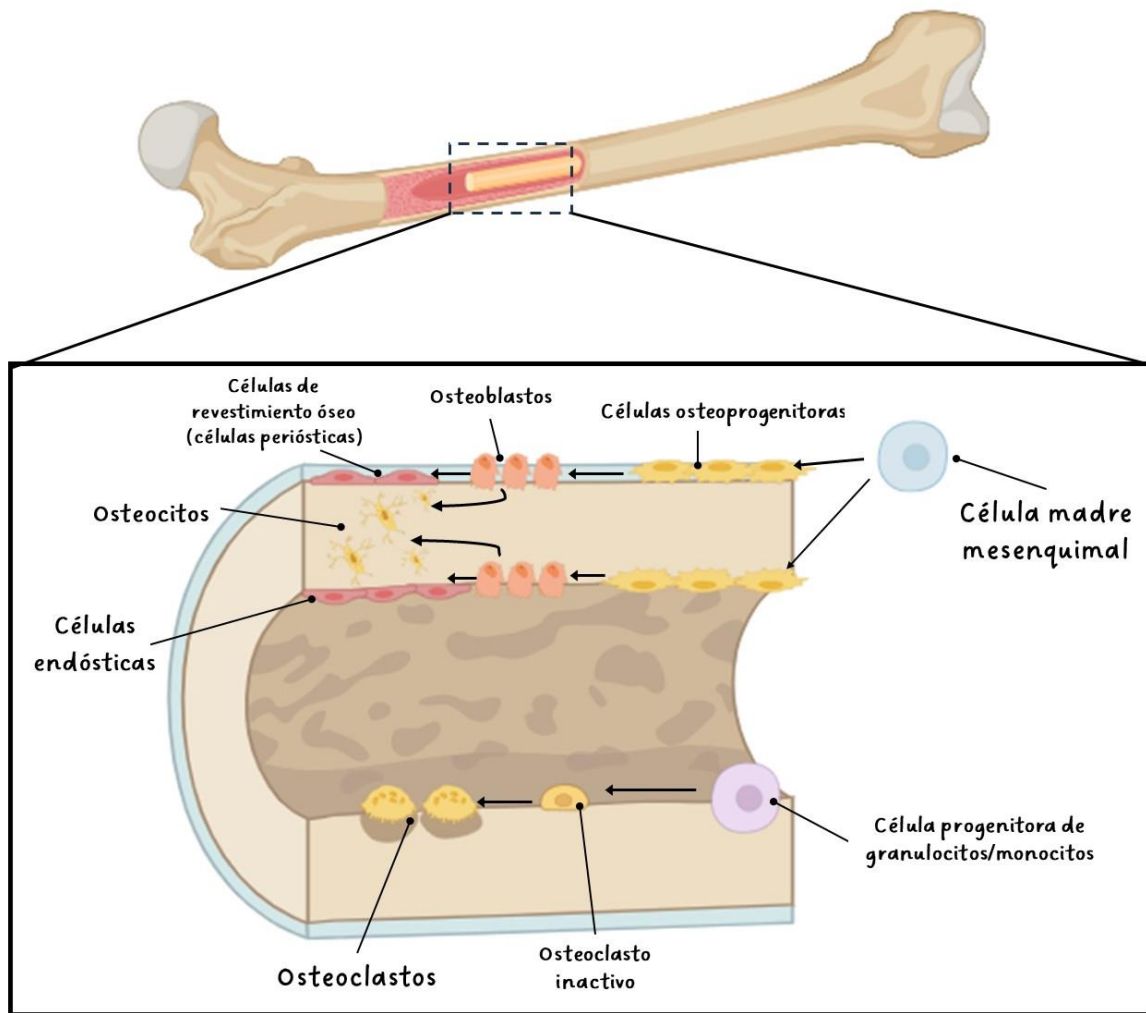


Figura 2. Células del hueso. Se muestra la distribución de las células presentes en el tejido óseo. Imagen creada con BioRender.com

1.2.2 Células de revestimiento óseo

Las células de revestimiento óseo presentan un perfil nuclear delgado y plano, su citoplasma se extiende a lo largo de la superficie ósea, muestran pocos organelos citoplasmáticos y uniones comunicantes con las células de revestimiento adyacentes y osteocitos. Estas células se consideran osteoblastos quiescentes (osteoblastos inactivos) ya que presentan la capacidad de rediferenciarse tras la exposición a la hormona paratiroidea (PTH) o fuerzas mecánicas y adquirir nuevamente su actividad secretora; la cual dependerá del estado fisiológico del hueso por lo que desempeñan un papel importante en la homeostasis del tejido óseo (Ansari, 2019; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015).

1.2.3 Osteocitos

Los osteocitos provienen de osteoblastos diferenciados terminalmente, dicho proceso se acompaña de cambios morfológicos y ultraestructurales dentro de los cuales destacan la reducción del tamaño, disminución de orgánulos y aumento de la relación núcleo-citoplasma aunado a la disminución varios de los marcadores de osteoblastos antes mencionados como OCN, BSP, COL 1 y ALP; por otro lado, se expresan en gran medida proteínas como la esclerostina y la proteína de matriz de dentina 1 (DMP1).

Los osteocitos son las células más abundantes y longevas del tejido óseo, representan alrededor del 90-95% de las células óseas totales y se localizan dentro de lagunas rodeados de matriz ósea mineralizada (figura 2); estas células presentan una morfología dendrítica (forma estrellada) con entre 50-80 prolongaciones citoplasmáticas de 15 μm de longitud que cruzan pequeños túneles que se encuentran en el espacio de la laguna llamados canaliculos, formando el sistema lacuno-canalicular del osteocito. Tales procesos citoplasmáticos están interconectados mediante uniones comunicantes con osteocitos vecinos, osteoblastos y células de revestimiento óseo, estas uniones célula-célula junto con la comunicación que se logra mediante el líquido intersticial permite el transporte intercelular de pequeñas moléculas de señalización y más relevante aun este sistema de comunicación convierte a los osteocitos en las células sensoriales del hueso, capaces de detectar presiones y cargas mecánicas, promoviendo la traducción de estos estímulos en señales bioquímicas (función de mecanotransducción). De esta forma, los osteocitos actúan como los orquestadores del proceso de remodelación ósea, a través de la regulación de actividades de osteoblastos y osteoclastos (Ansari, 2019; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001).

1.2.4 Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas diferenciadas terminalmente de la estirpe de los macrófagos. Se originan a partir de células mononucleares del linaje de células troncales hematopoyéticas, que bajo la influencia del factor M-CSF secretado por células osteoprogenitoras y osteoblastos, y el ligando RANK, secretado por osteoblastos y osteocitos, promueven la activación de los factores de transcripción y la expresión génica en los osteoclastos. La función de estas células es reabsorber el hueso por medio de la liberación de enzimas hidrolíticas que disuelven las matrices inorgánicas y orgánicas del hueso produciendo hoyos erosivos en la superficie del hueso conocidos como lagunas de Howship. Dicho proceso de reabsorción ósea participa en la remodelación del tejido óseo y es controlado por mecanismos tanto hormonales como celulares (Ansari, 2019; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001).

2. Regeneración del tejido óseo

El hueso es un tejido que experimenta procesos fisiológicos de crecimiento, modelado y remodelación. El proceso de **crecimiento** longitudinal y radial se presentan durante la niñez y la adolescencia. El crecimiento o formación ósea se produce biológicamente por osificación intramembranosa y osificación endocondral según el tipo de hueso. En el primer caso el proceso de formación ósea implica la diferenciación directa de las células MSC o células osteoprogenitoras en osteoblastos mediante la expresión de factores de transcripción y varias proteínas relacionadas con el hueso, este tipo de osificación es común en el desarrollo del cráneo y otros huesos planos; por otra parte, en la osificación endocondral las células progenitoras forman una plantilla cartilaginosa intermedia en los extremos epifisarios de los huesos largos, este cartílago invadido por vasos sanguíneos madura posteriormente a medida que los condrocitos hipertróficos presentes producen colágena tipo X mientras que los osteoblastos invaden reemplazando progresivamente al cartílago (Cartmell et al., 2012; Liu et al., 2016).

Por otro lado, en el proceso de **modelado óseo** los huesos cambian su forma como respuesta a diversos estímulos fisiológicos y mecánicos. El **remodelado óseo** es el proceso mediante el cual se reemplaza el tejido óseo micro dañado por otro sano para preservar sus funciones, la homeostasis mineral y para mantener la resistencia ósea actuando como un sistema de prevención de fracturas. Este proceso implica la eliminación de hueso viejo, su reemplazo con matriz osteoide y posterior mineralización (Chocholata et al., 2019; Clarke, 2008).

El ciclo de remodelado óseo se lleva a cabo por medio de unas estructuras anatómicas temporales denominadas unidades multicelulares básicas (UMB) las cuales están compuestas por un grupo de osteoclastos por delante formando el cono de corte y un grupo de osteoblastos por detrás formando el cono de cierre, asociados a vasos sanguíneos e inervación periférica y cubierta por un dosel de células de revestimiento que en conjunto forman el compartimiento de remodelación ósea (BRC) (Ansari, 2019; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015).

El proceso de remodelación consiste en las siguientes fases:

- Fase de activación
- Fase de reabsorción
- Fase de transición o reversión
- Fase de formación

La remodelación comienza con una **fase de activación**, este paso implica el reclutamiento y activación de precursores de osteoclastos, monocitos y macrófagos mononucleares de la circulación, el levantamiento del endostio que contiene a las células de revestimiento y la fusión de múltiples células mononucleares para formar preosteoclastos. Aunque los sitios de remodelación pueden presentarse aleatoriamente, también se encuentran dirigidos a las áreas que requieren reparación como es en el caso de fracturas; en tal situación se presenta una fase inflamatoria y es debido a la interrupción de los vasos sanguíneos que se forman hematomas y se

infiltran las células inflamatorias (macrófagos, monocitos, linfocitos y células polimorfonucleares) y fibroblastos mediados por prostaglandinas, formando un tejido de granulación. En esta fase bajo la acción de factores osteoclastogénicos (RANKL y M-CSF) las células troncales hematopoyéticas se reclutan en áreas específicas y se diferencian en osteoclastos maduros (Ansari, 2019; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001).

La siguiente fase llamada “**iniciación o reabsorción**” consiste en la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos de todo el hueso dañado o envejecido, este proceso dura aproximadamente 2-4 semanas, como se mencionó anteriormente la formación, activación y resorción de los osteoclastos se encuentra regulada por RANKL, la OPG, IL-1 e IL-6, factor estimulante de colonias, la hormona PTH, 1,25-dihidroxitamina D y la calcitonina, adicionalmente la apoptosis de los osteocitos actúa como una señal quimiotáctica para el reclutamiento local de osteoclastos.

Es importante mencionar que la reabsorción ósea ocurre solo cuando los osteoclastos se unen a la superficie ósea mineralizada por medio de los receptores de integrina de la membrana que reconocen y se unen a motivos RGD y otras secuencias presentes en proteínas de matriz ósea como OPN, BSP, fibronectina, laminina y colágena. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la resorción ósea es por medio de la secreción de iones hidrógeno a través de bombas de protones H-ATPasa y canales de cloruro de las membranas celulares de los osteoclastos hacia el compartimiento de remodelación para reducir el pH dentro del compartimiento (alrededor de 4.5 pH). Aunado a esto, los osteoclastos secretan fosfatasa ácida resistente al tartrato, catépsina K y metaloproteinasas de matriz para digerir las matrices orgánicas e inorgánicas formando las lagunas de Howship (Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015).

A continuación, se presenta la **fase de transición o reversión**, en cual la reabsorción ósea cesa para dar lugar a la formación de hueso. En las cavidades o lagunas de Howship formadas al término de la fase de reabsorción se encuentran una variedad de células mononucleares, incluidos monocitos, osteocitos liberados de la matriz ósea y preosteoblastos reclutados para comenzar la fase de formación de matriz ósea. Durante esta fase del ciclo de remodelado se presenta un proceso muy importante llamado mecanismo de acoplamiento, el cual consiste en la comunicación directa entre las células y la comunicación indirecta por la presencia de diferentes factores de acoplamiento solubles almacenados en la matriz ósea, que son liberados al medio extracelular después de la actividad de los osteoclastos. Factores como IGF, BMPs, PDGF, TGF β , IGF-1, IGF-2, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) son algunas de las señales de acoplamiento que vinculan el final de la reabsorción ósea y el comienzo de la formación ósea.

Finalmente, la **fase de formación** dura aproximadamente de 4-6 meses, la síntesis de la matriz ósea consiste en dos pasos principales:

- Depósito de matriz orgánica
- Mineralización de la matriz orgánica

En el primer paso, los osteoblastos secretan las proteínas colágenas, proteínas no colágenas y proteoglicanos, posteriormente la mineralización se lleva a cabo en dos fases:

- Fase vesicular
- Fase fibrilar.

La fase vesicular consiste en la síntesis y liberación de vesículas que contienen iones de calcio y fosfato los cuales se obtienen a partir de la degradación enzimática de proteoglicanos y compuestos ricos en fosfato por medio de la actividad enzimática de los osteoblastos. Estas vesículas proveen el microambiente adecuado permitiendo la nucleación de los cristales de hidroxapatita.

La fase fibrilar se presenta cuando la sobre saturación de los iones de calcio y fosfato dentro de las vesículas provoca su ruptura y liberación de los cristales que se extienden a las fibras de colágena de la matriz orgánica; la estructura de las moléculas de triple hélice de COL1 (aproximadamente 300nm de longitud y 1.5 nm de diámetro) presentan espacios denominados agujeros dentro de la fibrilla, estos orificios se alinean para formar ranuras extendidas delgadas de aproximadamente 1.5 nm de espesor llamadas ranuras en las que se forman estos cristales interfibrilares a lo largo del eje c de las fibras de colágena.

Al final del proceso de formación ósea alrededor del 50-70% de los osteoblastos sufren apoptosis mientras que el resto se convierte en osteocitos o células del revestimiento óseo. El resultado final de cada ciclo de remodelación es la producción de una nueva osteona (Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001; Liu et al., 2016; Reznikov et al., 2014).

La remodelación ósea es un proceso complejo que involucra la formación, proliferación, diferenciación y actividad de osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de revestimiento óseo; todo el ciclo de remodelado está controlado por factores locales y sistémicos. Dentro de los factores locales se incluyen moléculas autocrinas y paracrinas como factores de crecimiento, citocinas y prostaglandinas sintetizadas por las células óseas, además de moléculas que se liberan durante el proceso de reabsorción ósea. Los factores sistémicos incluyen la hormona PTH, la calcitonina, la 1,25-dihidroxitamina D3 (calcitriol), los glucocorticoides, los andrógenos y los estrógenos. Por otra parte, la angiogénesis juega un papel muy relevante en el proceso de osteogénesis ya que el establecimiento de una red de vasos sanguíneos es esencial para un adecuado suministro de nutrientes y eliminación de productos de desecho, cualquier alteración en el aporte vascular al tejido óseo podría conducir a una formación ósea irregular y a diversas patologías. Existen diversos factores involucrados en el proceso de vascularización como: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), FGF, TGF β , BMP-2, 7, 9 beta, IGF y PDGF entre otros (Black et al., 2015; Cartmell et al., 2012; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015; Kalfas, 2001; Reznikov et al., 2014).

3. Estructura jerárquica del hueso

El hueso es un compuesto heterogéneo anisotrópico cuyos principales componentes pueden organizarse en varios niveles de estructura jerárquica desde la escala macro hasta la escala nanométrica (Chocholata et al., 2019; Liu et al., 2016; Rho et al., 1998). (figura 3) Estos niveles son:

1. Macroestructura: hueso esponjoso y cortical
2. Microestructura (10-500 μm): sistemas de Havers, osteonas, trabéculas individuales
3. Submicroestructura (1-10 μm): lamelas
4. Nanoestructura (100 nm-1 μm): colágena fibrilar y mineral incrustado
5. Subnanoestructura (< 100 nm): estructura molecular de elementos constituyentes, como minerales, colágena y proteínas no colágenas.

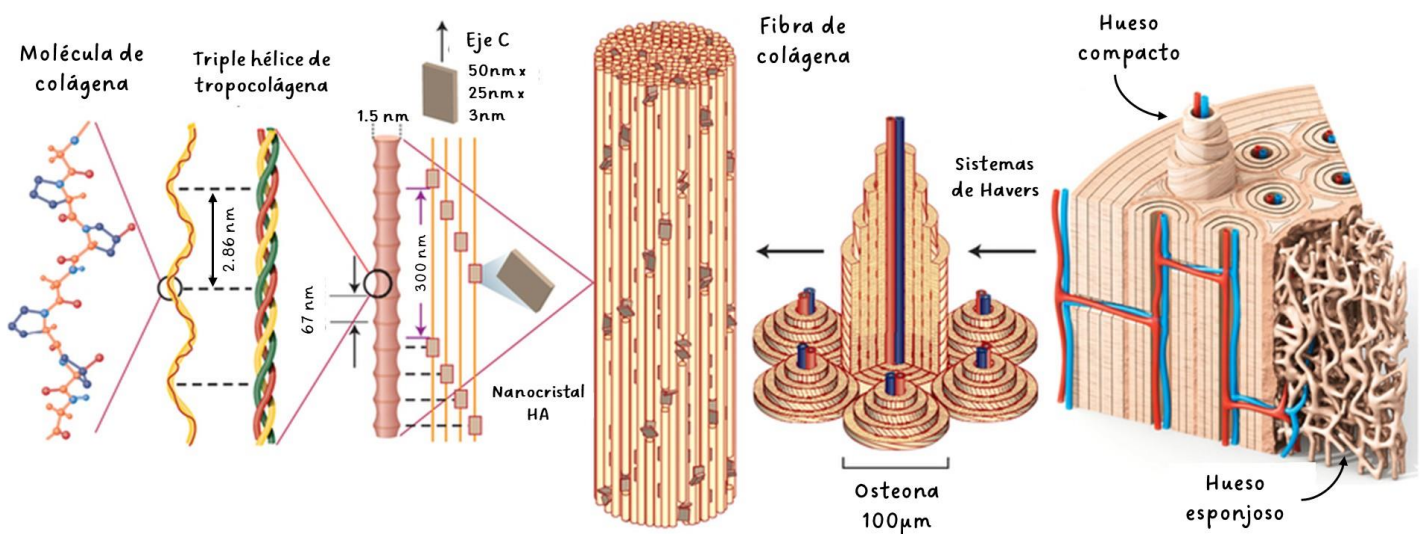


Figura 3. Estructura jerárquica del hueso. Esquema que muestra la organización jerárquica del hueso desde la escala nanométrica a la macrométrica. Imagen modificada de Liu et al., 2016. Imagen creada con BioRender.com

A nivel de macroestructura encontramos la forma más común de distinción de los tipos de tejido óseo, en este nivel el hueso se divide en cortical y trabecular. Los huesos del esqueleto humano se componen de un 80% de hueso cortical y un 20% de hueso trabecular, además diferentes huesos y sitios esqueléticos dentro de los huesos presentan diferentes proporciones de estos (Clarke, 2008). La diferencia principal entre uno y otro tipo radica en la porosidad por lo que suelen denominarse hueso compacto y hueso esponjoso respectivamente (figura 4).

El hueso cortical o compacto es más denso y sólido con aproximadamente 5-10% de porosidad; la cual consiste en tres tipos de poros:

- a) Canales de Havers (paralelos al eje del hueso, de 50 μm de diámetro y que contienen vasos y capilares)

- b) Canales de Volkmann (más cortos y en disposición transversal conectando los canales de Havers entre sí y con el periostio)
- c) Cavidades de reabsorción (generados temporalmente durante la fase de remodelación de aproximadamente 200 µm).

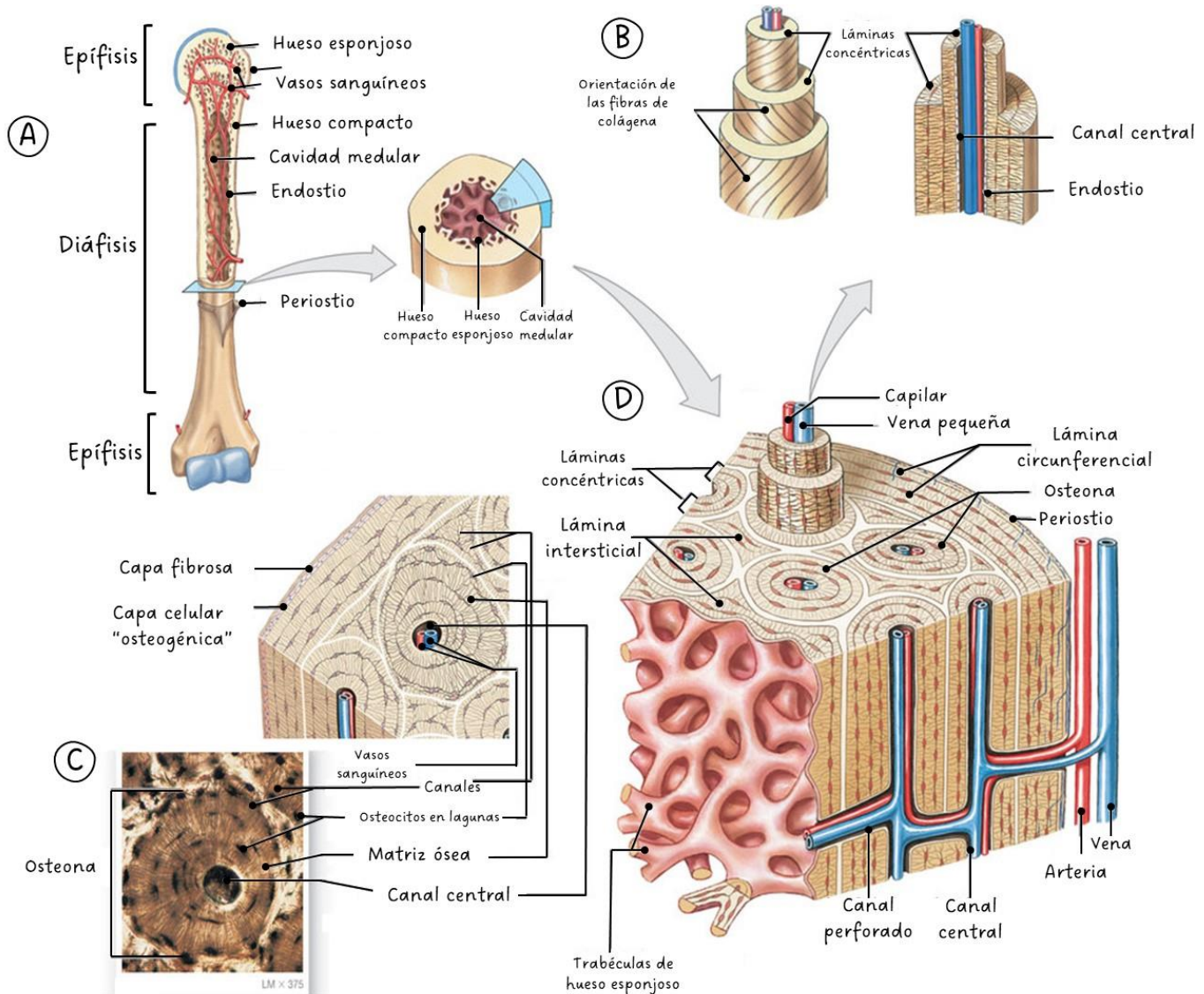


Figura 4. Anatomía y estructura del tejido óseo. (A) Anatomía general del hueso, (B) Organización de las fibras de colágena dentro de láminas concéntricas, (C) Localización y estructura del hueso compacto y (D) Organización histológica del hueso compacto y esponjoso. Imagen modificada de (Martini, F. H., Timmons, M. J., y Tallitsch, R. B. (2006). Human Anatomy. and Pearson., 2009). Imagen creada con BioRender.com

El hueso cortical rodea el espacio de la médula ósea y presenta una superficie perióstica externa importante para el crecimiento aposicional y la reparación de fracturas y una superficie endóstica interna en contacto con el hueso trabecular adyacente. El periostio es un tejido conjuntivo fibroso que rodea la superficie cortical externa (excepto en las articulaciones), contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas y células osteoprogenitoras, a su vez está

compuesto por dos capas una exterior llamada capa fibrosa que consiste en tejido conjuntivo irregular y una capa interna llamada capa osteogénica que contiene una gran cantidad de células que se activan durante la regeneración y reparación ósea (Chocholata et al., 2019; Clarke, 2008; Kalfas, 2001).

El hueso trabecular presenta una porosidad entre 75-95%, está compuesto por un conjunto de placas y barras de tejido mineralizado, llamadas trabéculas de 200 μm de espesor conectadas entre sí que dejan poros ocupados por la medula ósea, es metabólicamente mucho más activo puesto que se remodela con mayor frecuencia (Chocholata et al., 2019; Clarke, 2008; Rho et al., 1998).

En los niveles de microestructura y submicroestructura encontramos que las fibras de colágena mineralizadas se organizan en estructuras planas denominadas lamelas de 3-7 μm de ancho, las cuales se envuelven en capas concéntricas de 3-8 lamelas alrededor de una canal central de aproximadamente 30-40 μm de diámetro formando una osteona.

Las osteonas parecen cilindros de 200-250 μm de diámetro paralelos al eje longitudinal del hueso. En general se clasifican como primarias y secundarias, estas últimas también conocidas como sistemas de Havers. Las osteonas secundarias son resultado del proceso de remodelación ósea y las primarias presentan la misma estructura laminar concéntrica pero no tienen una línea de cemento (capa externa de una osteona secundaria) la cual se forma donde ceso el proceso de reabsorción y comenzó el depósito de nuevas láminas. Ambos tipos de hueso están compuestos por osteonas, pero las osteonas del hueso trabecular presentan circunvoluciones irregulares sinuosas en forma semilunar (Clarke, 2008; Reznikov et al., 2014; Rho et al., 1998).

Ambos tipos de hueso están compuestos por dos tipos de tejido:

- Hueso lamelar
- Hueso fibroso o "woven bone".

El hueso lamelar se forma lentamente y de manera muy organizada, consiste en una serie de capas o lamelas las cuales presentan dos tipos de disposición según la orientación de las fibras de colágena que se extienden paralelas dentro de cada lamela. En la primera, las lamelas alternan la orientación de sus fibras a 90° y en la segunda se genera una variación progresiva de la orientación de una lamela a otro resultando en una disposición helicoidal; la presencia de un tipo u otro de fibras en el hueso lamelar puede estar asociado a la necesidad de soportar diferentes tipos de estrés mecánico. El hueso fibroso se forma de una manera más rápida y poco organizada, en este tipo de tejido los cristales y las fibras de colágena están dispuestas de manera aleatoria lo que hace que sea menos rígido y resistente, este tipo de tejido se presenta en estados de alto recambio óseo como ocurre en diversas patologías (Clarke, 2008; Reznikov et al., 2014).

A nivel de nanoestructura tenemos a las fibras de colágena que característicamente presenta una naturaleza repetitiva que permite que tres cadenas polipeptídicas (dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$) se plieguen en una estructura de triple hélice de 300nm de longitud y 1,5nm de diámetro; estas moléculas de tropocolágena pasan por un proceso termodinámico de

autoensamblaje en el que cinco moléculas de tropocolágeno se auto ensamblan en una microfibrilla; como se mencionó anteriormente las zonas de separación entre las fibras se alinean para formar ranuras extendidas en las que los cristales interfibrilares pueden nuclearse y crecer. Las microfibrillas pueden agregarse tanto lateral como longitudinalmente con otras microfibrillas para formar fibras (Reznikov et al., 2014; Rho et al., 1998). Finalmente son los cristales, proteínas colágenas y no colágenas los principales componentes a nivel de sub nano estructura.

III. Antecedentes

III. Antecedentes

4. Ingeniería de tejidos

La pérdida de la función de un órgano, así como el daño parcial o total de un tejido son los problemas más graves y costosos de la salud a nivel mundial (Shafran et al., 2014); un tejido puede dañarse por diferentes razones, por ejemplo, debido a los agentes mecánicos externos como accidentes, lesiones patológicas propias de enfermedades congénitas, autoinmunes, cáncer, etc. (Grinyo, 2013). El gran número de personas afectadas por este tipo de lesiones discapacitantes y las consecuencias que tienen en quien las padecen, han llamado la atención de la comunidad científica, llevando a los investigadores a plantear la posibilidad de utilizar células y materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción de órganos y tejidos, dando lugar al nacimiento de un nuevo campo de investigación conocido hoy como Ingeniería de tejidos, el cual se define como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos, y el subsecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restituir el óptimo desempeño del órgano o tejido afectado (Fu et al., 2014; Gilbert, 2012; Gupta et al., 2017)(Mao and Mooney, 2015; Petit-Zeman, 2001).

El tejido óseo es un ejemplo representativo de la problemática anteriormente planteada; los huesos son susceptibles a daños significativos causados por fracturas, osteonecrosis, osteoporosis, tumores, enfermedades congénitas y degenerativas, entre otros. Si bien los huesos humanos presentan ciertas propiedades auto regenerativas, existen condiciones en las cuales estas propiedades son insuficientes para lograr la restauración del tejido dañado. Las terapias convencionales para el tratamiento de los defectos óseos incluyen el uso de tejidos autólogos, alogénicos o xenogénicos (figura 5) y el implante de materiales sustitutos.

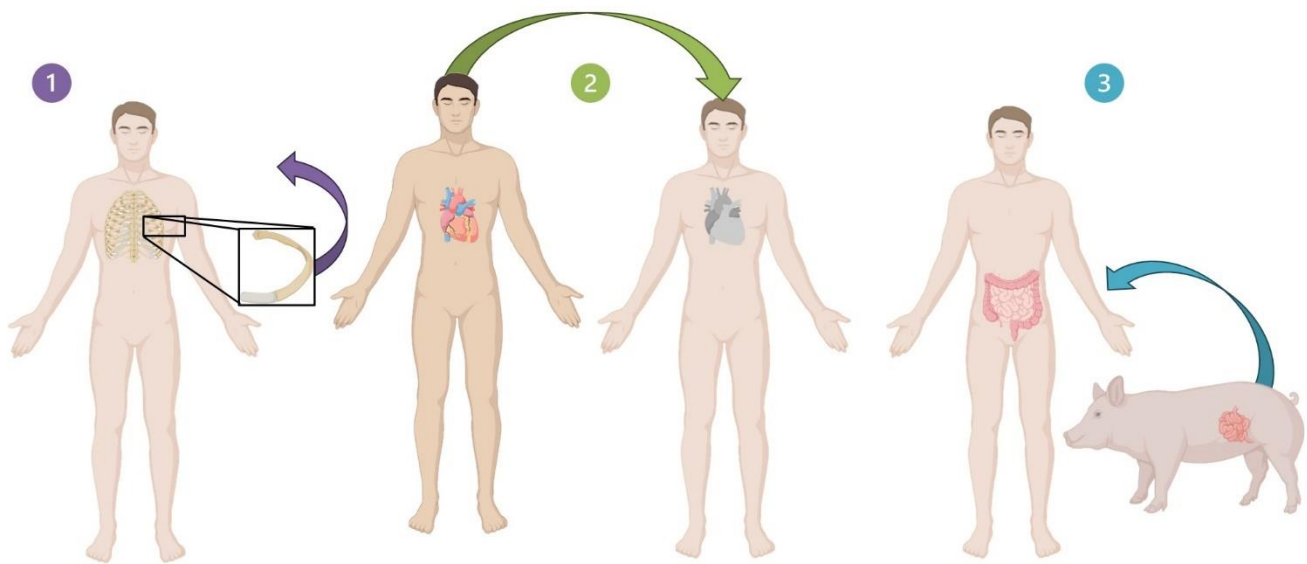


Figura 5. Tipos de injerto. 1 Autoinjerto, 2 Aloinjertos y 3 Xenoinjertos. Imagen creada con BioRender.com

- Autoinjertos: Representan el tratamiento ideal, evitan problemas inmunológicos y tienen buenos porcentajes de éxito por lo que son los más utilizados, consiste en la toma de un fragmento de hueso del paciente y su posterior trasplante a otra parte de él (figura 5). Posee propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas. Sin embargo, en muchos casos no es posible su implementación debida principalmente a la cantidad limitada de tejido que se puede obtener y a la morbilidad en el sitio donante.
- Aloinjertos: Implica la toma y procesamiento de hueso de un donante de la misma especie comúnmente de hueso cadavérico y su trasplante al paciente. Si bien aumenta la cantidad de tejido disponible, pero presentan resultados menos positivos ya que su tasa de incorporación es menor debido a la ausencia de células osteoprogenitoras y el latente riesgo de transmisión de patógenos y de causar una reacción inmunológica.
- Xenoinjertos: Esta opción aún se encuentra en etapa experimental, las terapias en desarrollo para reemplazo óseo consisten en la utilización de fragmentos de hueso de origen animal de diferente especie.
- Materiales: Existen implantes de materiales metálicos, plásticos, cerámicos, etc.; empleados para reparar y restablecer el funcionamiento mecánico de los huesos. La principal desventaja que presentan es la falta de osteointegración, es decir, el grado de interacción entre los materiales implantados y el tejido adyacente es mínima y esto genera un problema aún más grave, el daño de más tejido. Debido a la falta de integración, se generan fuerzas de fricción que van desgastando el tejido óseo próximo al implante provocando daños estructurales, además con el tiempo el material del implante es susceptible a la fatiga por el uso continuo y la ausencia de un proceso de remodelación que puede culminar en el colapso y fractura del implante. Otro de los problemas presentes en este tipo de alternativas son las complicaciones operatorias y las infecciones postoperatorias. En cualquiera de los casos pueden ser necesarias intervenciones quirúrgicas posteriores que conllevan más dolor para el paciente y disminuyen la tasa de éxito del tratamiento.

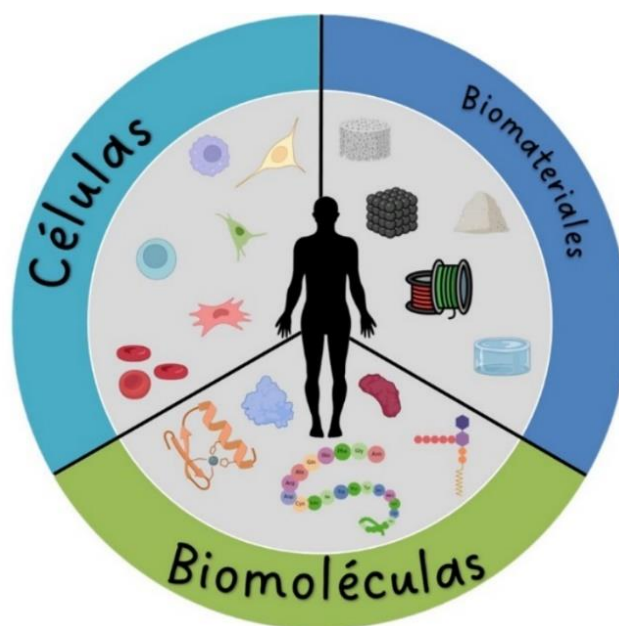


Figura 6. Triada de la ingeniería de tejidos. Imagen creada con BioRender.com

A causa de los obstáculos antes mencionados ninguno de los tratamientos convencionales cumple con todas las necesidades para tratar la pérdida o el deterioro del tejido óseo. Por consiguiente, es de crucial importancia el desarrollo de tecnologías alternativas para producir implantes biocompatibles que puedan recuperar la funcionalidad del área afectada.

La ingeniería de tejidos parte del principio de que la regeneración tisular puede lograrse a través de la combinación de células, biomateriales y moléculas bioactivas, este principio está representado en un gráfico denominado la triada de la ingeniería de tejidos el cual se muestra en la figura 6, dicho esquema ilustra el hecho de que estos tres elementos deben actuar de una manera orquestada para lograr dicho objetivo; además, también implica que el implante debe cumplir con una serie de requisitos como osteoconductividad, osteoinductividad, propiedades mecánicas, compatibilidad biológica, ser no inmunogénico, etc. La estrategia más común consiste en la obtención de tejido autólogo, del cual se aíslan células para ser expandidas in vitro, estas células son sembradas posteriormente en una matriz tridimensional llamada andamio, y sometidas a estímulos químicos por las moléculas bioactivas que provocan respuestas celulares específicas, con la finalidad de acelerar la producción de un implante eficiente; esta estrategia se ha convertido en el paradigma central de la ingeniería de tejidos (figura 7) y todos los enfoques desarrollados hasta la fecha están basados en este principio. Dentro de la gama de estrategias en desarrollo en este campo de investigación para la regeneración tisular, y particularmente asociadas a este proyecto se incluyen la descelularización de órganos y tejidos, la bioimpresión 3D y la síntesis de biotintas.

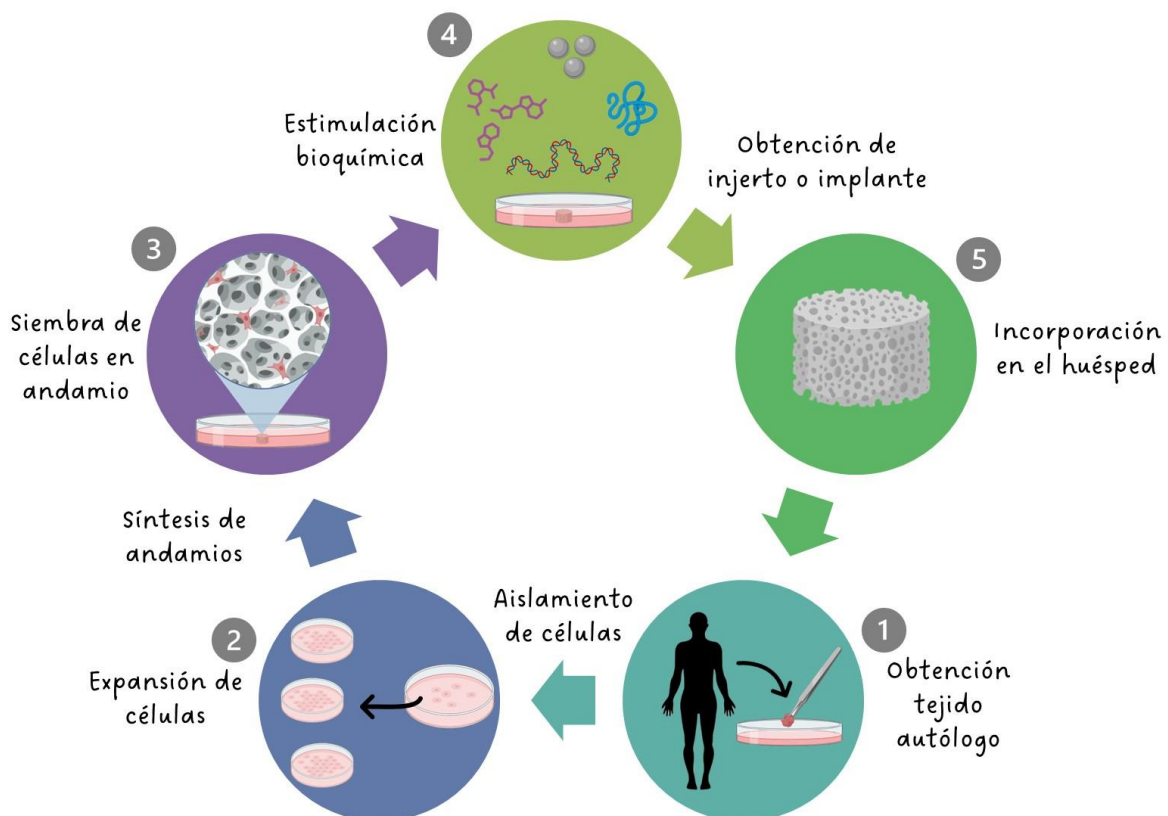


Figura 7. Paradigma central de la ingeniería de tejidos. Imagen creada con BioRender.com

5. Descelularización

Los tejidos del cuerpo humano presentan dos componentes fundamentales, el primero son los diferentes y específicos tipos celulares presentes en determinado tejido (por ejemplo, en el tejido óseo: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, etc.) y el segundo corresponde a la matriz extracelular (MEC). La MEC es una red compleja de proteínas, lípidos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas y otras biomoléculas los cuales son sintetizados por las células residentes en cada tejido (Fu et al., 2014, 2014; Gilbert, 2012). Funciona como un soporte estructural y proporciona el entorno físico para que las células residentes puedan llevar a cabo sus funciones celulares en un estado de reciprocidad dinámica, en el que las células tienen la capacidad de modificar la organización y composición de la matriz y a su vez responden a los estímulos provenientes de la misma, alterando su comportamiento de manera que refleja las necesidades funcionales y singularidad biológica, estructural y composicional de cada tejido (Badylak et al., 2011; Fu et al., 2014; Gilbert, 2012).

Por lo tanto, la MEC proporciona de un nicho único en cuanto a composición, estructura tridimensional y propiedades mecánicas con un enorme potencial para aplicaciones en la regeneración de tejidos (Gupta et al., 2017). En otras palabras, la matriz extracelular nativa representa el andamio ideal y por ende se desarrolla la técnica de descelularización (figura 8), la cual consiste en eliminar de la manera más eficiente posible el material celular y nuclear de un órgano o tejido, preservando la mezcla compleja de proteínas estructurales y funcionales de la MEC, minimizando cualquier efecto adverso sobre la composición, actividad biológica y la integridad mecánica de la MEC resultante (Badylak et al., 2011; Fu et al., 2014; Gilbert, 2012).

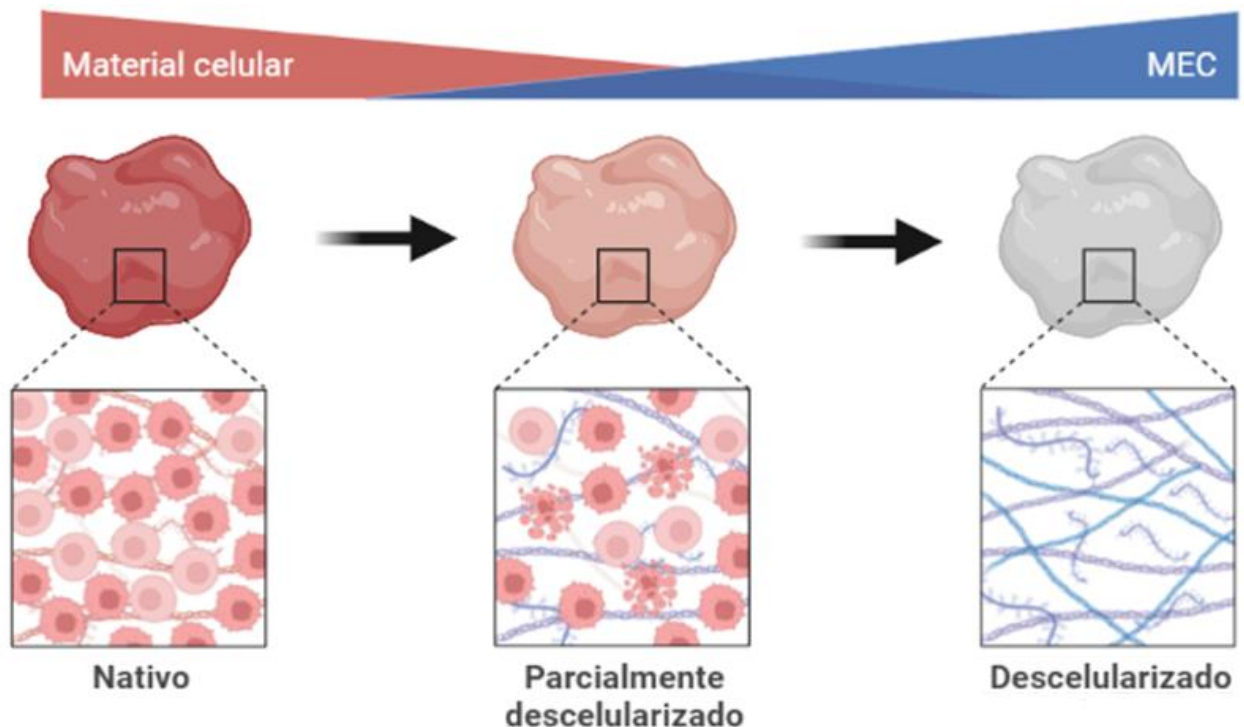


Figura 8. Descelularización. Esquema representativo del objetivo de la técnica, en la cual se eliminan las células del tejido y se preservan componentes de la matriz extracelular. Imagen creada con BioRender.com

Estos andamios de matriz extracelular descelularizada (dMEC) aportan señales moleculares proporcionadas por la topología ultraestructural y por la presencia de diversos componentes moleculares; por ejemplo, se ha demostrado que el proceso de descelularización deja en gran parte colágena, elastina, glicosaminoglicanos, proteínas de adhesión y muchos factores de crecimiento presentes y funcionales; con la capacidad de modular el comportamiento celular promoviendo finalmente un proceso de remodelación (Badylak et al., 2011; Gilbert et al., 2006; Gilbert, 2012; Gupta et al., 2017). Además, la estructura y composición de las proteínas presentes son altamente conservadas entre especies lo cual permite que la MEC sea reconocible dentro y entre especies en gran parte sin rechazo inmunológico permitiendo el uso de tejidos de origen xenogénico. Tales elementos pueden conservarse, al menos en parte, cuando se procesan adecuadamente para eliminar los antígenos celulares que inducirían una respuesta inflamatoria e inmune responsable del rechazo del tejido, de manera que se aprovecharían órganos y tejidos que fueron descartados para trasplante (Fu et al., 2014; Gilbert, 2012; Gupta et al., 2017; Guruswamy Damodaran and Vermette, 2018).

Una vez fabricados e implantados, las células presentes repoblarían la superficie del andamio, estos se degradarían rápidamente y los subproductos de degradación estarían compuestos por péptidos con una actividad biológica sólida, incluidas propiedades miogénicas y quimiotácticas. Finalmente serían reemplazados y remodelados por proteínas de MEC secretadas por las células residentes o sembradas en el andamio previo a su implantación.

5.1 Métodos de descelularización

Existen diferentes métodos implementados para descelularizar los tejidos los cuales se muestran en la figura 9; estos se clasifican en métodos físicos, químicos y biológicos o enzimáticos. La complejidad y duración del protocolo suele ser proporcional al grado de conservación geométrica y biológica deseada (Fu et al., 2014). Aunque no existe un método "estándar de oro", debido a que la eliminación de antígenos celulares depende del tipo de tejido, generalmente los protocolos de descelularización comienzan con la lisis de la membrana celular mediante el uso de tratamientos físicos o soluciones iónicas, seguido de la disociación de los componentes celulares mediante el uso de tratamientos enzimáticos y detergentes para la solubilización de elementos celulares citoplásmicos y nucleares, finalmente para evitar una respuesta adversa se eliminan los desechos celulares y residuos químicos a través de ciclos de lavado.

La eficacia de estos métodos depende de diversos factores incluidos: el uso de diferentes concentraciones de los reactivos, su implementación en condiciones óptimas y particularidades de cada tejido como grosor, densidad, contenido de células y de lípidos (Crapo et al., 2011); naturalmente dichos procedimientos afectan en mayor o menor grado a la MEC en cuanto a su actividad biológica, composición bioquímica y/o su microarquitectura (Fernández-Pérez and Ahearne, 2019). Sin embargo, los protocolos más robustos, es decir, aquellos que implican la combinación de los tres tipos de métodos han demostrado ser más eficientes para eliminar el contenido celular.

Métodos para descelularización



Figura 9. Métodos de descelularización. Clasificación de los diferentes tipos de métodos. Imagen creada con BioRender.com

Por otra parte, los métodos utilizados se implementan por medio de dos técnicas principales (Crapo et al., 2011; Gupta et al., 2017):

- **Perfusión:** en esta técnica es de uso limitado a tejidos que presenten una red vascular apropiada que permita un acceso sencillo, discreto y completo, en este caso se aprovecha red vascular del órgano para difusión de las soluciones hacia las células y para la eliminación del material celular del tejido.
- **Inmersión:** en esta técnica el tejido se sumerge en un depósito de solución descelularizante mientras se aplican otros métodos físicos como agitación o sonicación.

5.2 Evaluación de la descelularización

Después de la descelularización es fundamental comprobar la ausencia celular (Gupta et al., 2017), debido a que la presencia de material celular residual puede contribuir a problemas de citocompatibilidad *in vitro* y a respuestas adversas *in vivo*. Aunque las técnicas de descelularización no pueden eliminar el 100% del material celular, tampoco se ha determinado la concentración mínima de material celular residual dentro de la MEC suficiente para provocar una respuesta de remodelación negativa (Crapo et al., 2011).

El término descelularización no se ha definido mediante métricas cuantitativas. Sin embargo, es posible analizar cuantitativamente componentes celulares como el ADN, mitocondrias o moléculas asociadas a la membrana como los fosfolípidos. Con base en los hallazgos de estudios en los que se ha observado una respuesta de remodelación *in vivo* y evitado respuestas adversas en células y huéspedes, los siguientes criterios son suficientes para considerar como descelularizado un tejido:

- Ausencia de núcleos basada en la tinción histológica de hematoxilina y eosina o DAPI
- Medición cuantitativa de ADN a menos de 50ng/mg de peso en tejido seco.
- Tamaño de fragmentos residuales de ADN por debajo de 200pb.

6. Bioimpresión 3D

Otro de los enfoques en desarrollo en el campo de ingeniería de tejidos es la bioimpresión 3D, la idea fundamental consiste en la generación de andamios de biomaterial celular capaces de madurar en equivalentes de tejido funcional; este proceso aplica los principios y las técnicas de la impresión 3D adaptadas a la producción de estructuras similares a tejidos por medio de la deposición capa por capa de biomateriales cargados con células, en una arquitectura estructural predeterminada con características jerárquicas miméticas de tejido (Gopinathan and Noh, 2018; Mandrycky et al., 2016; Murphy and Atala, 2014; Ozbolat, 2015; Ramiah et al., 2020; Seol et al., 2014; Vijayavenkataraman et al., 2018).

El principal reto es reproducir la compleja microarquitectura de los componentes de la MEC y múltiples tipos de células con suficiente resolución para lograr una función biológica. Dichas estructuras tridimensionales se pueden diseñar y desarrollar en diseño asistido por computadora (CAD) utilizando datos geométricos obtenidos de imágenes médicas como rayos x, imágenes de resonancia magnética (MRI) y tomografía microcomputarizada (μ -CT) (Alperen Abaci and Murat Guvendiren, 2020; Gopinathan and Noh, 2018; Mironov et al., 2006; Murphy and Atala, 2014; Ramiah et al., 2020; Vermeulen et al., 2017; Zhang et al., 2021). Esta información volumétrica tridimensional obtenida a través de las imágenes médicas se almacena en un archivo de imágenes digitales y comunicaciones en medicina (DICOM), posteriormente por medio de software se realiza una reconstrucción de las imágenes DICOM para obtener una imagen 3D que a menudo se convierten al formato de archivo STereoLithography (STL). Las trayectorias de impresión se crean "cortando" este modelo STL en capas y creando rutas de

impresión por cada corte, en otras palabras, estas trayectorias son las instrucciones para la síntesis capa por capa de manera secuencial del objeto tridimensional que se crea por el apilamiento de cada uno de los cortes. (Mandrycky et al., 2016; Seol et al., 2014; Zhang et al., 2021).

6.1 Biotintas

Uno de los componentes fundamentales de la bioimpresión 3D es la “biotinta”. A diferencia de los biomateriales utilizados en la impresión 3D (figura 10); las biotintas son una formulación de células aptas para el procesamiento mediante tecnologías de biofabricación que pueden, pero no tienen que contener, biomateriales o moléculas bioactivas como factores de crecimiento, citocinas entre otros y pueden incluir células en diferentes ambientes y formas (Alperen Abaci and Murat Guvendiren, 2020; Choudhury et al., 2018; Gopinathan and Noh, 2018; Groll et al., 2018; Kabirian and Mozafari, 2020; Ozbolat, 2015).

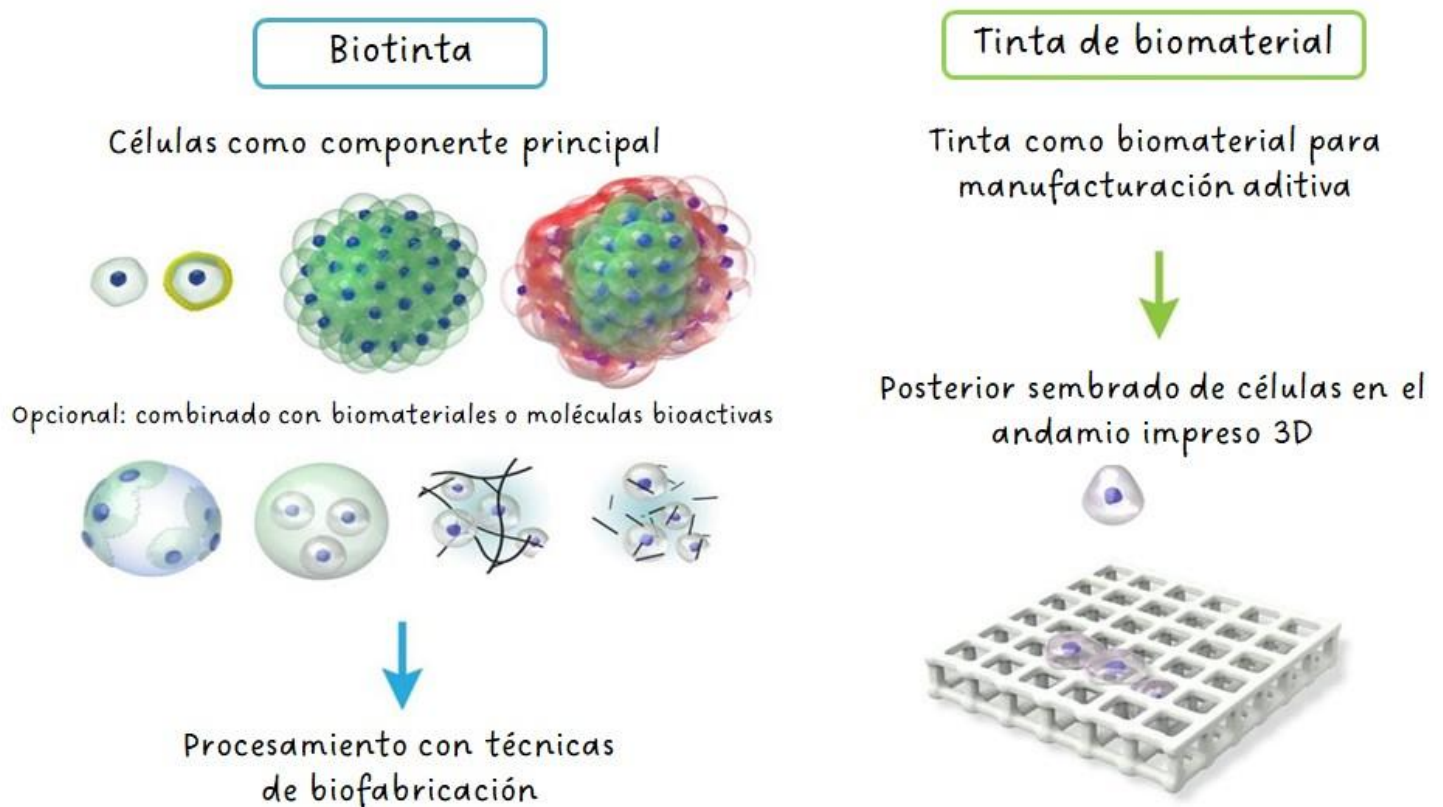


Figura 10. Biotinta. Esquema representativo de la diferencia entre biotinta y los materiales usados en impresión 3D. Imagen modificada de Groll et al., 2018. Imagen creada con BioRender.com

Uno de los principales desafíos en la bioimpresión 3D, ha sido encontrar materiales que sean compatibles con el proceso de bioimpresión y que también puedan proporcionar las propiedades mecánicas y funcionales deseadas para los constructos de tejido (Murphy and Atala, 2014; Ramiah et al., 2020; Skardal et al., 2015). Como consecuencia los materiales más utilizados para síntesis de biotintas son los hidrogeles, estos se definen como redes tridimensionales de cadenas de polímeros hidrófilos reticulados, que se distinguen por su capacidad de contener a las células vivas y por una variedad de propiedades biofísicas y

químicas modificables (Gopinathan and Noh, 2018; Mandrycky et al., 2016; Ramiah et al., 2020). El alginato, por ejemplo, es un hidrogel de origen natural comúnmente utilizado en la bioimpresión 3D, posee una baja toxicidad, una mayor biocompatibilidad y es rentable en comparación con otros biomateriales (Ramiah et al., 2020). Sin embargo, es un material hasta cierto punto bioinerte con una biodegradación limitada (Jia et al., 2014).

Con la optimización de los protocolos de descelularización, las matrices acelulares o dMEC representan un enfoque prometedor para la síntesis de nuevas biotintas. Tales matrices se liofilizan, se trituran para formar un estado similar a un polvo y se disuelven en una solución buffer y/o en combinación con otros biomateriales para mejorar las propiedades biológicas de los andamios 3D bioimpresos (Alperen Abaci and Murat Guvendiren, 2020; Gopinathan and Noh, 2018; Ji and Guvendiren, 2017). A medida que aumenta la variedad de materiales disponibles para la síntesis de biotintas, la lista de características deseables necesarias se ha vuelto más específica y compleja. Como se muestra en la figura 11, dichas propiedades se pueden englobar en cuatro grandes rubros: la capacidad de impresión o imprimibilidad, propiedades mecánicas, biocompatibilidad y biodegradación cada uno de los cuales se ve afectado por diferentes factores.

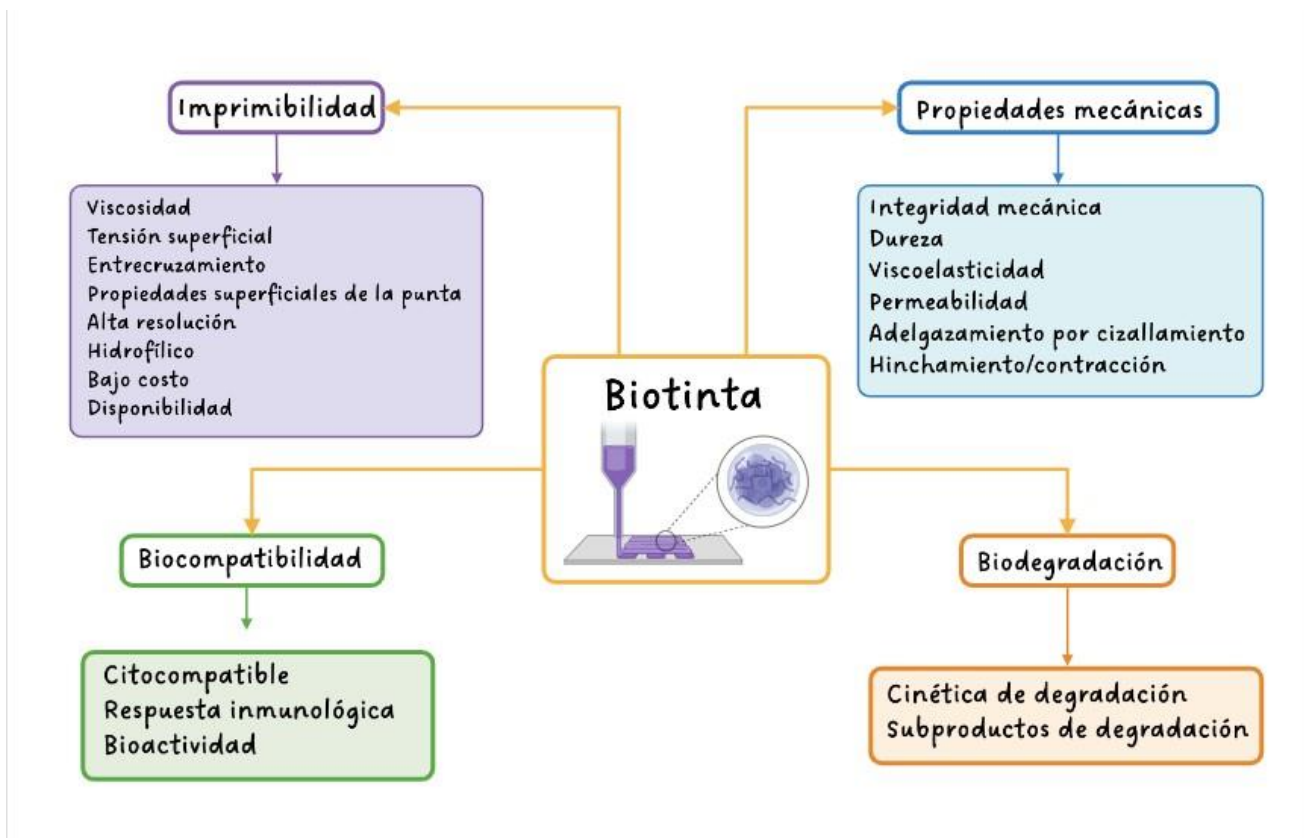


Figura 11. Propiedades óptimas de las biotintas. Imagen creada con BioRender.com

Por lo tanto, la síntesis de nuevas biotintas representa un gran desafío; los biomateriales a utilizar deben apoyar la unión, proliferación, diferenciación y función celular, tener mecanismos de reticulación adecuados para facilitar la deposición, ser biocompatibles para el trasplante a largo plazo y deben tener características de hinchamiento adecuadas y estabilidad a corto plazo para mantener las propiedades mecánicas iniciales, asegurando que las estructuras

como poros y canales no colapsen. A medida que los tejidos bioimpresos se desarrollen *in vivo*, deberían ser susceptibles de remodelación, asegurando que los biomateriales tengan un tiempo de degradación y subproductos adecuados facilitando la formación de las estructuras sintetizadas por las células.

6.2 Tecnologías de bioimpresión 3D

Debido al componente celular esencial de las biotintas la cantidad de técnicas de bioimpresión compatibles, son: la bioimpresión basada en inyección de tinta, bioimpresión basada en extrusión y bioimpresión asistida por láser (Figura 12).

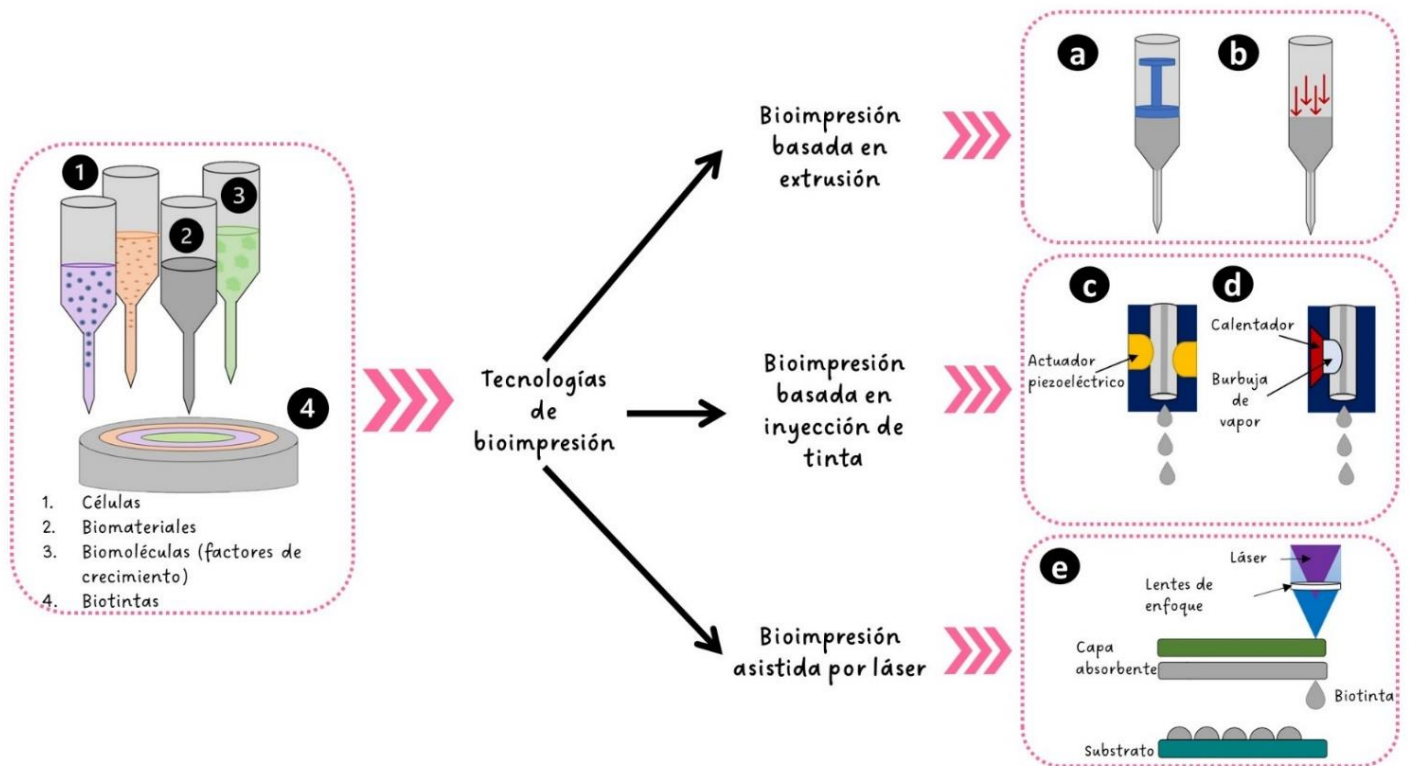


Figura 12. Tecnologías de bioimpresión 3D. Componentes de la biotinta (1-3), después de la síntesis de la biotinta existen tres tecnologías de impresión compatibles con las células: Bioimpresión basada en extrusión mediante el uso de a) pistón y b) sistema neumático, bioimpresión basada en inyección de tinta: c) sistema piezoeléctrico d) sistema térmico y e) bioimpresión asistida por láser. Fuente propia.

6.2.1 Bioimpresión basada en inyección de tinta

Las bioimpresoras de inyección utilizan mecanismos térmicos o acústicos para expulsar las células encapsuladas depositadas en forma de gotas de 10 a 15 pL (Mandrycky et al., 2016; Murphy and Atala, 2014; Ramiah et al., 2020; Zhang et al., 2021). Por lo cual, es posible controlar el número de células por gota depositada, lo que resulta en un control más preciso sobre la distribución de las células en los andamios fabricados (Ahn et al., 2016; Garreta et al., 2017; Ji and Guvendiren, 2017; Jose et al., 2016; Kabirian and Mozafari, 2020; Malda et al., 2013; Moroni et al., 2018; Park et al., 2017; Pati et al., 2016). Las impresoras térmicas de inyección ocupan un generador de calor y funcionan calentando eléctricamente el cabezal de impresión, lo que aumenta la temperatura localmente dentro de la cámara para producir pulsos de presión que fuerzan la salida de gotas de biotinta a través de la boquilla (Murphy and Atala, 2014; Seol et

al., 2014; Zhang et al., 2021). Este calentamiento localizado puede oscilar entre 200°C y 300°C, sin embargo, varios estudios han demostrado que la corta duración del calentamiento ($\sim 2 \mu\text{s}$) da como resultado un aumento de la temperatura del cabezal de la impresora de solo 4-10°C, lo cual no tiene un impacto sustancial en la viabilidad celular ni en la estabilidad de moléculas biológicas. Por otro lado, las bioimpresoras 3D que utilizan un mecanismo piezoeléctrico contienen un cristal piezoeléctrico que, en respuesta al voltaje aplicado, induce un cambio rápido de forma y crea una onda acústica (frecuencias de 15-25 kHz) dentro del cabezal de impresión. Esta onda acústica ayuda a romper el líquido en el cabezal de impresión en muchas gotas y su expulsión a intervalos regulares (Seol et al., 2014; Zhang et al., 2021).

6.2.2 Bioimpresión asistida por láser

La bioimpresión asistida por láser (LAB) se basa en los principios de la transferencia directa inducida por láser; como se muestra en la figura 13; consiste en un rayo láser pulsado, un sistema de enfoque, una capa donante que responde a la estimulación láser y una estructura de "cinta" que contiene una capa absorbente de energía (p. Ej., Titanio u oro) en la parte superior y una capa de solución de biotinta en la parte inferior. Durante la impresión, se aplica un pulso láser enfocado para estimular un área pequeña de la capa absorbente. Este pulso de láser vaporiza una parte de la capa donante, creando una burbuja de alta presión en la interfaz de la capa de biotinta, finalmente la gota de biotinta que cae se recoge en el sustrato colector y posteriormente se retícula (Garreta et al., 2017; Mandrycky et al., 2016; Murphy and Atala, 2014; Zhang et al., 2021).

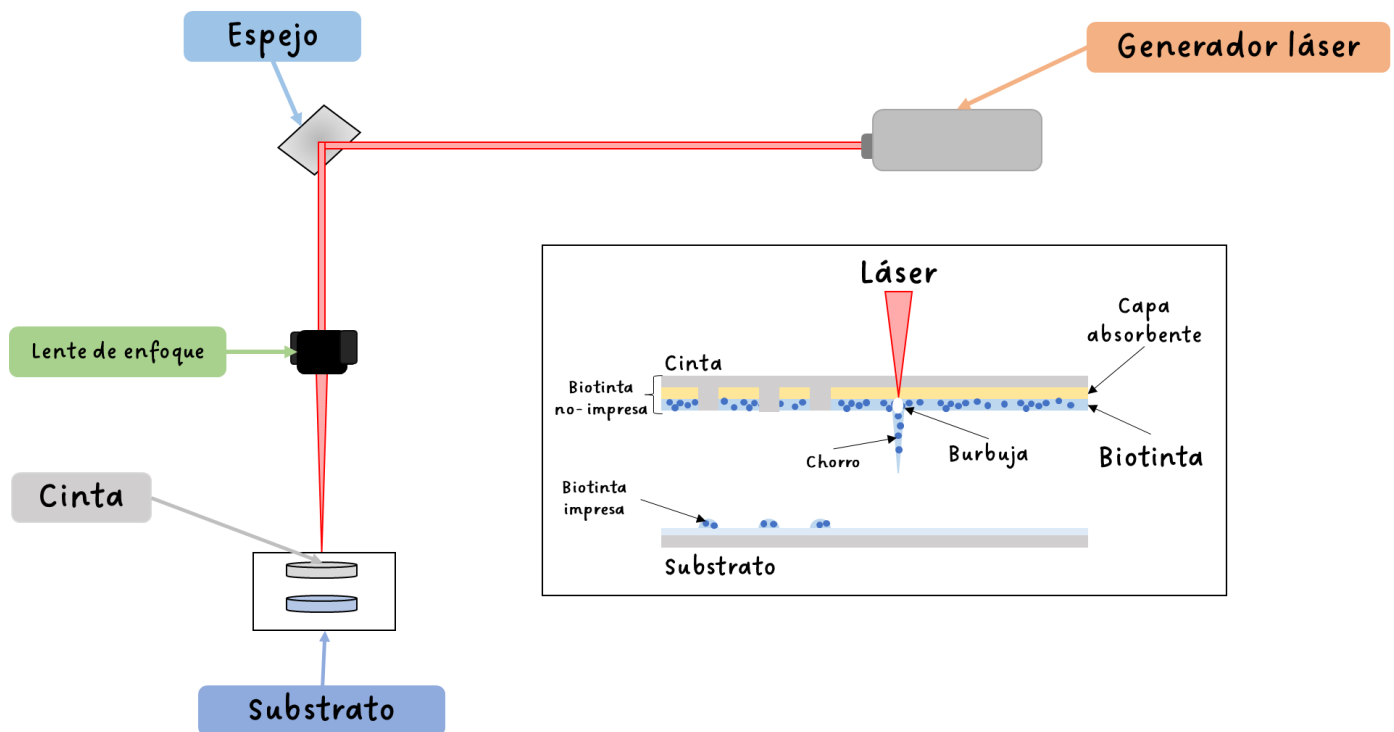


Figura 13. Bioimpresión asistida por láser. Fuente propia

6.2.3 Bioimpresión basada en extrusión

Los sistemas de bioimpresión basados en extrusión dispensan filamentos continuos de biotinta a través de una micro-boquilla. Comúnmente, estos sistemas extruyen robóticamente materiales mediante sistemas de dispensación neumáticos (presión neumática) o mecánicos (Garreta et al., 2017; Mandrycky et al., 2016; Murphy and Atala, 2014; Seol et al., 2014). Como se muestra en la Figura 14 (Boularaoui et al., 2020).

Las bioimpresoras basadas en extrusión se clasifican en enfoques de dispensación neumáticos, impulsados por pistón y atornillados en los que la presión del aire, las fuerzas verticales y de rotación se utilizan para extruir el flujo continuo de biomaterial (Kabirian and Mozafari, 2020). De manera que al aplicar una fuerza continúa, se pueden imprimir líneas cilíndricas ininterrumpidas, después de imprimir patrones 2D, los hidrogeles se solidifican física o químicamente, y las estructuras 3D se pueden fabricar apilando patrones 2D capa por capa, de manera que la capa depositada sirve como base para la capa posterior mientras que el cabezal de extrusión se mueve a lo largo del eje z, lo que finalmente da como resultado la formación de una estructura tridimensional (Ahn et al., 2016; Jose et al., 2016; Malda et al., 2013; Mandrycky et al., 2016; Mironov, 2021; Murphy and Atala, 2014; Seol et al., 2014; Zhang et al., 2021).

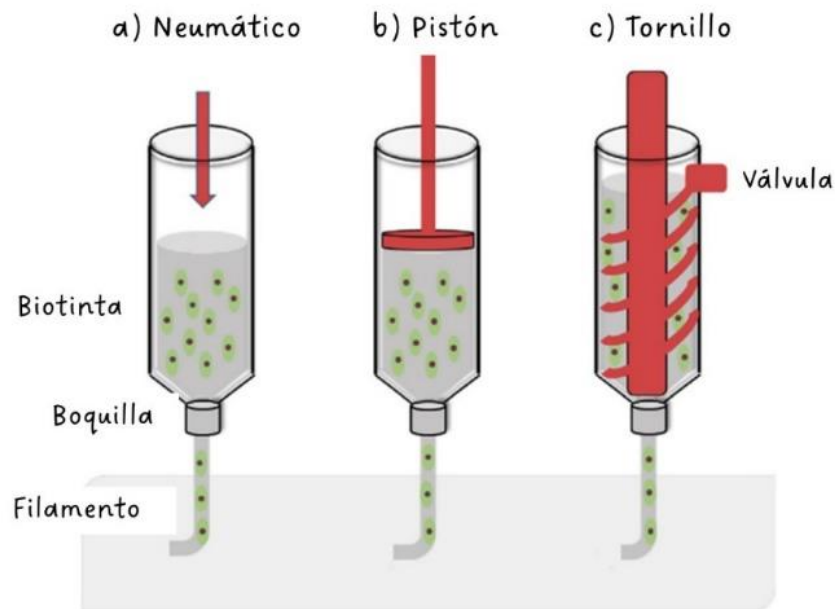


Figura 14. Bioimpresión basada en extrusión. Imagen modificada de Boularaoui et al., 2020.

IV. Justificación

El tratamiento de defectos óseos se basa en el uso de injertos (autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos). El autoinjerto se considera el estándar de oro debido al inexistente rechazo del injerto, no obstante, la necesidad de un segundo procedimiento quirúrgico y la limitada cantidad de tejido obtenido son las principales desventajas de este tipo de injerto; por otro lado, los aloinjertos conllevan a un riesgo potencial de rechazo por parte del huésped así como de infección y la transmisión de enfermedades además presentan un suministro limitado en los bancos de órganos y tejidos; finalmente los xenoinjertos son los tejidos con mayor disponibilidad presentan un mayor riesgo de rechazo y de transmisión de enfermedades.

La descelularización brinda de una alternativa para aprovechar los órganos y tejidos de origen animal, al eliminar el contenido celular minimizando la antigenicidad a la par que se preservan componentes de matriz extracelular; el uso de matrices descelularizadas como andamios biológicos, se plantea como una estrategia viable para la regeneración de tejidos óseos, sin embargo, debido a los agentes utilizados en los protocolos de descelularización la integridad estructural se ve comprometida, por lo que un nuevo enfoque para abordar este problema, es tratar de utilizar las propiedades biológicas que presentan estos andamios descelularizados, como una opción para la síntesis de "bioinks" o biotintas, que preserven la viabilidad celular en el momento de bioimprimir andamios celulares 3D.

V. Diseño experimental

1. Pregunta de investigación

¿Es posible sintetizar una biotinta a partir de andamios descelularizados de matriz de mucosa de vejiga urinaria porcina (UBM) y alginato (ALG)?

2. Hipótesis

El andamio descelularizado de matriz de mucosa de vejiga urinaria porcina y alginato, permitirá sintetizar una biotinta, capaz de mantener la viabilidad celular de células troncales mesenquimales de tejido gingival.

3. Objetivo

3.1 Objetivo general

Sintetizar, caracterizar y evaluar una biotinta sintetizada a partir de andamios descelularizados de matriz de mucosa de vejiga urinaria porcina y alginato.

3.2 Objetivos específicos

- Implementar el método de descelularización de vejiga urinaria porcina.
- Evaluar la efectividad de los protocolos de descelularización.
- Caracterización fisicoquímica y ultraestructural del andamio descelularizado
- Determinar concentraciones optimas de ALG y de matriz de mucosa de UBM porcina.
- Sintetizar la biotinta para bioimpresión 3D.
- Evaluar la viabilidad celular del andamio 3D bioimpreso.

VI. Metodología

VI. Metodología

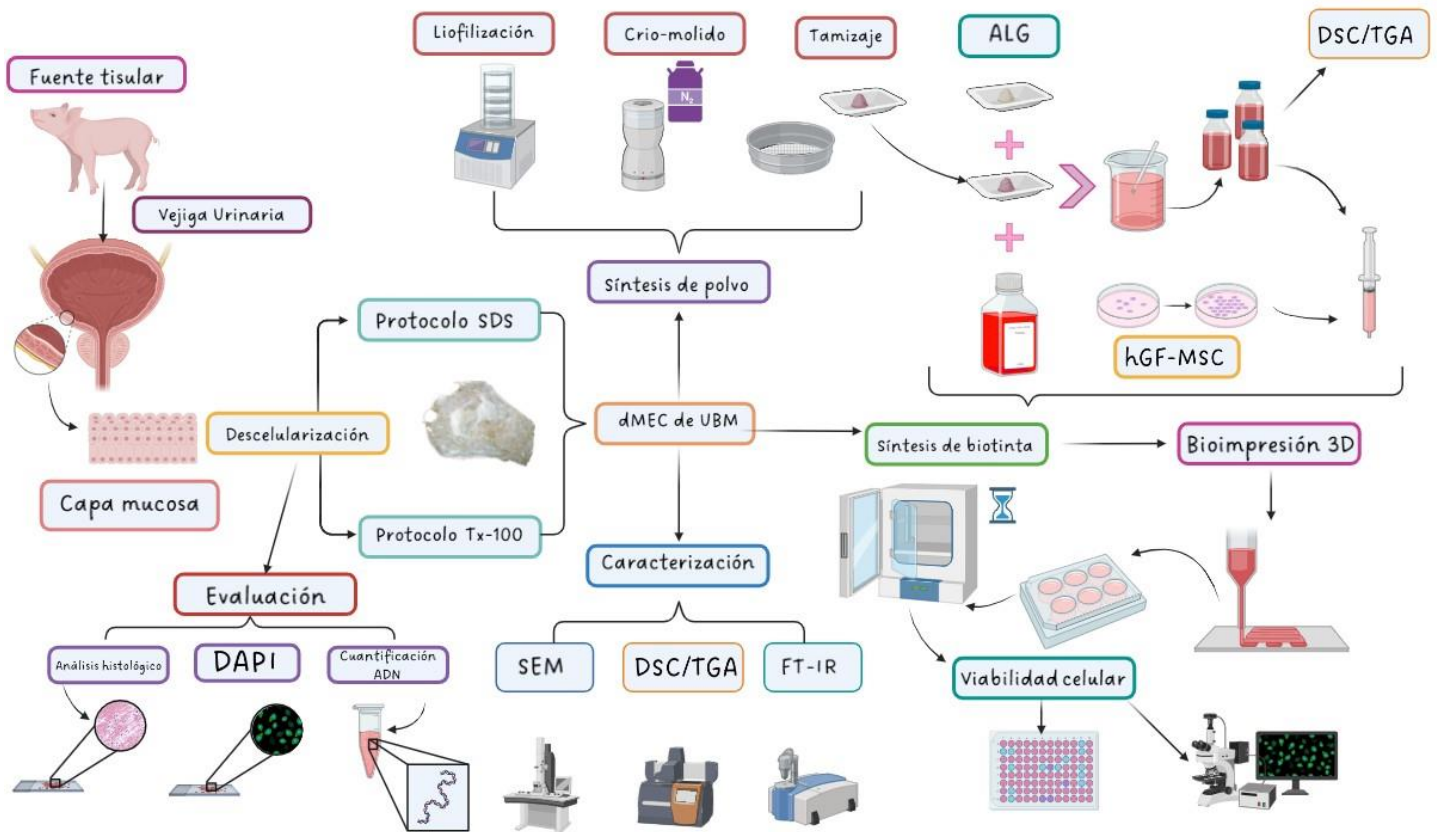


Figura 15. Resumen gráfico de la metodología. Partimos de la obtención del tejido, seguido de la desceleración con posterior evaluación; continuamos con la fase de caracterización de las muestras desceleradas para continuar con la síntesis del polvo y de biotinta para finalizar con la evaluación de la viabilidad celular. Imagen creada con BioRender.com

1. Obtención de matriz extracelular descelerada de vejiga urinaria porcina (dMEC-UBM)

1.1 Fuente tisular

Las muestras de vejiga urinaria porcina de cerdos Landrace /Yorkshire se obtuvieron por medio de la donación del órgano por parte del departamento de enseñanza quirúrgica de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UNAM y del Rastro de Abastos Cuautitlán TIF 194. Las vejigas se descontaminaron con solución de yodo al 10% durante 5 minutos (min) y se transportaron en buffer de fosfato salina (PBS) con 100 IU/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina.

1.2 Protocolos de desceleración

Un total de 10 vejigas urinarias porcinas se utilizaron para la obtención de capa mucosa de UBM por medio de la delaminación mecánica para separar las capas musculares; una muestra de espesor completo de cada vejiga urinaria se tomó como control antes de la delaminación mecánica y las muestras de capa submucosa fueron tratadas con dos

protocolos diferentes para la descelularización de los tejidos. (Silva-Benítez et al., 2015). (Tabla 1 y Figura 16).

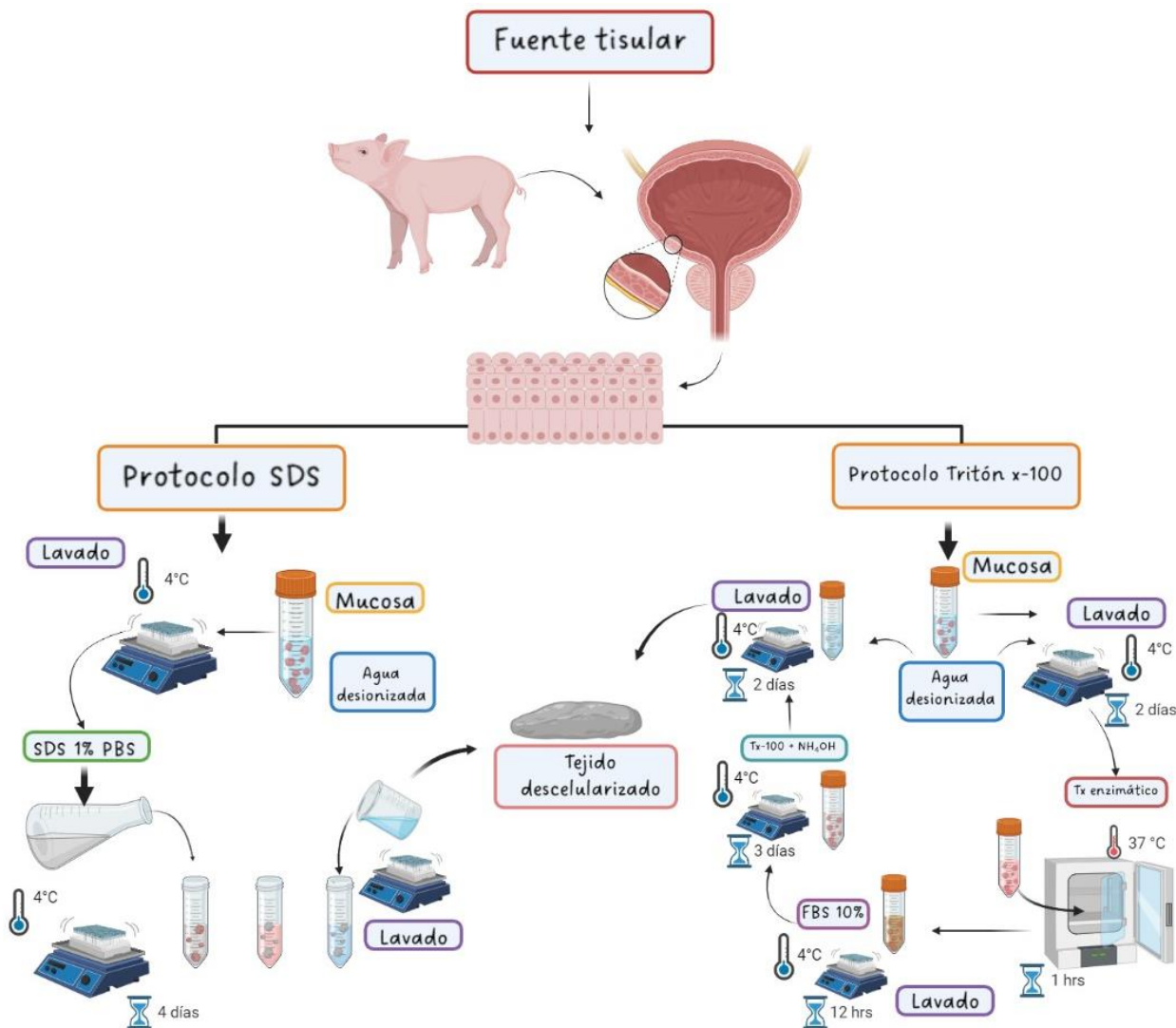


Figura 16. Protocolos de descelularización de MEC-UBM. En el esquema se representan los pasos de los protocolos implementados el primero designado como "protocolo SDS" y el segundo como "protocolo Tritón x-100". Imagen creada con BioRender.com

| Protocolo dodecilsulfato sódico (SDS) | Protocolo Tritón X-100 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Lavado en agua desionizada • Agitación con SDS 1% con PBS por 4 días a 4°C • Lavado con agua desionizada durante la noche (12horas). | <ul style="list-style-type: none"> • Lavado con agua desionizada durante 2 días en agitación a 4°C • Incubación con tripsina 0.03% con PBS durante 1hora a 37°C. • Lavado con FBS al 10% con PBS durante la noche (12 horas) a 4°C en agitación. • Tratamiento con tritón X-100 al 0.5% e hidróxido de amonio NH₄OH al 0.05% en agua desionizada durante 3 días a 4°C (cambio de solución todos los días). • Lavado con agua desionizada durante 2 días en agitación a 4°C. |

Tabla 1. Protocolos de descelularización implementados para mucosa de vejiga urinaria porcina.

2. Evaluación del proceso de descelularización dMEC-UBM

2.1 Procesamiento histológico

El procesamiento histológico de muestras se realizó en el departamento de diagnóstico y patología de la DEPEI de la Facultad de Odontología UNAM. Se procesaron muestras obtenidas de la implementación de ambos protocolos y muestras nativas. Brevemente, las muestras se fijaron en formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) por 24 horas, subsecuentemente las muestras se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol de 50 al 100% y se embebieron en bloques de parafina. Finalmente se realizaron cortes seriados de 5 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina "H&E" (Merck, NY, EE. UU.) Las imágenes fueron tomadas con un microscopio óptico Olympus modelo CX43.

2.2 Tinción con DAPI

Para la tinción con DAPI se utilizaron cortes seriados de 5 μm de espesor de muestras incluidas en parafina tanto nativas como de los grupos experimentales; las laminillas se desparafinaron en una plancha térmica a 62°C por 10 min o hasta que las muestras se observaran transparentes posteriormente se transfirieron a un vaso de coplin para su inmersión con tres soluciones diferentes de xilol al 100% durante 10 min cada una, la cuarta inmersión se realizó con una solución xileno/etanol en proporciones 50:50. Para la rehidratación de las muestras se utilizaron soluciones seriadas de etanol (100, 96, 80 y 70%) durante 5 min cada una y después se transfirieron las laminillas a un rack para tinción y se hidrataron con agua bidestilada dos veces seguido de tres lavados de 5 min con buffer de lavado TBS (PBS/Tween20). Posteriormente las muestras se incubaron con 200 μL de albumina sérica bovina BSA-PBS al 2% y DAPI en dilución 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con TBS durante 5 min cada uno. Finalmente, las laminillas se secaron con cuidado de no tener contacto con la zona donde se localizaba la muestra y se realizó el montaje de las laminillas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia invertido (modelo AE31E, MOTIC, TX, EE. UU.)

2.3 Cuantificación de ADN

Para los ensayos de cuantificación de ADN se utilizaron 50 mg de dMEC-UBM liofilizada por cada uno de los protocolos implementados y 50 mg de muestra nativa liofilizada como control, las muestras se lisaron con 1 mL buffer de lisis (Lysis R2, Life technologies) durante 24 horas a 4°C. La concentración total de ADN se determinó utilizando 20 μL del lisado y la cuantificación en un Fluorómetro Qubit 2.0 utilizando el kit Qubit dsDNA BR (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizaron ensayos por triplicada para cada grupo experimental n=9.

3. Caracterización fisicoquímica y ultraestructural dMEC-UBM

3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis de la morfología ultraestructural las muestras descelularizadas se sometieron a caracterización por técnica de SEM; brevemente las muestras se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4°C, posteriormente se lavaron con PBS y se deshidrataron paulatinamente por medio de una serie de soluciones crecientes de etanol (25, 50, 75, 80, 90, 96 y 100%) durante 10 min cada uno y se sometieron a secado por punto crítico en Cámara de CO₂ en un equipo Hitachi (modelo HCP-2). Posteriormente se realizó el montaje de las muestras y se recubrieron con oro, las imágenes se obtuvieron utilizando un equipo JSM 6390LV, JEOL SEM con aceleración de 5kV.

3.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis de la estructura química de las muestras descelularizadas se llevó a cabo por FT-IR, para ello se utilizó un espectrómetro (Nicolet, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y se utilizaron muestras liofilizadas de los dos grupos experimentales y muestra nativa como control; registrando los datos de 400 a 4000 cm⁻¹.

3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La evaluación de la respuesta térmica para determinar alteraciones macromoleculares en las muestras debido al proceso de descelularización de los tejidos se llevo a cabo por DSC. Para el experimento muestra nativa y descelularizadas (n=3) se liofilizaron en un equipo LABCONCO ® a -46°C y una presión de 0.045 mBar durante 24 horas. La calorimetría diferencial de barrido se llevó a cabo en un calorímetro diferencial equipo Q200 (TA instrument, New Catle, DE, USA) con una rampa de calentamiento de 20°C a 250°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min y atmosfera de nitrógeno.

3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El segundo estudio realizado para analizar el comportamiento térmico de la matriz descelularizada fue mediante TGA. Para el experimento se utilizaron 2.5-3 mg de cada una de las muestras liofilizadas (n=3) El ensayo se realizó en un analizador termogravimétrico (TA Instruments Q600) ejecutando una rampa de calentamiento de 20°C a 250°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min y bajo una atmosfera de nitrógeno.

4. Síntesis de biotinta

4.1 Cultivo Celular

Se utilizaron células troncales mesenquimales de tejido gingival (hGF-MSc) previamente caracterizadas (De La Rosa-Ruiz et al., 2019), siendo positivas a los marcadores CD105, CD90 y CD73, negativas para los marcadores HLA-DR, CD34, CD45, CD14 y CD31; las células han demostrado tener la capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico, condrogénico

y adipogénico; la línea celular muestra una morfología fibroblástica, con un citoplasma escaso, alargado y un núcleo central. La línea celular fue donada por el Dr. Juan José Montesinos del laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas IMSS Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Para evaluar la respuesta biológica de los andamios 3D bioimpresos las células hGF-MSc se cultivaron hasta el 90% de confluencia en cajas de cultivo de 75 cm² con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Corning, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Corning), solución antibiótica (streptomycin 100 µg/mL, penicillin 100 U/mL and fungizone 0.3µg/mL, Sigma-Aldrich, USA) y 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, USA). Los cultivos celulares fueron incubados en una atmósfera de 100% humedad a 37°C en 95% aire y 5% CO₂. Células de 2-4 pase se utilizaron para los procedimientos experimentales.

4.2 Síntesis de polvo de dMEC

El primer paso para la síntesis de las biotintas fue crear un polvo de la matriz descelularizada obtenida por ambos protocolos; para ello las muestras se congelaron a -40°C y se liofilizaron en un equipo LABCONCO ® a -46°C y una presión de 0.045 mBar durante 48 horas, posteriormente se enfriaron las muestras con nitrógeno líquido y molieron con ayuda de un molino mecánico este proceso se repitió durante 10 ciclos, finalmente para la obtención de un polvo homogéneo, se utilizó un tamiz de malla 150 y apertura 0.1mm, finalmente el polvo obtenido se almaceno bajo refrigeración a 4°C.

4.3 Síntesis de biotintas

Para la síntesis de la biotinta se utilizó alginato de sodio estéril al 3.5% (120,000-190,000 g/mol y M/G promedio de 1.56, Sigma-Aldrich, St. Louis, Ms, USA) con 0.5% del polvo de dMEC liofilizada mezclado con 5mL de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Corning, NY, USA) sin suero fetal bovino (SFB) en condiciones estériles y se conservaron a 4°C. Posteriormente las células hFG-MSc se tripsinizaron, se contaron y se adiciono a la tinta una densidad celular de 1x10⁶ células/mL; la biotinta se transfirió inmediatamente a la jeringa de impresión para realizar la bioimpresión de andamios celulares 3D.

4.4 Caracterización térmica de la biotinta

Previo a la incorporación de las células en la biotinta se realizaron ensayos de caracterización térmica de DSC y TGA. Para llevar a cabo el ensayo se sintetizaron cilindros con la biotinta (ALG 3.5% + dMEC 0.5% + 5 mL medio de cultivo sin células) y se gelificaron en una solución de CaCl₂ (100 mM) durante 10 min, como control se sintetizaron cilindros de ALG a 3.5%; posteriormente se realizó secado de los geles por medio de una ESTUFA Felisa a 35°C durante 6 horas. Los ensayos térmicos se realizaron en un equipo TA Instruments Q600 2.5-3 mg de muestra de cada uno de los grupos (n=3) las condiciones de los ensayos fueron las mismas implementadas en la caracterización de las matrices descelularizadas.

5. Bioimpresión 3D

5.1 Diseño del andamio

Para evaluar la capacidad de impresión de la biotinta se diseñó un andamio por medio de los softwares 3D Builder® y Ultimaker Cura® 4.12.1, dicho diseño consistió en una malla de 2cm x 2cm, con un patrón de relleno de líneas con distancia de filamento de 600 µm, dos capas de 500 µm de altura y densidad de relleno del 5% con una velocidad de impresión de 10 mm/s.

5.2 Bioimpresión de andamios 3D

Los andamios se imprimieron bajo tecnología de bioimpresión basada en extrusión en una impresora 3D Comgrow Creality Ender 3, con una punta cónica con apertura de 640 µm en placas de 6 pozos. Después de la bioimpresión los andamios se gelificaron en 2 mL de solución de CaCl₂ (100mM) durante 1 min para la reticulación iónica del alginato, posteriormente se retiró el entrecruzante y se añadió medio de cultivo celular y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo durante 7 días.

6. Biocompatibilidad celular del andamio 3D bioimpreso

6.1 Ensayo de viabilidad celular

La biocompatibilidad celular del andamio 3D bioimpreso se verificó por medio del ensayo de viabilidad celular con resazurina (7-hidroxi-3Hfenoxazina-3ona oxido) durante 1, 3 y 7 días de cultivo. El ensayo consistió en la incubación de los andamios 3D bioimpresos por triplicado para cada grupo experimental con una solución de 100 µL de resazurina 1x durante 4 horas, a continuación, se tomaron 200µL de cada uno de los pozos experimentales por triplicado los cuales se depositaron en una placa de 96 pozos para realizar la lectura de la placa y obtener las medidas de absorbancia en un espectrofotómetro (ChroMate, AWARENESS) utilizando una longitud de onda de 545 nm. El grupo control fueron las células hGF-MSc sembradas en monocapa en una densidad celular de 170,000 células por pozo en placas de 6 pozos.

Para evaluar la viabilidad y la presencia de las células hGF-MSc en el andamio bioimpreso se tomaron imágenes mediante microscopia de fluorescencia en el día 0 y 7 de cultivo. Previamente las células se incubaron con CellTracker™ Green CMFDA en medio libre de rojo fenol a 37°C durante 4 horas, después se lavaron con PBS, se añadió medio de cultivo fresco y se permitió la recuperación de las células durante 12 horas, posteriormente se incorporaron a la tinta como se mencionó anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo establecido, los andamios se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 24 horas, seguido de la deshidratación con una serie de soluciones de etanol al 25%, 50%, 75%, 90% y 100% con agua MiliQ durante 5 min cada uno seguido de metanol frío al 30% por 20 min, se realizó lavado con agua MiliQ, seguido de la incubación con DAPI (1:1000 en buffer de PBS-tween 20 y

albumina sérica bovina (BSA) libre de IgG) durante 10 min, finalmente se realizó un lavado con agua MiliQ y se conservaron las muestras en buffer PBS-tween20. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia invertido (modelo AE31E, MOTIC, TX, EE. UU.) Se utilizó como control la misma línea celular sembrada en monocapa.

7. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos de los ensayos de cuantificación de ADN y viabilidad celular se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.0.2 con prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. La prueba estadística para el análisis de cuantificación de ADN se realizó mediante ANOVA unidireccional con prueba post hoc de Tukey. El análisis de viabilidad celular se realizó con prueba ANOVA bidireccional con post hoc de Tukey.

VII. Resultados

VII. Resultados

1. Eficiencia de la descelularización de la vejiga urinaria porcina.

Después de la delaminación mecánica para separar las capas musculares y la capa adventicia de la vejiga urinaria nativa, se implementaron los protocolos de descelularización de la capa mucosa utilizando SDS o Tritón X-100. Como se muestra en la figura 17, después de la implementación de ambos protocolos percibimos un cambio completo en la apariencia macroscópica del tejido, incluso observamos un cambio claro en el color en las micrografías de rojo/rosa presente en la capa mucosa (figura 17 B) a un color blanco/transparente en las muestras descelularizadas (figura 17 C y D).

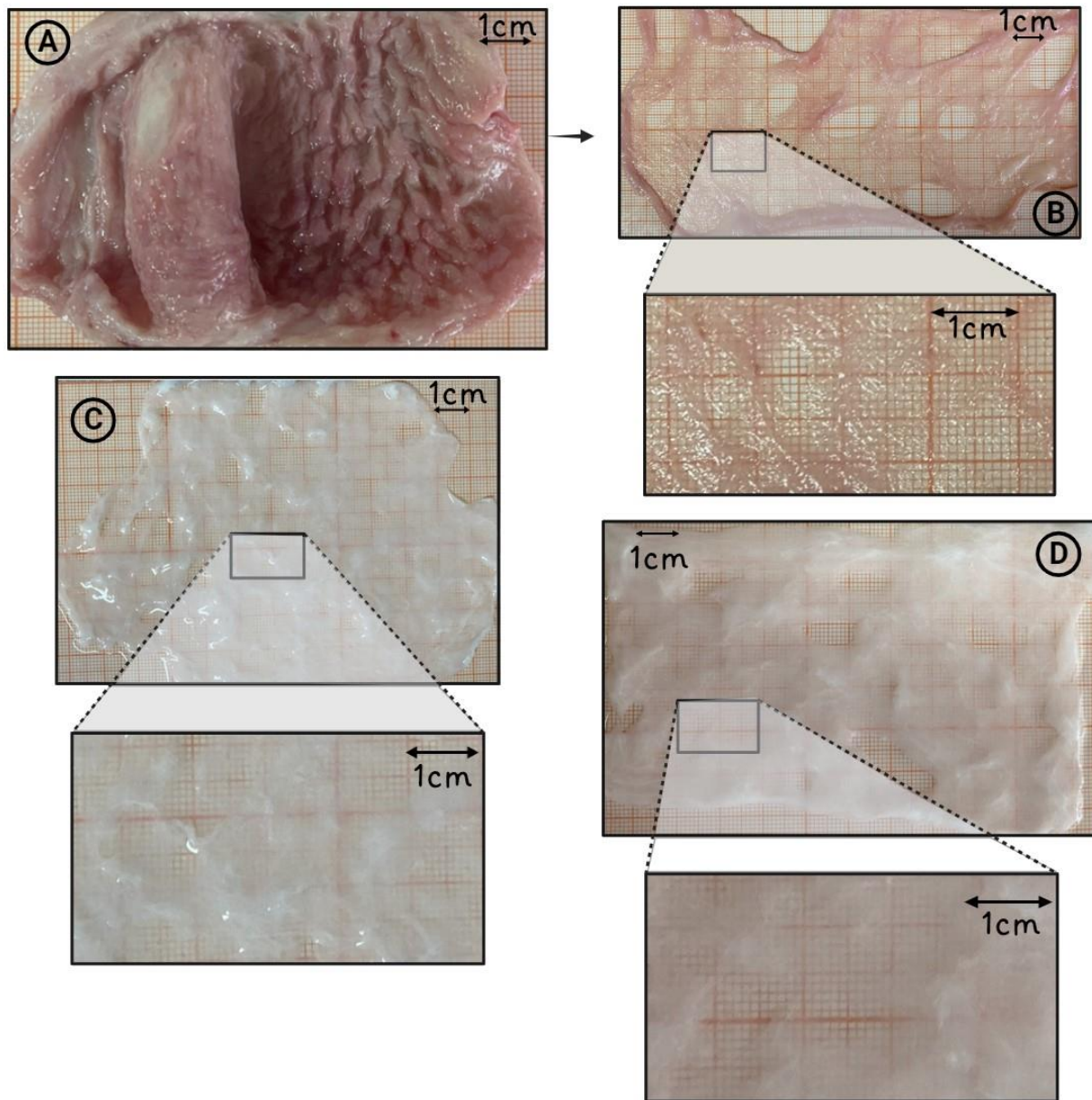


Figura 17. Eficiencia macroscópica de la descelularización. Imágenes macroscópicas representativas en: (A) Vejiga urinaria porcina, (B) Capa mucosa, (C) Capa mucosa posterior a la implementación del protocolo de SDS y en (D) Capa mucosa posterior a la implementación del protocolo de Tx-100. Barras de escala 1 cm. Fuente propia.

El análisis histológico de las muestras para tinción de hematoxilina y eosina (H&E) muestra las diferencias estructurales presentes entre el tejido nativo y el tejido descelularizado. En la figura 18 podemos observar la estructura normal de tejido nativo de la vejiga urinaria porcina (figura 18- 1 y 2) compuesta por el epitelio de transición, que recubre parcialmente la lámina propia compuesta por tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado y hacia la base observamos la capa muscular compuesta por músculo liso; después de la delaminación mecánica (figura 18- 3 y 4) las capas musculares y adventicia claramente se separan y se conserva la lámina propia y epitelio de transición. La descelularización de la mucosa de vejiga urinaria porcina se confirmó cualitativamente para ambos protocolos mediante la tinción de H&E donde no se aprecia la presencia de células o núcleos y se observa un tejido conectivo fibroso denso asociado a las fibras de colágena (figura 18 SDS 5 y 6, Tx-100 7 y 8).

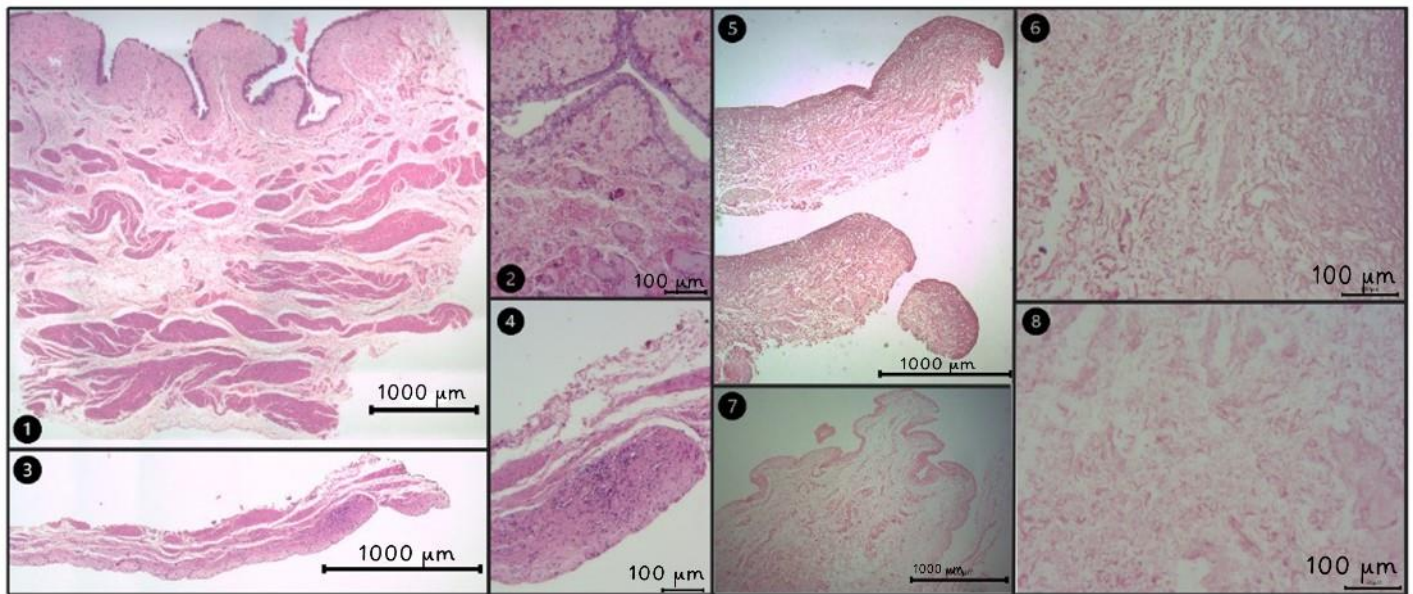


Figura 18. Tinción histológica de H&E. En 1 y 2 muestra nativa de espesor completo, 3 y 4 muestra capa mucosa, 5 y 6 protocolo SDS, 7 y 8 protocolo de Tx-100. Todas las imágenes tienen aumento a 4x y 20x respectivamente. Las barras de escala corresponden a 1000 μm en 4x y 100 μm en 20x. Fuente propia.

De igual forma las imágenes de fluorescencia obtenidas del marcaje de núcleo de las células con DAPI tanto de muestras nativas como experimentales demostraron resultados similares a los obtenidos para la tinción de H&E; en la figura 19 podemos confirmar la presencia de los núcleos y la distribución de las células en el tejido nativo, mientras que en las muestras experimentales apreciamos claramente la disminución del material celular después se someter los tejidos al proceso de descelularización observando únicamente remanentes celulares entre las fibras de colágena.

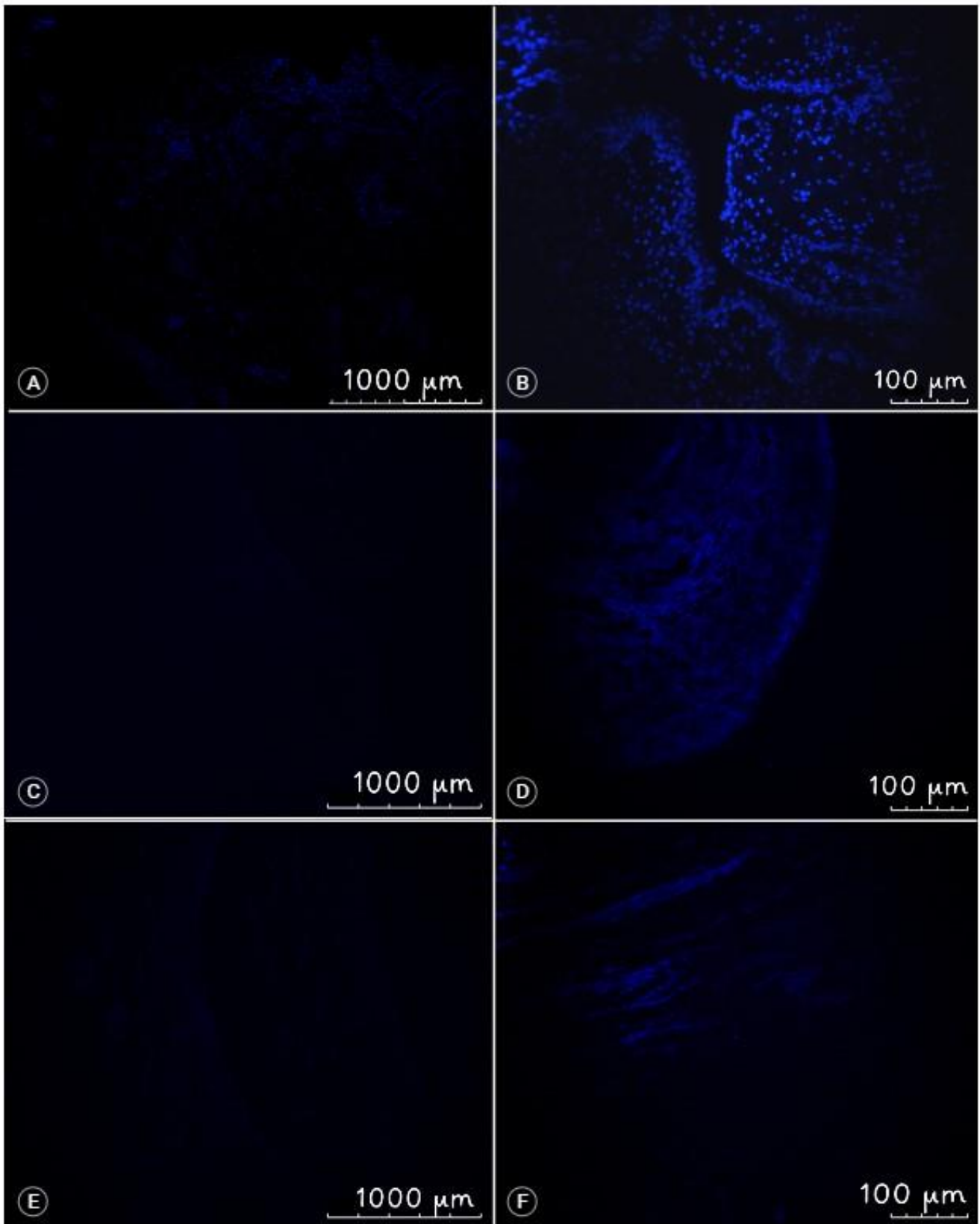


Figura 19. Tinción DAPI. Se muestran imágenes representativas del marcaje con DAPI de las muestras: las imágenes de la columna del lado izquierdo 4x barras de escala 1000 μm y lado derecho 20x barras de escala 100 μm , en A y B muestra nativa, C y D muestra de protocolo SDS y en E y F muestra protocolo Tx-100. Fuente propia.

Los resultados cualitativos que demuestran la descelerización de las muestras se confirmaron a través de la cuantificación de ADN remanente. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos los cuales fueron de un promedio de 0.269 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN en la muestra nativa, para la muestra descelerizada con el protocolo de SDS el contenido promedio fue de 0.107 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que para el protocolo con tritón X-100 fue de 0.109 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

| Contenido de ADN ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | | |
|--|------|-------|------|--------|------|
| Nativa | | SDS | | Tx-100 | |
| 50mg | 1gr | 50mg | 1gr | 50mg | 1gr |
| 0.285 | 5.70 | 0.104 | 2.08 | 0.107 | 2.14 |
| 0.246 | 4.92 | 0.105 | 2.10 | 0.113 | 2.26 |
| 0.276 | 5.52 | 0.113 | 2.26 | 0.107 | 2.14 |

Tabla 2. Resultados de cuantificación ADN. Se muestran los resultados de cuantificación de ADN de los tres grupos experimentales, en la primera columna de cada grupo se muestra el contenido por 50mg de muestra y la ponderación a 1gr de muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado $n=9$.

En la tabla 3 se muestra la conversión de los resultados promedios a ng/mg de muestra siendo de 2.14 ng/mg y 2.18 ng/mg respectivamente lo cual representa un porcentaje de descelerización del 61% para el SDS y de 60% para el protocolo de tritón X-100.

| Contenido de ADN ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 50mg muestra | | | Contenido ADN final (<50ng/mg dMEC peso seco) | Porcentaje de descelerización |
|---|-------------------------|-----------------------|---|-------------------------------|
| Muestra | $\mu\text{g}/\text{mL}$ | ng/mL | ng/mg | % |
| Nativa | 0.269 | 269 | 5.38 | ---- |
| SDS | 0.107 | 107 | 2.14 | 61 |
| Tx-100 | 0.109 | 109 | 2.18 | 60 |

Tabla 3. Conversión de los resultados de cuantificación de ADN. Se muestra el contenido promedio de ADN de cada grupo experimental en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en ng/mL , así como el contenido ADN final en ng/mg y el porcentaje promedio de descelerización utilizando como referencia el tejido nativo como 100%.

Los resultados de la prueba estadística para comparar los datos obtenidos de los ensayos de cuantificación (figura 20) confirmaron la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales y la muestra control. Por otra parte, también demostraron que no existe una diferencia significativa entre el contenido de ADN de los grupos experimentales; por ende, se decidió realizar la caracterización y síntesis de biotinta con muestras obtenidas por ambos protocolos.

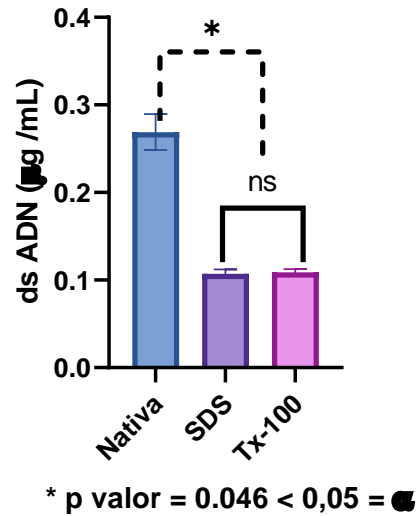


Figura 20. Cuantificación del contenido de ADN. Para los resultados de cuantificación se realizaron lecturas por triplicado para cada grupo experimental n=9, se realizó prueba de normalidad de Shapiro-Wilk estableciendo la distribución normal por lo que se realizó ANOVA de una vía con prueba pos- hoc de Tukey.

2. Caracterización de dMEC-UBM

El análisis de las micrografías obtenidas por la técnica SEM de dMEC-UBM para ambas muestras experimentales se observó la morfología de las muestras, en la cual resalta la ausencia de células (figura 21), en la superficie de la capa submucosa se aprecia la estructura de la membrana basal con la presencia de pliegues delgados y microsurcos con disposición aleatoria y en las secciones transversales la presencia de abundantes fibras que se pueden observar cómo estructuras con disposición aleatoria formando una membrana porosa interconectada.

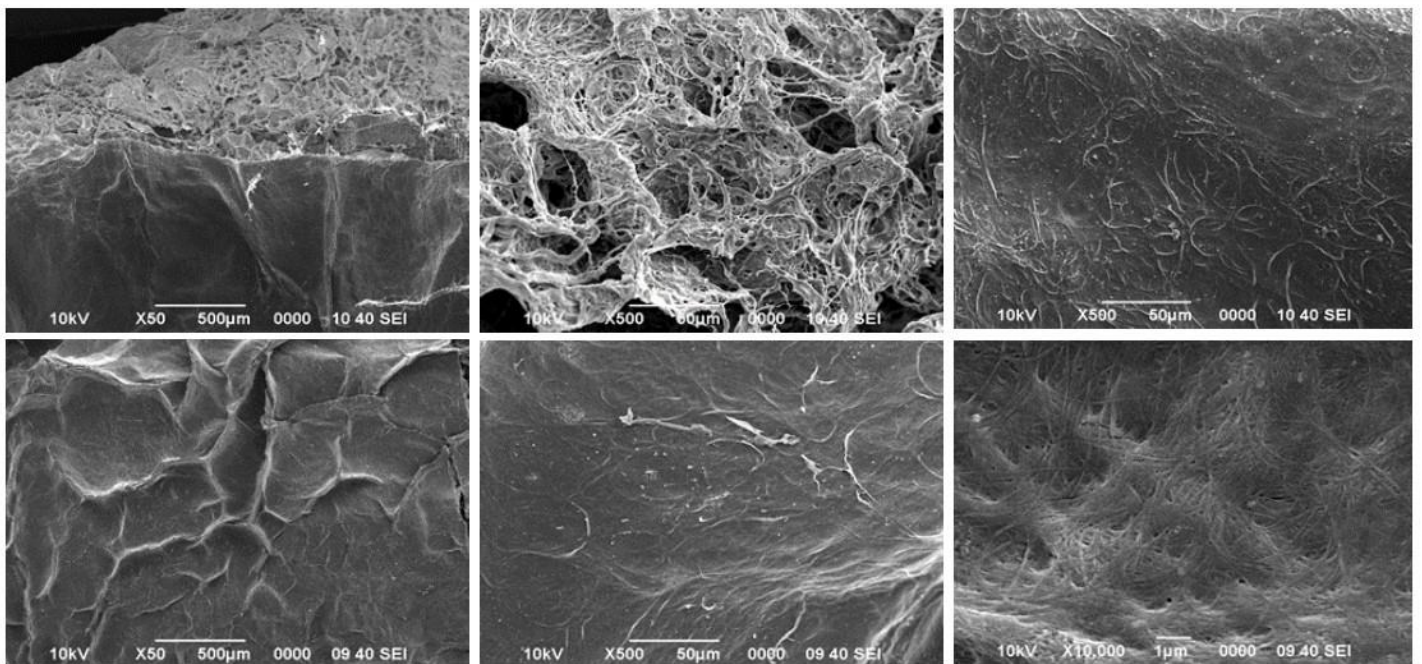


Figura 21. Caracterización por SEM de dMEC-UBM. En la parte superior se muestran imágenes representativas en diferentes zonas de las muestras del protocolo SDS y en la parte inferior del protocolo de Tx-100. Fuente propia.

En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de caracterización por la técnica de FT-IR. En los espectros obtenidos para los dos grupos experimentales y el grupo control se observaron resultados similares, presentaron los picos de absorción a los 1080, 1240, 1337, 1400, 1452, 1551 y 1632 cm^{-1} . Además, la presencia de bandas de absorción entre 985-1140, 2840-3000 y 3200-3550 cm^{-1}

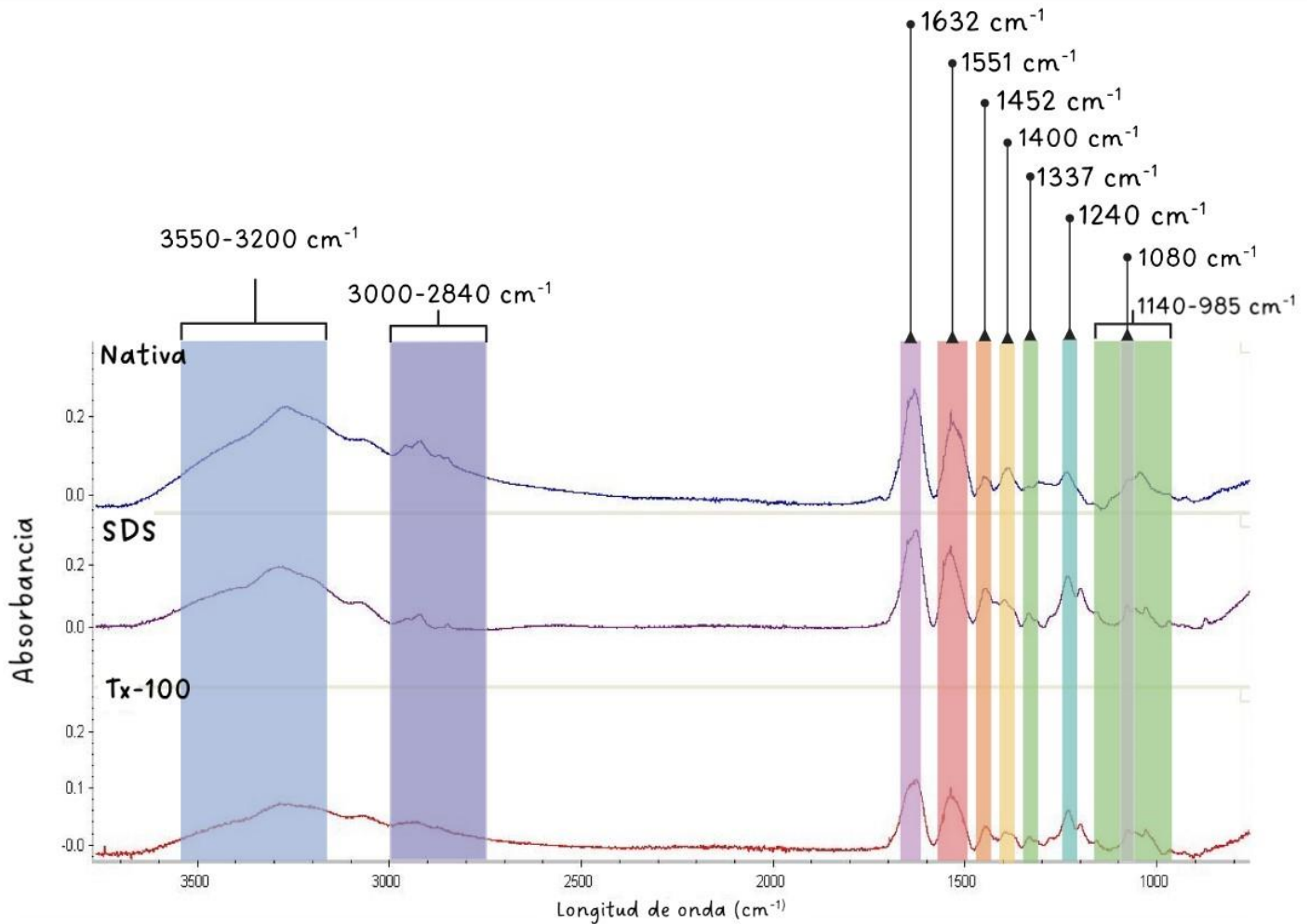


Figura 22. Caracterización por FT-IR de dMEC-UBM. Fuente Propia. Los corchetes indican la presencia y rango de las bandas presentes y los puntos indican los picos obtenidos del ensayo de caracterización.

Los resultados de la caracterización térmica por DSC se muestran en la figura 23. En los termogramas obtenidos las curvas de las muestras nativa y los grupos experimentales presentaron un comportamiento similar con dos picos endotérmicos. El primer pico endotérmico importante ocurrió a los 74.12°C en la muestra nativa, a los 74.58°C en SDS y a 75.54°C para Tx-100; el segundo pico endotérmico se produjo a los 194.87°C, 217.33°C y 226.22°C respectivamente.

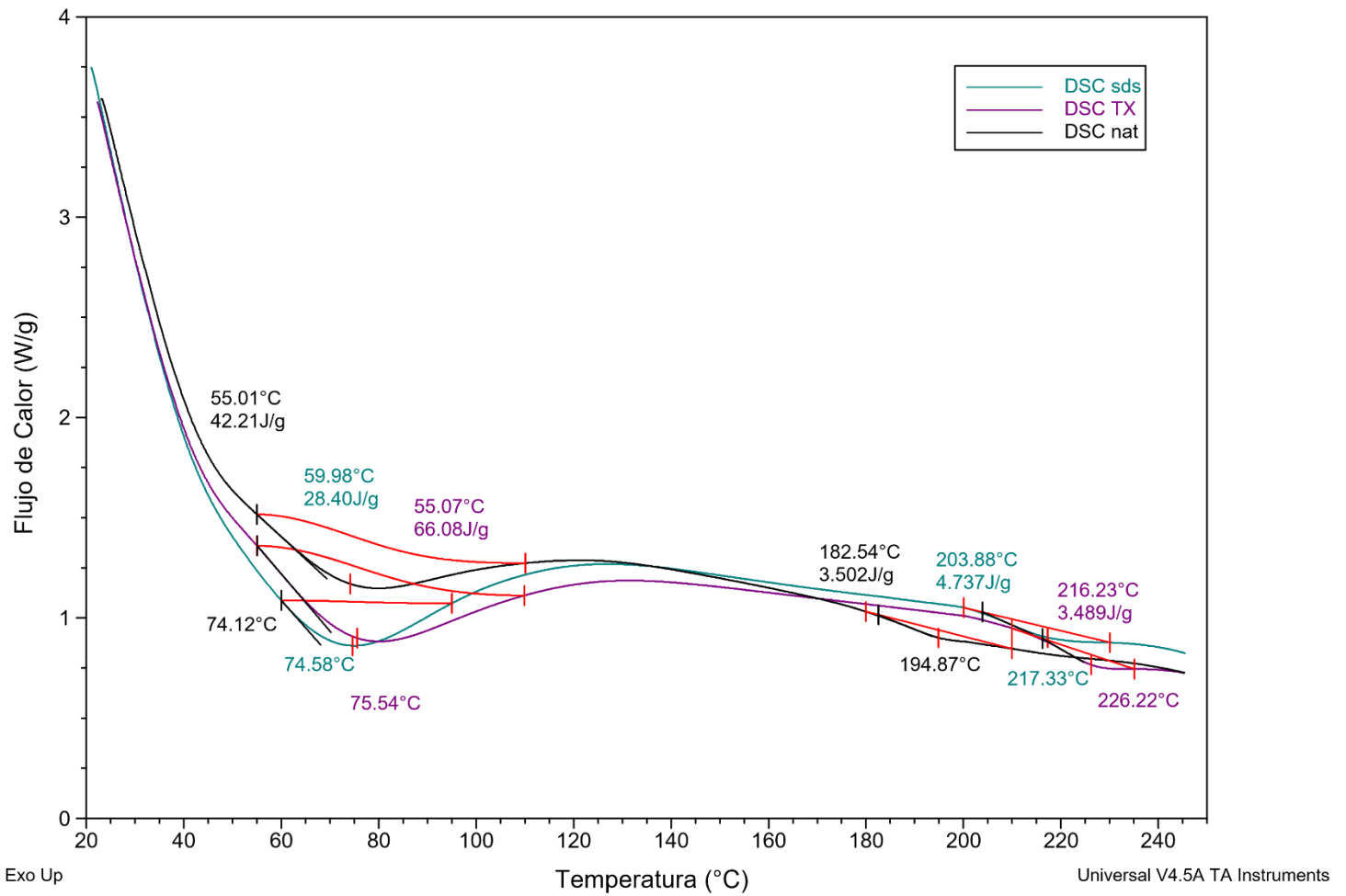


Figura 23. Perfil de calorimetría diferencial de barrido de dMEC-UBM. Se muestran los resultados del ensayo de caracterización térmica por DSC. En color negro muestra nativa, en color verde muestra descelularizada con protocolo SDS y en morado muestra descelularizada con protocolo tritón x-100.

Por otro lado, los resultados de la caracterización térmica por el ensayo de TGA se muestran en la figura 24. De acuerdo con los resultados tanto los grupos experimentales como el control presentaron un patrón muy similar; la primera pérdida de peso se presentó a los 66.73°C en el grupo control correspondiente a una pérdida de 5.5%, a los 74.42°C en SDS y a los 77.79°C para Tx-100 con una pérdida de peso de 10%. La segunda pérdida de peso en la muestra control fue del 10% y se presentó a los 197.44°C, mientras que en SDS se presentó a los 218.91°C y a los 226.39°C en Tx-100 con una pérdida del 15%.

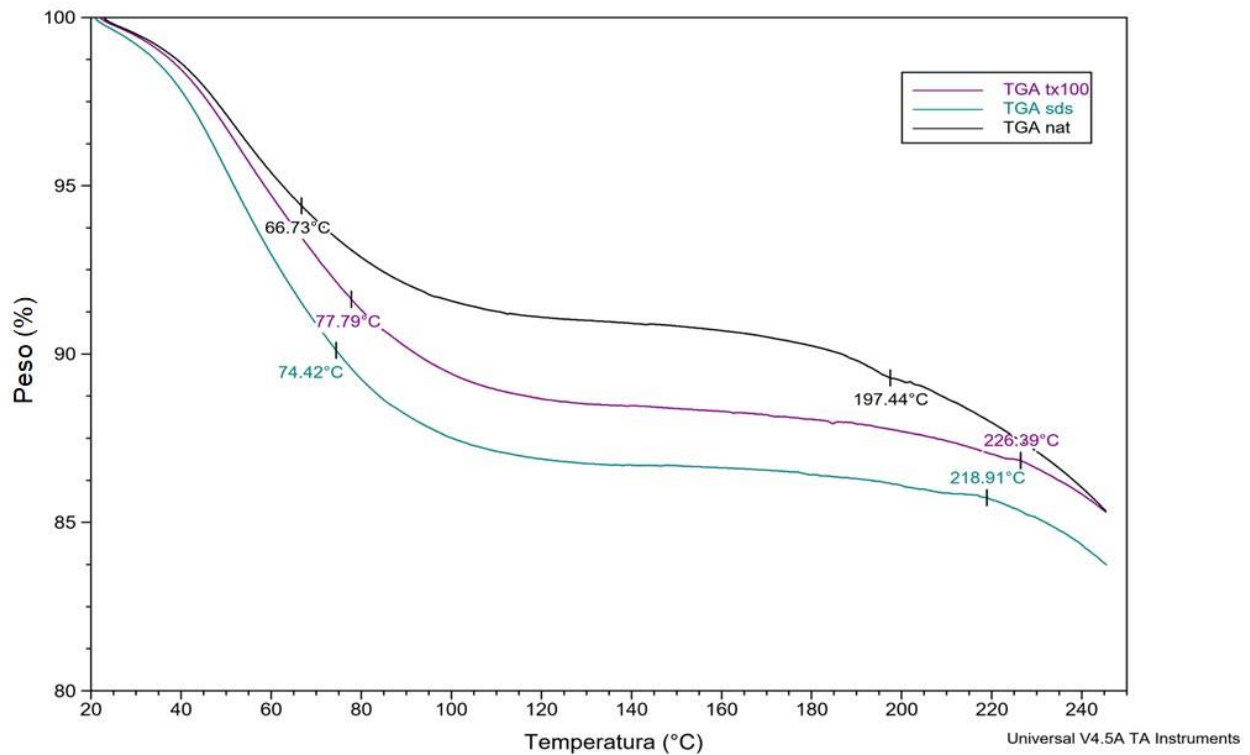


Figura 24. Perfil termogravimétrico de dMEC-UBM. Se muestran los resultados del ensayo de caracterización térmica por TGA. En color negro muestra nativa, en color verde muestra descelularizada con protocolo SDS y en morado muestra descelularizada con protocolo tritón x-100.

3. Evaluación de la biocompatibilidad del andamio 3D bioimpreso

Para la síntesis de la biotinta el primer paso fue la obtención del polvo dMEC UBM, en la figura 25 A se observan las muestras liofilizadas y en la figura 25B las mismas muestras después de los primeros ciclos de crio-molido finalmente en la figura 25 C y D se muestra polvo obtenido después de la implementación de todos los ciclos de crio molido y tamizaje.

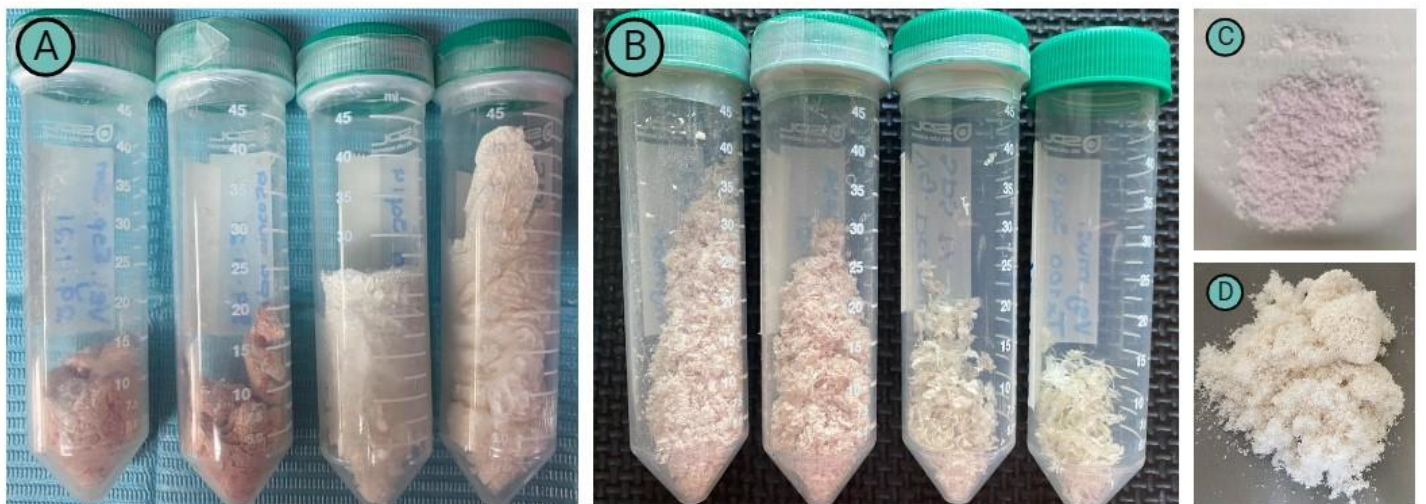


Figura 25. Síntesis de polvo dMEC-UBM. A) Imagen macroscópica de muestras liofilizadas (de izquierda a derecha, los dos primeros tubos contienen muestra nativa seguido de las muestras experimentales SDS y Tx-100 respectivamente). B) Imagen macroscópica de las muestras después de los primeros ciclos de crio-molido. C) Polvo del protocolo de SDS después del tamizaje. D) Polvo del protocolo Tx-100 después del tamizaje.

Una vez obtenido el polvo de matriz descelularizada se realizaron los ensayos de caracterización térmicos de las tintas (biotinta sin células). Los resultados del ensayo de DSC se muestran en la figura 26. En los termogramas observamos un pico endotérmico en cada grupo experimental el cual se presentó a temperaturas similares en los tres grupos, en el grupo control de alginato se observó a los 104.92°C y en la tinta con muestra SDS a los 107.15°C, mientras que en la tinta Tx-100 se presentó a los 108°C.

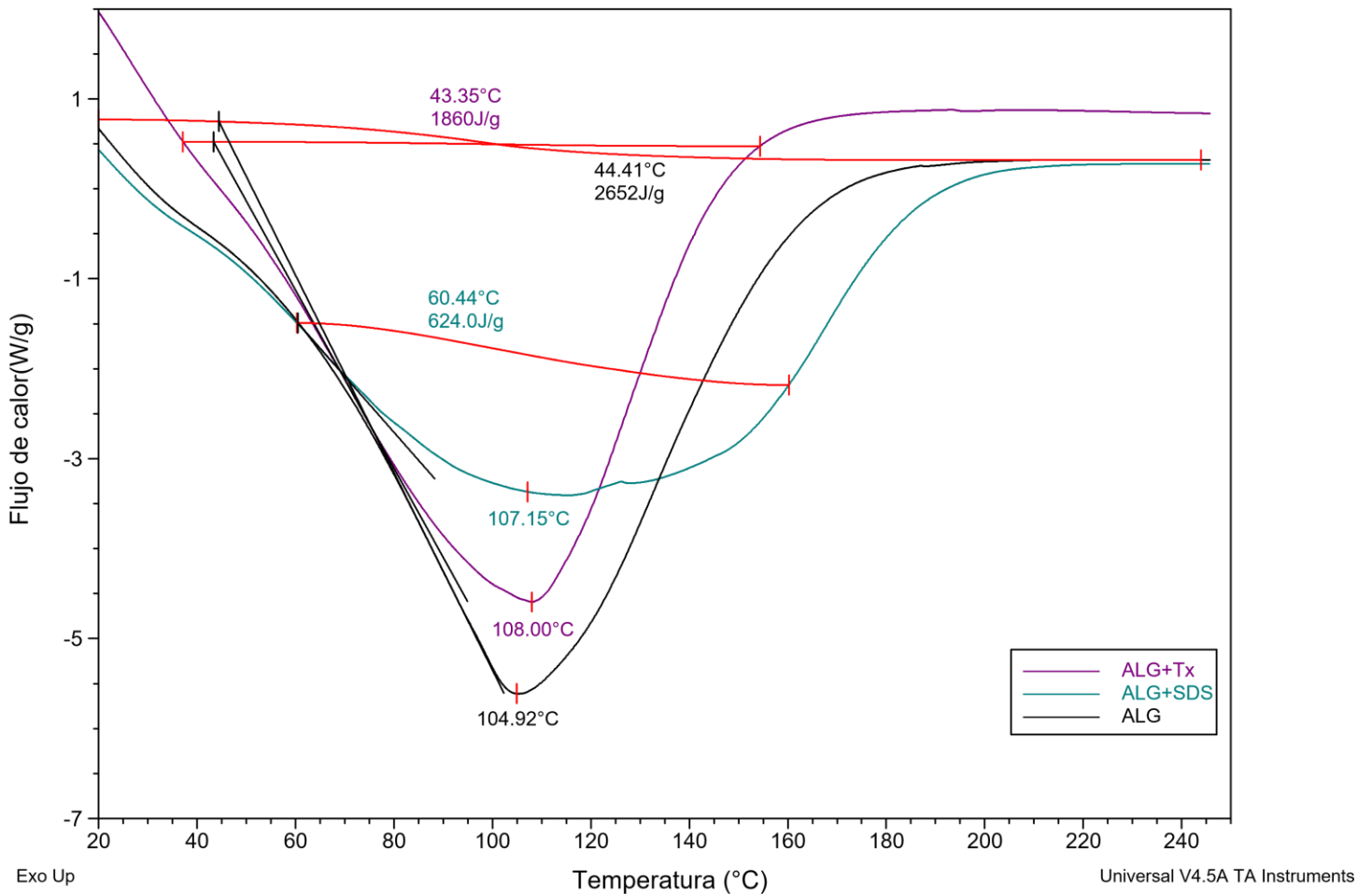


Figura 26. Perfil de calorimetría diferencial de barrido de las tintas. Se muestran los resultados del ensayo de caracterización térmica por DSC. En color negro muestra tinta 3.5% ALG, en color verde tinta 0.5% dMEC SDS + 3.5% ALG y en morado tinta 0.5% dMEC Tx-100 + 3.5% ALG.

Los resultados de la caracterización por TGA se muestran en la figura 27. La pérdida de peso del 50% se presentó a los 92.71°C en el grupo control, a los 103.60°C en la tinta con SDS y a los 88.99°C de la tinta con Tx-100. Por otro lado, la pérdida del 70% del peso de las muestras se observó a los 103.49°C en la muestra control y a los 126.47°C y 103.37°C respectivamente para las tintas experimentales.

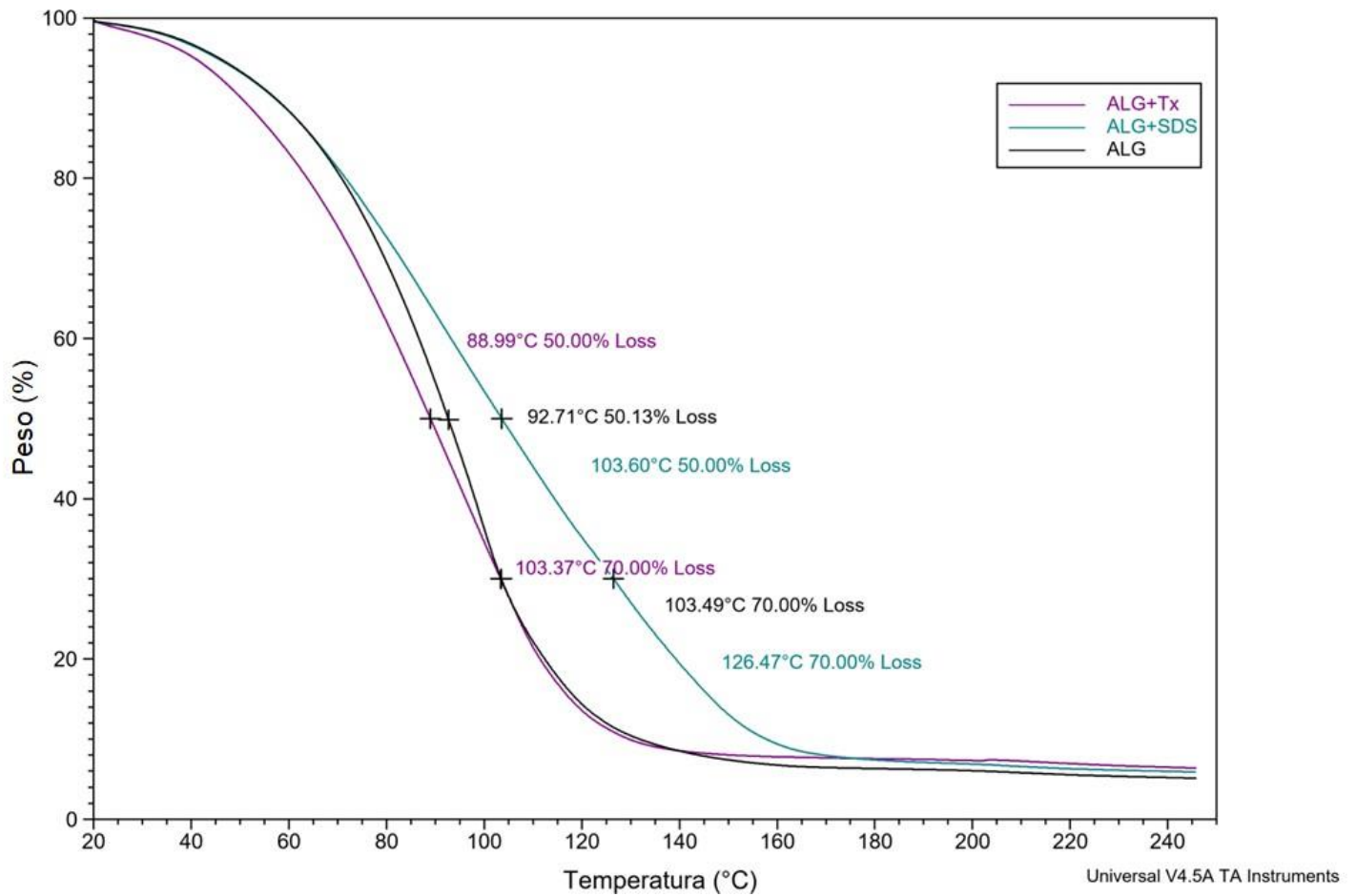


Figura 27. Perfil termogravimétrico de las tintas. Se muestran los resultados del ensayo de caracterización térmica por TGA. En color negro tinta de 3.5% ALG, en color verde tinta 0.5% dMEC SDS + 3.5% ALG y en morado tinta 0.5% dMEC Tx-100 + 3.5% ALG.

En la figura 28 se muestra el diseño del andamio que se realizó por medio de los softwares 3D Builder© y Ultimaker Cura© 4.12.1. Además, se muestra una imagen macroscópica del andamio 3D bioimpreso.

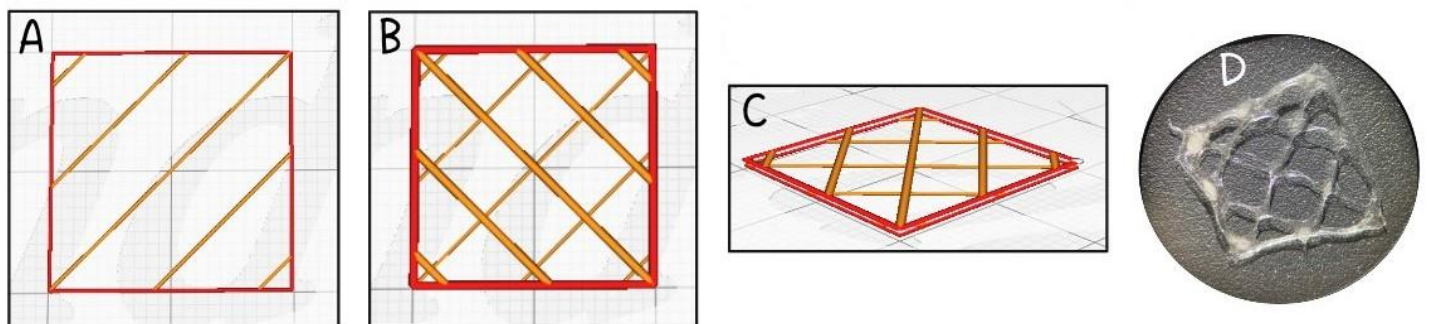


Figura 28. Diseño del andamio. Imágenes del programa Ultimaker Cura© 4.12.1 en: A) Vista superior de la primera capa de impresión, B) Vista superior de la segunda capa, C) Diseño completo y en D) Imagen macroscópica del andamio bioimpreso sin células.

Para verificar la presencia y la distribución de las células hGF-MSc en los andamios posterior al proceso de bioimpresión 3D se realizó la toma de imágenes de microscopía óptica (figura 29) en diferentes días de cultivo.

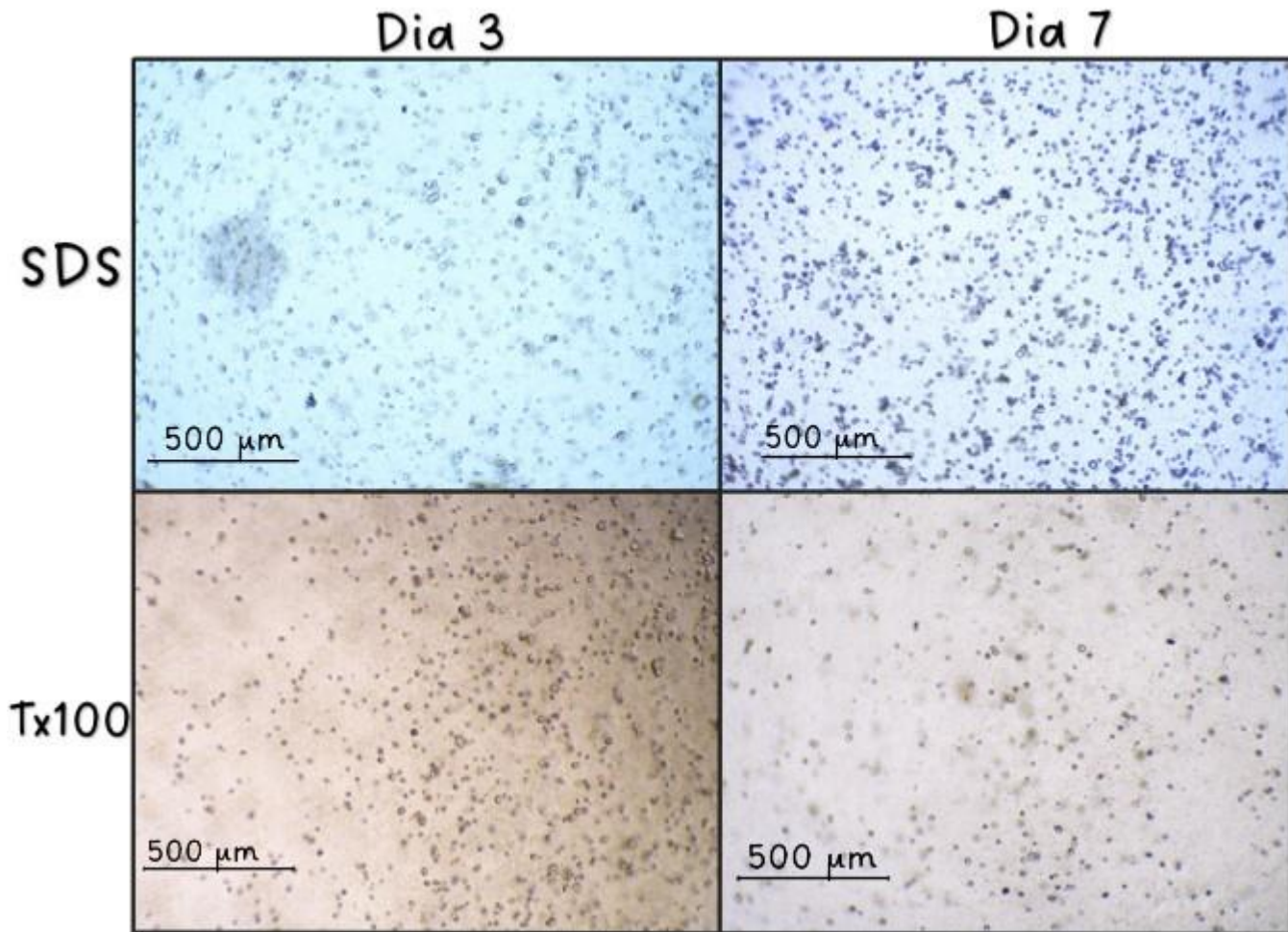


Figura 29. Distribución de las células en el andamio. Imágenes obtenidas por microscopía óptica a 4x de los andamios 3D bioimpresos con las dos diferentes biotintas a los 3 y 7 días de cultivo. Las barras de escala corresponden a 500 μm.

En la figura 30 se muestran los resultados obtenidos del marcaje de las células con CellTracker previo al proceso de bioimpresión y el marcaje con DAPI realizado posteriormente. En las imágenes del grupo control podemos observar la morfología fibroblástica característica de las células hGF-MSc cultivadas en monocapa mientras que en las imágenes de los grupos experimentales se aprecian las células encapsuladas dentro de la biotinta; con estos resultados podemos confirmar la presencia de células viables y su distribución dentro del andamio.

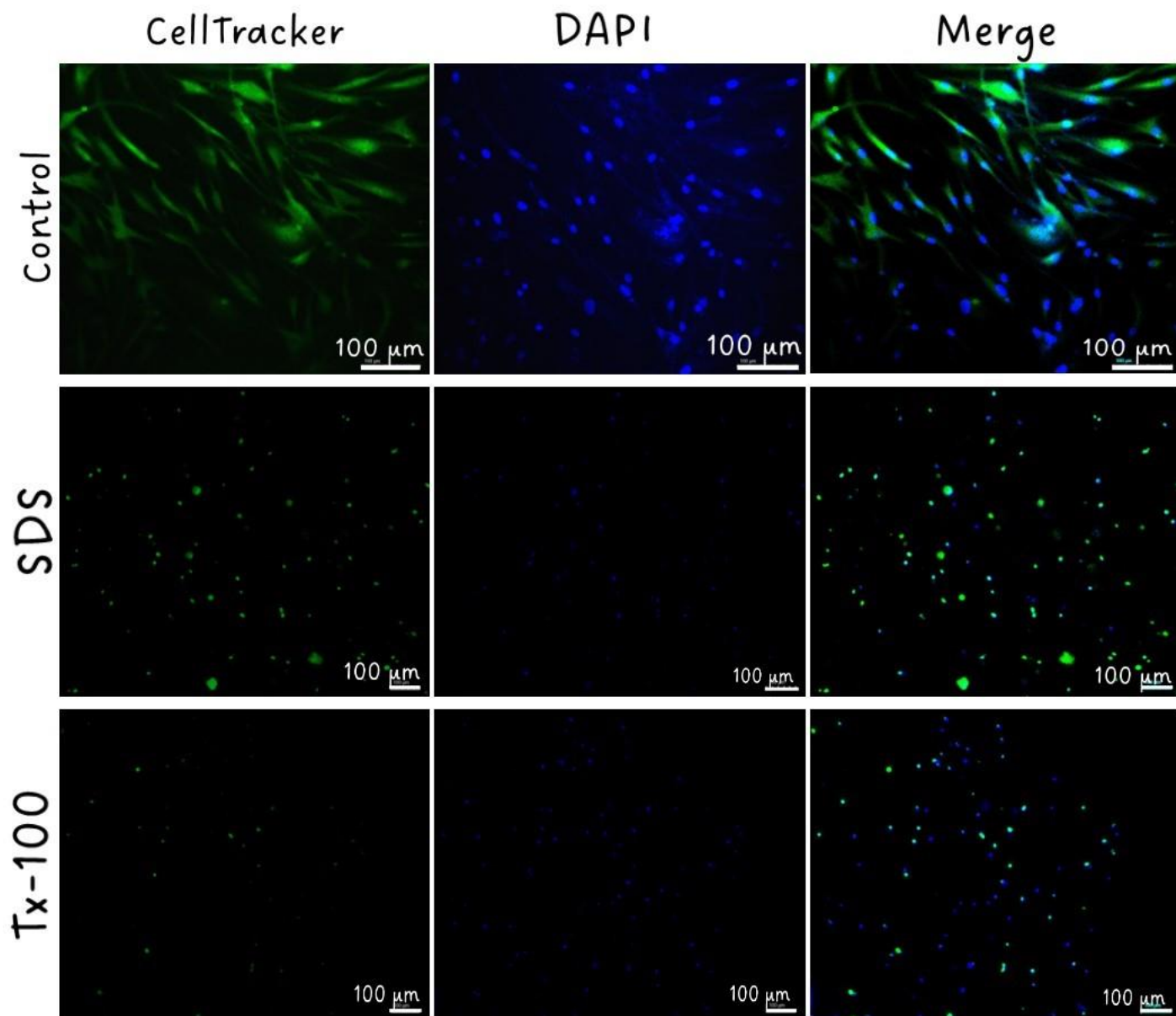


Figura 30. Evaluación de la distribución celular por marcaje CellTracker-DAPI. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia del marcaje de las células post-impresión de izquierda a derecha: CellTracker, DAPI y la unión de las imágenes "merge", para cada grupo control y experimentales. Las imágenes del grupo control son a 20x y barras de escala a 100 μm , en los grupos experimentales imágenes son a 10x y barras de escala a 100 μm .

Debido a que es un factor fundamental evaluar la biocompatibilidad de la biotinta se realizaron ensayos de viabilidad celular con resazurina hasta el día 7 de cultivo; como se mencionó anteriormente se imprimieron 3 andamios por grupo experimental y se utilizó como control la misma línea celular sembrada en monocapa. Los resultados gráficos del análisis estadístico se muestran en la figura 31. De acuerdo con estos resultados, no existe una diferencia en la viabilidad de las células a lo largo de los días de cultivo en el grupo control (figura 31 A) y se presenta una pequeña disminución del porcentaje de viabilidad en los grupos experimentales. Sin embargo, la viabilidad se mantiene por arriba del 90% en todos los grupos hasta el día 7 de evaluación (estos resultados se muestran resumidos en la tabla 4).

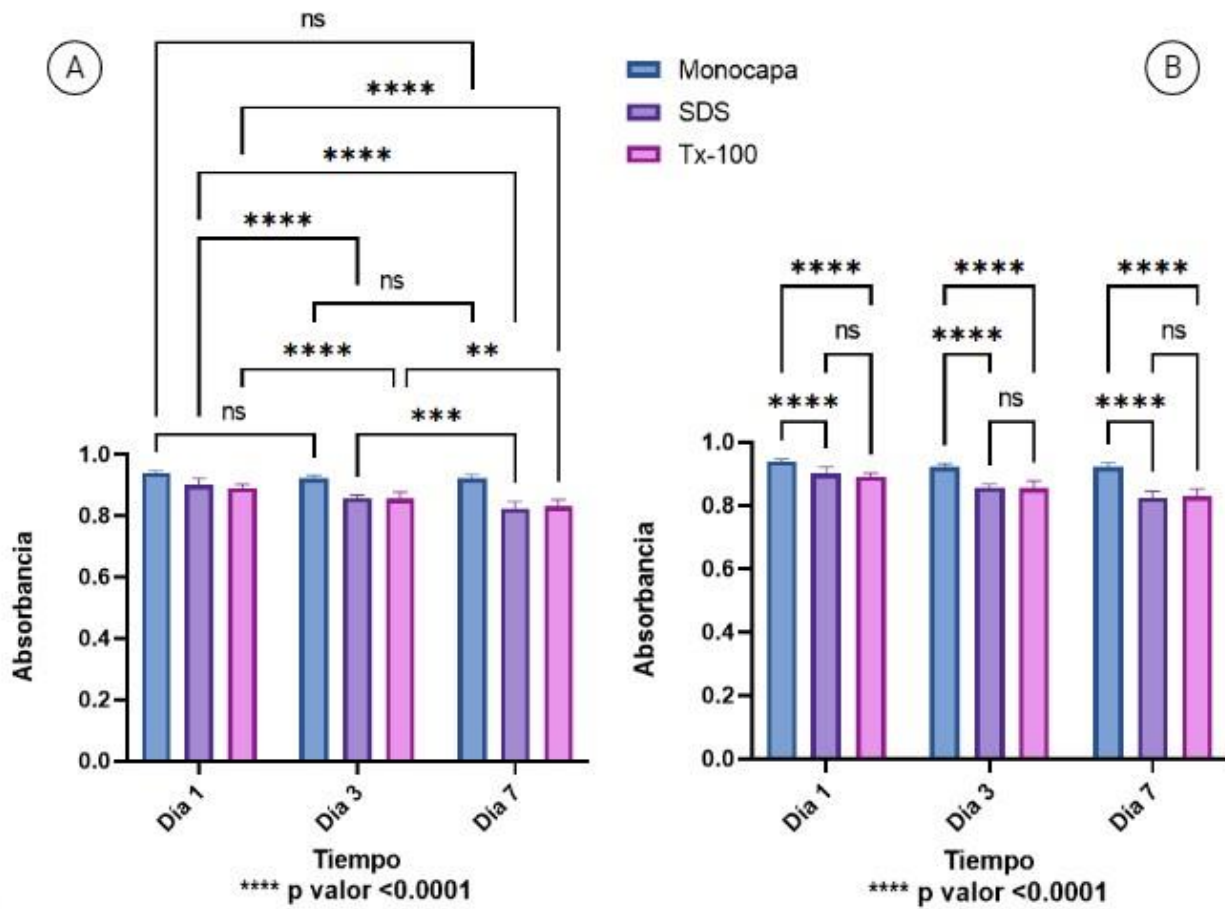


Figura 31. Viabilidad celular del andamio 3D bioimpreso. Para los resultados del ensayo de viabilidad con resazurina se realizaron lecturas por triplicado por cada día de evaluación por grupo n= 27 se realizó prueba de normalidad de Shapiro-Wilk estableciendo la distribución normal por lo que se realizó ANOVA de dos vías con prueba pos- hoc de Tukey.

| Grupo | Resultado promedio de absorbancia | Porcentaje |
|----------------|-----------------------------------|------------|
| Control | | |
| Día 1 | 0.940 | 100% |
| Día 3 | 0.921 | 98% |
| Día 7 | 0.920 | 98% |
| SDS | | |
| Día 1 | 0.900 | 96% |
| Día 3 | 0.856 | 93% |
| Día 7 | 0.823 | 90% |
| Tx-100 | | |
| Día 1 | 0.888 | 95% |
| Día 3 | 0.855 | 93% |
| Día 7 | 0.831 | 90% |

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad celular. En la tabla se muestran los resultados promedio obtenidos por día de la lectura de las placas de los ensayos de viabilidad con resazurina n=9. Los porcentajes se calcularon considerando los resultados promedios obtenidos para el grupo control del día correspondiente como 100%.

La comparación de los resultados del ensayo de viabilidad por día entre los grupos se muestra en la figura 31 B. Los resultados demuestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa en los resultados de viabilidad obtenidos entre las muestras experimentales y se observa una diferencia mínima entre los grupos experimentales y el grupo control.

Finalmente, para verificar los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad, se realizó un ensayo de seguimiento por medio del marcaje de las células como se menciono anteriormente y su evaluación hasta el día 7 de cultivo, en la figura 32 se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en las que podemos confirmar que no se presentaron diferencias en la distribución de las células e incluso se pudieron apreciar algunos grupos celulares.

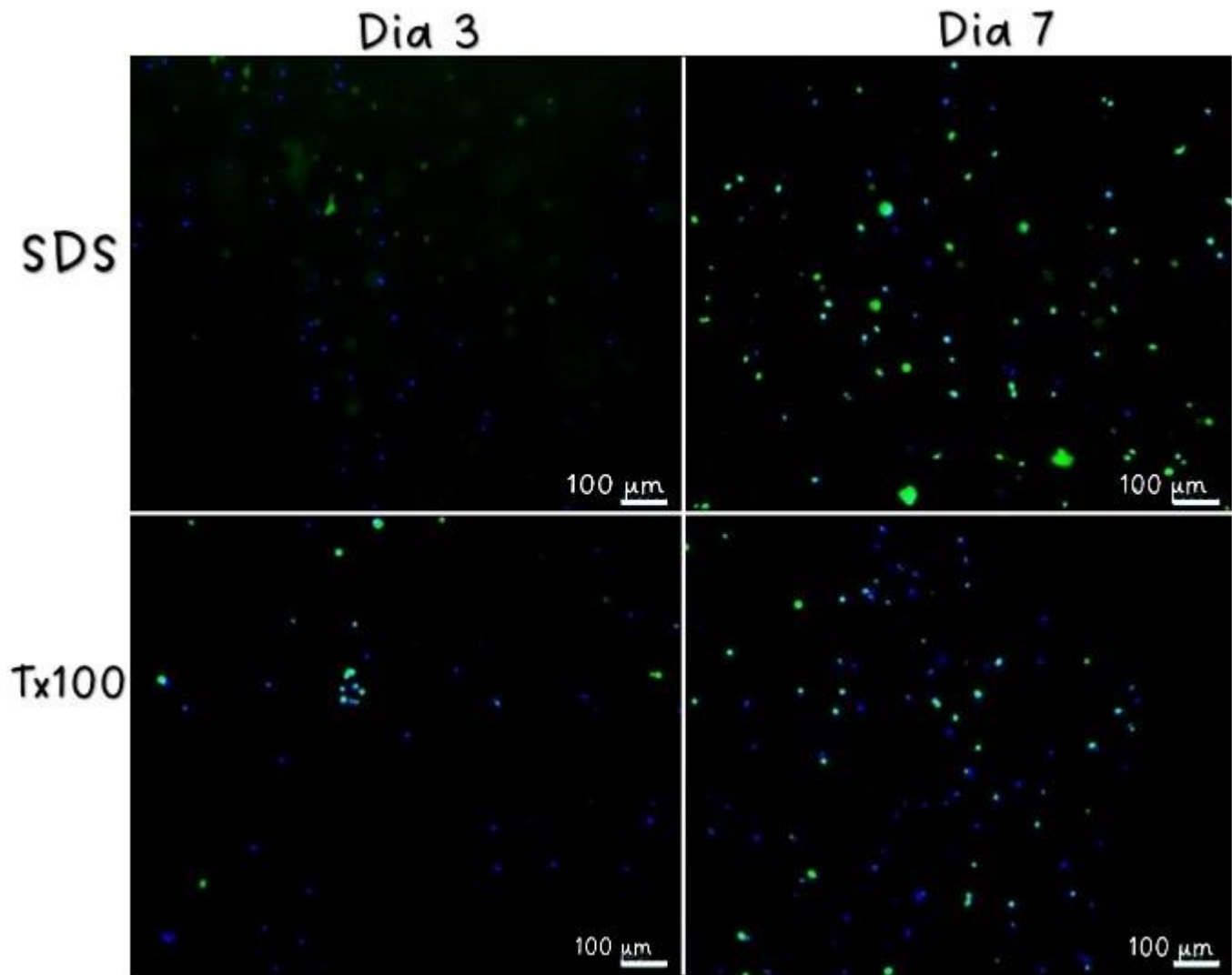


Figura 32. Seguimiento de la viabilidad células. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia del marcaje de las células a los días 3 y 7 post-impresión para ambos grupos experimentales, imágenes tomadas a 10x barras de escala a 100 μm.

Estos resultados demuestran que los polvos de dMEC-UBM obtenidos por medio de la implementación de los protocolos de SDS y Tritón X-100 utilizados en una concentración del 0.5% permiten sintetizar una biotinta compatible citocompatible con las células hGF-MSc y permiten el mantenimiento de la viabilidad celular >90% hasta el día 7 de cultivo.

VIII. Discusión

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación interdisciplinario el cual se encuentra encaminado a la obtención de un material adecuado para lograr la regeneración tisular, específicamente hablando del hueso, la ingeniería de tejidos óseos tiene como principal objetivo el brindar alternativas para restaurar mantener o mejorar el tejido óseo dañado o perdido como resultado de algún tipo de lesión, traumatismo o enfermedad.

Actualmente se busca el desarrollo de andamios que mimeticen a la matriz extracelular del tejido nativo, debido en gran parte a las diversas funciones de vital importancia que desempeña en la fisiología celular, el proceso de regeneración y la homeostasis del propio tejido (Hansen et al., 2015; Karamanos et al., 2021; Mendibil et al., 2020) por ende hoy en día el campo de la ingeniería de tejidos óseos se enfoca en el diseño y síntesis de andamios lo más semejante posible a la matriz extracelular tanto a nivel estructural como en composición y actividad biológica.

El objetivo de este proyecto fue sintetizar una biotinta para bioimpresión de andamios celulares 3D bajo tecnologías de bioimpresión basadas en extrusión. La composición de la biotinta consistió en utilizar alginato de sodio y células troncales mesenquimales de tejido gingival (hGF-MSC). El alginato es un polímero de origen natural que permite la encapsulación celular y que además presenta diversas propiedades compatibles con los sistemas de bioimpresión 3D basados en extrusión (Gopinathan and Noh, 2018; Mandrycky et al., 2016; Ramiah et al., 2020); sin embargo, la principal desventaja de estos es la nula interacción con las células (Jia et al., 2014), por ende, mejorar la capacidad de interacción de estos dos elementos que constituyen a la biotinta es un factor clave para el éxito de estos biomateriales.

Optamos por aprovechar las propiedades bioquímicas que nos brindan las matrices descelularizadas para la síntesis de un polvo y optimización de la biotinta a base de alginato. El desarrollo de la técnica de descelularización de órganos y tejidos surgió como una alternativa eficiente para la obtención de matriz extracelular descelularizada, logrando descelularizar diferentes tejidos tanto de origen alogénico como xenogénico (Boroumand et al., 2018; Giraldo-Gomez et al., 2019; Ijima et al., 2018; Mattei et al., 2017; Simões et al., 2017; Walawalkar and Almelkar, 2019; Wang et al., 2017). Sin embargo, la preservación de la compleja estructura y ultraestructura tridimensional es necesaria para su posible aplicación clínica, debido a que los protocolos de descelularización alteran en mayor o menor grado la estructura de la matriz extracelular, se ha visto afectado su traslado en diversas aplicaciones clínicas. A pesar de ello también se ha demostrado la preservación de diversos componentes de matriz de los tejidos descelularizados; los cuales se encuentran presentes y funcionales generando un uso alternativo para estas matrices en la síntesis de polvos o hidrogeles con propiedades bioquímicas óptimas para fines regenerativos.

Utilizamos matriz de mucosa de vejiga urinaria (UBM) porcina debido en gran parte a su composición la cual consiste en colágena tipo 1, 2, 3 y 4, laminina y elastina, así como factores de crecimiento: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogenética ósea 4 (BMP4), factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-BB), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante α (TGF α) (Chun et al., 2007) Todos estos siendo proteínas estructurales y factores de crecimiento importantes en el proceso de formación del tejido óseo.

La descelularización de la matriz de vejiga urinaria se ha logrado a través de la implementación de diferentes protocolos, los más comunes incluyen agentes físicos como cambios de temperatura y agitación en combinación con agentes químicos principalmente detergentes como el tritón x-100 (Yang et al., 2010) y el SDS (Kao et al., 2020), tratamientos con ácido peracético (PAA), con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Allbritton-King et al., 2021; Liu et al., 2009) y agentes biológicos por medio del tratamiento con tripsina (Rosario et al., 2008). En este proyecto se implementaron dos protocolos de descelularización una basado en el uso de SDS y otro con tritón x-100, ambos detergentes han demostrado su efectividad para eliminar el contenido celular y su capacidad para preservar componentes de MEC (Gilbert et al., 2006; Hillebrandt et al., 2019; Moffat et al., 2022). Además, se ha demostrado la eficacia de estos protocolos a través de ensayos de PCR en tiempo real para proteínas de matriz extracelular como beta actina (ACTB) (Silva-Benítez et al., 2015).

Durante el proceso de descelularización los tejidos perdieron paulatinamente su color natural hasta volverse translúcidos, estos cambios macroscópicos se han reportado en la descelularización de otros tejidos como piel (Brouki Milan et al., 2020a), cartílago traqueal (Giraldo-Gomez et al., 2019), y de otros órganos como el corazón (Weymann et al., 2011), hígado (Willemse et al., 2020), pulmones (Li et al., 2021; Uriarte et al., 2018) entre otros. Sin embargo, esta característica macroscópica que se presenta comúnmente en los tejidos sometidos a este tipo de metodologías no garantiza su efectividad.

Actualmente no existen criterios absolutos para confirmar la descelularización de una órgano o tejido, nosotros establecimos el éxito de la descelularización con base en los criterios mencionados en la literatura (Crapo et al., 2011). La descelularización de las muestras se demostró por medio del procesamiento histológico para tinción con H&E y el marcaje de los núcleos celulares con DAPI donde en la evaluación de las micrografías obtenidas para ambos ensayos no fue posible identificar la presencia de células o de núcleos, siendo estos ensayos positivos para los grupos control. Además, la cuantificación de ADN residual mostró una diferencia significativa en el contenido de ADN de las muestras experimentales con el grupo control, siendo el contenido de ADN <50ng/mg de matriz descelularizada liofilizada, específicamente el contenido promedio fue de 2.14 ng/mg para

el protocolo de SDS y de 2.18 ng/mg para el protocolo de tritón x-100, presentando un promedio de descelularización del 60%.

Previo a la obtención de los polvos de dMEC-UBM realizamos ensayos de caracterización fisicoquímica de las muestras; en el análisis de las micrografías de SEM se observaron características propias de la arquitectura del tipo de tejido como la presencia de pliegues, y micro crestas ambos con disposición aleatoria (Croft and Nelson, 1979; Nelson et al., 1979), además de la presencia de poros en la superficie de la membrana basal, lamina propia y en la sección trasversal, estos resultados coinciden no solo con los resultados obtenidos para muestras de UBM descelularizadas con otros protocolos (Kao et al., 2020; Liu et al., 2009) sino para otros tipos de tejidos descelularizados (Brouki Milan et al., 2020b; Fernández-Pérez and Ahearne, 2019; Giraldo-Gómez et al., 2019; Ijima et al., 2018; Li et al., 2021; Walawalkar and Almelkar, 2019; Willemse et al., 2020).

En la caracterización química de las matrices, en el espectro de vibración del ensayo de FT-IR se presentaron diversas bandas y picos; las dos primeras bandas se presentaron entre los $3550-3200\text{ cm}^{-1}$ y los $3000-2840\text{ cm}^{-1}$ las cuales se encuentran asociadas a las vibraciones del estiramiento en N-H de amida A y B respectivamente (Barraza-Garza et al., 2013; He et al., 2011; Jose et al., 2009). La colágena se caracteriza por su estructura de triple hélice, dicha estructura helicoidal tiene un máximo de adsorción en 1640 cm^{-1} predominantemente por las vibraciones de estiramiento de C=O de la amida I y a los 1550 cm^{-1} debido a las vibraciones de flexión de N-H y de las vibraciones de estiramiento C-N en amida II (He et al., 2011; Jose et al., 2009; Ku et al., 2007; Madhan et al., 2005), las bandas correspondientes a la banda amida I y II en nuestros resultados se presentaron a los 1632 y 1551 cm^{-1} respectivamente. El pico de la amida III es complejo y consta de estiramiento en C-N y de la flexión plana de NH, así como de absorciones que surgen de las vibraciones de los grupos CH_2 de la glicina y de las cadenas laterales de la prolina, sin embargo el pico principal de la amida III se encuentra presente y se observa a los 1240 cm^{-1} (He et al., 2011; Jose et al., 2009; Ku et al., 2007; Madhan et al., 2005; Riaz et al., 2018). Además se presentaron los picos de absorción relacionados con carbohidratos entre $1140-985\text{ cm}^{-1}$ (Barraza-Garza et al., 2013). Con estos resultados demostramos la presencia de componentes de matriz extracelular en los dos tipos de muestras descelularizadas.

El análisis térmico de las muestras es importante para caracterizar los cambios estructurales propios de las macromoléculas presentes, así como establecer si hubo algún grado de degradación al ser comparadas con las muestras control. Los resultados del ensayo DSC de dMEC-UBM mostraron dos picos endotérmicos tanto para las muestras control como experimentales; el primer pico endotérmico se presentó a los 74.12°C en el grupo control y a 74.58°C y 75.54°C para SDS y Tritón X-100 respectivamente, este primer pico se relaciona con la temperatura de desnaturalización térmica de la colágena (T_d) el cual se ha reportado en un rango de 65.5°C a los 100°C (Bigi et al., 1987; Bozec and Odlyha, 2011, 2011; Giraldo-Gomez et al., 2019; He et al., 2011; Jose et al., 2009; Mano and Ribeiro e Silva,

2007; Pietrucha, 2005). La fluctuación en la Td de la colágena que podemos apreciar en los termogramas obtenidos se debe a que la desnaturalización térmica depende en gran medida del contenido de agua y en su grado de reticulación, este cambio endotérmico se produce por el efecto caotrópico resultado de la disociación de los enlaces de hidrogeno que estabilizan el plegamiento en triple hélice de la colágena y correlacionan con los resultados de los ensayos de TGA en donde la pérdida de peso de las muestras del 5 y 10% tuvo lugar a los 66.73°C en el grupo control y a 74.42°C y 77.49°C en SDS y Tx-100, temperaturas muy similares a las que se presentaron los primeros picos endotérmicos en los ensayos de DSC. El segundo pico endotérmico presente a los 194.87°C en la muestra nativa y a los 217.33°C y 226.22°C en las muestras experimentales, corresponden a la temperatura del inicio de la descomposición de la colágena reportado entre 220 y 226°C (Bigi et al., 1987; Giraldo-Gomez et al., 2019; Pietrucha, 2005; Wang et al., 2001). En los ensayos de TGA se presentó la temperatura de degradación parcial a los 197.44°C en muestra nativa, 218.91°C en SDS y a los 226.39°C en Tx-100 correspondiente a la pérdida de entre 10-15% del peso.

La caracterización por DSC y TGA de las tintas permitió comprobar la estabilidad térmica de las mismas; en el caso del ensayo DSC se observó un patrón similar entre las tintas con la presencia de un pico endotérmico entre los 100-110°C que corresponde a la pérdida de peso de las muestras del 70% el cual se presentó entre los 100-120°C en los resultados de TGA; dichos valores se han reportado en termogramas de hidrogeles de alginato de diferentes concentraciones y está asociado a la deshidratación y ruptura de enlaces los cuales se presentan a temperaturas <200°C (Matsumoto et al., 2017; Tong et al., 2017).

Existen diversos factores que determinan la biocompatibilidad e imprimibilidad de la biotinta, dentro de ellos se incluyen: factores relacionados con la citotoxicidad de los componentes y sus concentraciones que determinan la viscosidad y propiedades reológicas, además de parámetros de impresión y factores asociados con la técnica de bioimpresión utilizada. Con respecto al primer punto la síntesis de la biotinta consistió en utilizar el polvo de matriz descelularizada y el alginato de sodio el cual es un biomaterial no citotóxico, biocompatible no inmunogénico e incluso aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA); la concentración utilizada fue de 0.5% y 3.5% respectivamente dicha concentración es similar a las concentraciones reportadas en diversos trabajos para la síntesis de biotintas para bioimpresión 3D basada en extrusión los cuales oscilan entre 1-5% (Jessop et al., 2019; Müller et al., 2017; Somasekharan et al., 2021; Wright et al., 2020). En general biotintas con altas viscosidades requieren de una presión de extrusión alta que se correlaciona con una velocidad de impresión elevada lo que da como resultado una disminución de la viabilidad celular; el rango de velocidad factible se ha reportado entre 1-40 mm/s (Adhikari et al., 2021; Emmermacher et al., 2020). Las concentraciones implementadas permitieron sintetizar una biotinta con una viscosidad adecuada para las condiciones de impresión que nos permitió el equipo utilizado, las cuales fueron una velocidad de impresión de 10 mm/s.

Otro componente fundamental de la biotinta son las células y un aspecto esencial es el tipo de células incorporadas, diferentes líneas celulares se han utilizado para la síntesis de biotintas, por ejemplo, células troncales mesenquimales humanas hMSCs (Chimene et al., 2020; Govindharaj et al., 2022), células troncales de médula ósea humana (hBMSCs) (Nulty et al., 2021), fibroblastos embrionarios de ratón (NIH3T3) (Lee et al., 2021), entre otras (Khafi et al., 2022; Mota et al., 2020; Wu et al., 2022). Utilizamos células hGF-MSC una línea celular que muestra una morfología fibroblástica, con un citoplasma escaso, alargado y un núcleo central. Se presume que la membrana celular se puede elongar en un área de hasta 5% sin causar ningún daño (Lepowsky et al., 2018). Sin embargo, existen diferencias en la constitución del citoesqueleto y la membrana plasmática asociadas al tipo celular que influyen en la tasa de supervivencia; por ejemplo, un mayor tamaño celular es más sensible a las fuerzas mecánicas de cizallamiento, por el contrario, esta susceptibilidad disminuye en células de forma más esférica (Emmermacher et al., 2020). Si bien las células tienen la capacidad de resistir grandes deformaciones y recuperarse los daños graves en la membrana celular y/o al citoesqueleto eventualmente pueden conducir a un daño celular irreversible (Boularaoui et al., 2020). Por ende, otro parámetro de consideración es la densidad celular utilizada, dicho parámetro influye directamente en la viscosidad de la biotinta lo cual afecta otros parámetros del proceso de impresión. Por este motivo optamos por utilizar una densidad celular de 1×10^6 células por mL concentraciones utilizadas para otros tipos de biotintas (Lee et al., 2021, 2020). Existen reportes de síntesis de biotinta con densidades celulares menores a 1×10^6 células por mL (Govindharaj et al., 2022; Nulty et al., 2021) y mayores (Khafi et al., 2022; Wu et al., 2022), actualmente se considera que una alta densidad celular $>5 \times 10^6$ células por mL compromete las interacciones célula-célula y una concentración $<1 \times 10^6$ células por mL genera una interacción in vitro reducida.

Dentro de los parámetros de impresión consideramos la geometría y diámetro de la punta, en relación con las características de la biotinta para minimizar el daño celular; como se ha reportado en diversa literatura la tensión máxima en las agujas cónicas permanece confinada alrededor de zona de salida de la tinta por lo que se reduce el tiempo en el que las células se encuentran sometidas a un alto esfuerzo de cizallamiento, por otro lado, las puntas cilíndricas ofrecen tensiones de cizallamiento menores, pero se presentan en toda la longitud de la punta es decir en tiempos prolongados lo que causa daños celulares severos (Adhikari et al., 2021; Chand et al., 2022; Li et al., 2015; Malekpour and Chen, 2022). Con relación a el diámetro de la punta debido a que diámetros de punta pequeños ($<250 \mu\text{m}$) ofrecen mejor resolución de impresión, pero generan tensión de cizallamiento excesiva, mientras que puntas de tamaño intermedio ($250\text{-}800 \mu\text{m}$) ofrecen un equilibrio entre resolución y viabilidad celular (Adhikari et al., 2021), optamos por el uso de puntas de geometría cónica con un diámetro de punta de $640 \mu\text{m}$ adecuado para la viscosidad de la biotinta que permitiera la extrusión de esta sin modificar otros parámetros de impresión.

Finalmente, con los parámetros antes mencionados se logró la bioimpresión de andamios celulares 3D y comprobamos la biocompatibilidad de las biotintas mediante los ensayos de

resazurina los cuales demostraron el mantenimiento de viabilidad posterior a la impresión por arriba del 95%. De igual forma confirmamos una buena distribución celular dentro del andamio y el mantenimiento de la viabilidad por arriba del 90% hasta los 7 días de cultivo.

Es importante aprovechar al máximo las posibles mejoras previo a pensar en una aplicación clínica, por ejemplo, probar diferentes concentraciones de dMEC para determinar una concentración mínima efectiva, aumentar la densidad celular utilizada para mejorar las interacciones celulares y el intercambio de nutrientes y oxígeno; prolongar los tiempos de evaluación *in vitro* así como el uso de medios de cultivo de inducción a diferenciación tejido específica, optimizar las propiedades mecánicas de la tinta combinando el alginato con otros biomateriales y/o aumentando su concentración y la impresión de estructuras más complejas y similares al tejido objetivo; lo antes mencionado para poder trasladar el proyecto un modelo *in vivo*.

Actualmente se busca el desarrollo de andamios que mimeticen tanto a nivel estructural como en composición y actividad biológica a una matriz extracelular nativa, si bien hoy en día existen diversas opciones para el tratamiento de defectos óseos de diferentes etiologías ninguno cubre al cien por ciento con todas las necesidades para tratar la pérdida de tejido óseo. Por lo cual es importante que se continúe con el desarrollo de nuevas estrategias que proporcionen tratamientos alternativos. A largo plazo la bioimpresión 3D proporcionaría de una fuente alternativa para la obtención no solo de tejido óseo si no de otros tipos de tejido y órganos completos para trasplante, no obstante, es importante resaltar otras aplicaciones a corto plazo como una alternativa al uso de modelo animal en investigación, modelos de tejidos y órganos en estado sano y enfermo, así como el testeo de fármacos tejido-específicos.

IX. Conclusiones

- Se obtuvieron matrices descelularizadas (dMEC) de mucosa de vejiga urinaria UBM porcina y se demostró la efectividad de los protocolos basados en el uso de los detergentes el SDS y tritón X-100 con un porcentaje promedio de descelularización del 60%, cumpliendo con criterios de descelularización mínimos actualmente establecidos en la literatura.
- Se caracterizaron fisicoquímicamente las muestras de mucosa de vejiga urinaria porcina descelularizada; a través de ensayos de SEM se identificaron las estructuras y microarquitectura característica del tipo de tejido; se confirmó la preservación de componentes de matriz por la presencia de picos y bandas característicos en el espectro de absorción del FT-IR y se caracterizaron térmicamente por la determinación de la temperatura de desnaturalización y degradación de la colágena en los ensayos de DSC y TGA.
- La biotinta sintetizada a partir de alginato de sodio al 3.5% y el polvo de matriz descelularizada de mucosa de UBM porcina al 0.5%, junto con una densidad celular de 1×10^6 células hGF-MSC por mL demostró ser compatible con la técnica de bioimpresión 3D basada en extrusión utilizando una velocidad de impresión de 10 mm/s y puntas cónicas de 640 μm de diámetro.
- Se sintetizó una biotinta a base de alginato de sodio y matriz descelularizada capaz de mantener la viabilidad celular por arriba del 90% de andamios celulares 3D bioimpresos, permitiendo aprovechar las propiedades biológicas que presentan estos andamios para la síntesis de biotintas con el potencial de ser utilizada en futuras aplicaciones para regeneración tisular.

X. Bibliografía

- Adhikari, J., Roy, A., Das, A., Ghosh, M., Thomas, S., Sinha, A., Kim, J., Saha, P., 2021. Effects of Processing Parameters of 3D Bioprinting on the Cellular Activity of Bioinks. *Macromol. Biosci.* 21, 2000179. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000179>
- Ahn, S.H., Lee, J., Park, S.A., Kim, W.D., 2016. Three-dimensional bio-printing equipment technologies for tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 663–676. <https://doi.org/10.1007/s13770-016-0148-1>
- Allbritton-King, J.D., Kimicata, M., Fisher, J.P., 2021. Incorporating a structural extracellular matrix gradient into a porcine urinary bladder matrix -BASED hydrogel dermal scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A* 109, 1893–1904. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37181>
- Alperen Abaci, Murat Guvendiren, 2020. Designing Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for 3D Bioprinting. *Adv. Healthc. Mater.* 9, 1–18. <https://doi.org/DOI: 10.1002/adhm.202000734>
- Ansari, M., 2019. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Prog. Biomater.* 8, 223–237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Badylak, S.F., Taylor, D., Uygun, K., 2011. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13, 27–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124743>
- Barraza-Garza, G., Guillermo Barraza-Garza, Laura A. de la Rosaa, Alejandro Martínez-Martínez, Hiram Castillo-Michelb, Marine Cotteb, Emilio Alvarez-Parrilla, 2013. LA MICROESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIRM) EN EL ESTUDIO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS. *Rev. Latinoam. Quím.* 41, 1–24.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Roveri, N., Koch, M.H.J., 1987. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation. *Int. J. Biol. Macromol.* 9, 363–367. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(87\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0141-8130(87)90010-9)
- Black, C.R.M., Gorainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R.S., Oreffo, R.O.C., 2015. Bone Tissue Engineering. *Curr. Mol. Biol. Rep.* 1, 132–140. <https://doi.org/10.1007/s40610-015-0022-2>
- Boroumand, S., Asadpour, S., Akbarzadeh, A., Faridi-Majidi, R., Ghanbari, H., 2018. Heart valve tissue engineering: an overview of heart valve decellularization processes. *Regen. Med.* 13, 41–54. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0061>
- Boularaoui, S., Al Hussein, G., Khan, K.A., Christoforou, N., Stefanini, C., 2020. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting* 20, e00093. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00093>
- Bozec, L., Odlyha, M., 2011. Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 101, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.033>
- Brouki Milan, P., Pazouki, A., Joghataei, M.T., Mozafari, M., Amini, N., Kargozar, S., Amoupour, M., Latifi, N., Samadikuchaksaraei, A., 2020a. Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery. *Methods* 171, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.005>
- Brouki Milan, P., Pazouki, A., Joghataei, M.T., Mozafari, M., Amini, N., Kargozar, S., Amoupour, M., Latifi, N., Samadikuchaksaraei, A., 2020b. Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery. *Methods* 171, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.005>
- Cartmell, S., Rupani, Balint, 2012. Osteoblasts and their applications in bone tissue engineering. *Cell Health Cytoskelet.* 49. <https://doi.org/10.2147/CHC.S21845>
- Chand, R., Shimwa Muhire, B., Vijayavenkataraman, S., 2022. Computational Fluid Dynamics Assessment of the Effect of Bioprinting Parameters in Extrusion Bioprinting. *Int. J. Bioprinting* 8. <https://doi.org/10.18063/ijb.v8i2.545>
- Chimene, D., Miller, L., Cross, L.M., Jaiswal, M.K., Singh, I., Gaharwar, A.K., 2020. Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 15976–15988. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19037>

- Chocholata, P., Kulda, V., Babuska, V., 2019. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* 12, 568. <https://doi.org/10.3390/ma12040568>
- Choudhury, D., Tun, H.W., Wang, T., Naing, M.W., 2018. Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? *Trends Biotechnol.* 36, 787–805. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.003>
- Chun, S.Y., Lim, G.J., Kwon, T.G., Kwak, E.K., Kim, B.W., Atala, A., Yoo, J.J., 2007. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials* 28, 4251–4256. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.020>
- Clarke, B., 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3, S131–S139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Collins, M.N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R.L., Oliveira, J.M., 2021. Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* 31, 2010609. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010609>
- Crapo, P.M., Gilbert, T.W., Badylak, S.F., 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32, 3233–3243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
- Croft, W.A., Nelson, C.-E., 1979. Collection and Evaluation of Normal Exfoliated Urinary Bladder Cells in Man Using Scanning Electron Microscopy. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 13, 43–48. <https://doi.org/10.3109/00365597909179998>
- De La Rosa-Ruiz, M.D.P., Álvarez-Pérez, M.A., Cortés-Morales, V.A., Monroy-García, A., Mayani, H., Fragoso-González, G., Caballero-Chacón, S., Diaz, D., Candanedo-González, F., Montesinos, J.J., 2019. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T cells. *Cells* 8, 1491. <https://doi.org/10.3390/cells8121491>
- Emmermacher, J., Spura, D., Cziommer, J., Kilian, D., Wollborn, T., Fritsching, U., Steingroewer, J., Walther, T., Gelinsky, M., Lode, A., 2020. Engineering considerations on extrusion-based bioprinting: interactions of material behavior, mechanical forces and cells in the printing needle. *Biofabrication* 12, 025022. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab7553>
- Fernández-Pérez, J., Ahearne, M., 2019. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Sci. Rep.* 9, 14933. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49575-2>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.D.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fu, R.-H., Wang, Y.-C., Liu, S.-P., Shih, T.-R., Lin, H.-L., Chen, Y.-M., Sung, J.-H., Lu, C.-H., Wei, J.-R., Wang, Z.-W., Huang, S.-J., Tsai, C.-H., Shyu, W.-C., Lin, S.-Z., 2014. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. *Cell Transplant.* 23, 621–630. <https://doi.org/10.3727/096368914X678382>
- Garreta, E., Oriá, R., Tarantino, C., Pla-Roca, M., Prado, P., Fernández-Avilés, F., Campistol, J.M., Samitier, J., Montserrat, N., 2017. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Mater. Today* 20, 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2016.12.005>
- Gilbert, T., Sellaro, T., Badylak, S., 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* S0142961206001682. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
- Gilbert, T.W., 2012. Strategies for tissue and organ decellularization. *J. Cell. Biochem.* 113, 2217–2222. <https://doi.org/10.1002/jcb.24130>
- Giraldo-Gomez, D.M., García-López, S.J., Tamay-de-Dios, L., Sánchez-Sánchez, R., Villalba-Caloca, J., Sotres-Vega, A., Del Prado-Audelo, M.L., Gómez-Lizárraga, K.K., Garcíadiago-Cázares, D., Piña-Barba, M.C., 2019. Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 105, 110142. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110142>
- Gopinathan, J., Noh, I., 2018. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater. Res.* 22, 11. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0122-1>
- Govindharaj, M., Hashimi, N.A., Soman, S.S., Kanwar, S., Vijayavenkataraman, S., 2022. 3D Bioprinting of human Mesenchymal Stem Cells in a novel tunic decellularized ECM bioink for Cartilage Tissue Engineering. *Materialia* 23, 101457. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2022.101457>

- Grinyo, J.M., 2013. Why Is Organ Transplantation Clinically Important? *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a014985–a014985. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014985>
- Groll, J., Burdick, J.A., Cho, D.-W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S.C., Jüngst, T., Malda, J., Mironov, V.A., Nakayama, K., Ovsianikov, A., Sun, W., Takeuchi, S., Yoo, J.J., Woodfield, T.B.F., 2018. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* 11, 013001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52>
- Gupta, S.K., Mishra, N.C., Dhasmana, A., 2017. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication, in: Turksen, K. (Ed.), *Decellularized Scaffolds and Organogenesis, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–10. https://doi.org/10.1007/7651_2017_34
- Guruswamy Damodaran, R., Vermette, P., 2018. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. *Biotechnol. Prog.* 34, 1494–1505. <https://doi.org/10.1002/btpr.2699>
- Hansen, N.U.B., Genovese, F., Leeming, D.J., Karsdal, M.A., 2015. The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Exp. Mol. Pathol.* 98, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.006>
- He, L., Mu, C., Shi, J., Zhang, Q., Shi, B., Lin, W., 2011. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int. J. Biol. Macromol.* 48, 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012>
- Hillebrandt, K.H., Everwien, H., Haep, N., Keshi, E., Pratschke, J., Sauer, I.M., 2019. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl. Int.* tri.13462. <https://doi.org/10.1111/tri.13462>
- Ijima, H., Nakamura, S., Bual, R., Shirakigawa, N., Tanoue, S., 2018. Physical Properties of the Extracellular Matrix of Decellularized Porcine Liver. *Gels* 4, 39. <https://doi.org/10.3390/gels4020039>
- Jessop, Z.M., Al-Sabah, A., Gao, N., Kyle, S., Thomas, B., Badiei, N., Hawkins, K., Whitaker, I.S., 2019. Printability of pulp derived crystal, fibril and blend nanocellulose-alginate bioinks for extrusion 3D bioprinting. *Biofabrication* 11, 045006. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab0631>
- Ji, S., Guvendiren, M., 2017. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00023>
- Jia, J., Richards, D.J., Pollard, S., Tan, Y., Rodriguez, J., Visconti, R.P., Trusk, T.C., Yost, M.J., Yao, H., Markwald, R.R., Mei, Y., 2014. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater.* 10, 4323–4331. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.034>
- Jose, M.V., Thomas, V., Dean, D.R., Nyairo, E., 2009. Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds. *Polymer* 50, 3778–3785. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.05.035>
- Jose, R.R., Rodriguez, M.J., Dixon, T.A., Omenetto, F., Kaplan, D.L., 2016. Evolution of Bioinks and Additive Manufacturing Technologies for 3D Bioprinting. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2, 1662–1678. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00088>
- Kabirian, F., Mozafari, M., 2020. Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. *Methods* 171, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.019>
- Kalfas, I.H., 2001. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10, 4. <https://doi.org/doi:10.3171/foc.2001.10.4.2>
- Kao, C.-Y., Nguyen, H.-Q.-D., Weng, Y.-C., 2020. Characterization of Porcine Urinary Bladder Matrix Hydrogels from Sodium Dodecyl Sulfate Decellularization Method. *Polymers* 12, 3007. <https://doi.org/10.3390/polym12123007>
- Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S.S., Vynios, D.H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C.E.H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N.A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., Onisto, M., 2021. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J.* 288, 6850–6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Khati, V., Ramachandraiah, H., Pati, F., Svahn, H.A., Gaudenzi, G., Russom, A., 2022. 3D Bioprinting of Multi-Material Decellularized Liver Matrix Hydrogel at Physiological Temperatures. *Biosensors* 12, 521. <https://doi.org/10.3390/bios12070521>

- Ku, C.S., Sathishkumar, M., Mun, S.P., 2007. Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere* 67, 1618–1627. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.037>
- Lee, S.J., Lee, J.H., Park, J., Kim, W.D., Park, S.A., 2020. Fabrication of 3D Printing Scaffold with Porcine Skin Decellularized Bio-Ink for Soft Tissue Engineering. *Materials* 13, 3522. <https://doi.org/10.3390/ma13163522>
- Lee, S.J., Seok, J.M., Lee, J.H., Lee, J., Kim, W.D., Park, S.A., 2021. Three-Dimensional Printable Hydrogel Using a Hyaluronic Acid/Sodium Alginate Bio-Ink. *Polymers* 13, 794. <https://doi.org/10.3390/polym13050794>
- Lepowsky, E., Muradoglu, M., Tasoglu, S., 2018. Towards preserving post-printing cell viability and improving the resolution: Past, present, and future of 3D bioprinting theory. *Bioprinting* 11, e00034. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2018.e00034>
- Li, M., Tian, X., Kozinski, J.A., Chen, X., Hwang, D.K., 2015. MODELING MECHANICAL CELL DAMAGE IN THE BIOPRINTING PROCESS EMPLOYING A CONICAL NEEDLE. *J. Mech. Med. Biol.* 15, 1550073. <https://doi.org/10.1142/S0219519415500736>
- Li, Y., Wu, Q., Li, L., Chen, F., Bao, J., Li, W., 2021. Decellularization of porcine whole lung to obtain a clinical-scale bioengineered scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A* 109, 1623–1632. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37158>
- Liu, Y., Bharadwaj, S., Lee, S.J., Atala, A., Zhang, Y., 2009. Optimization of a natural collagen scaffold to aid cell–matrix penetration for urologic tissue engineering. *Biomaterials* 30, 3865–3873. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.008>
- Liu, Y., Luo, D., Wang, T., 2016. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small* 12, 4611–4632. <https://doi.org/10.1002/smll.201600626>
- Madhan, B., Subramanian, V., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T., 2005. Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.08.005>
- Malda, J., Visser, J., Melchels, F.P., Jüngst, T., Hennink, W.E., Dhert, W.J.A., Groll, J., Hutmacher, D.W., 2013. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv. Mater.* 25, 5011–5028. <https://doi.org/10.1002/adma.201302042>
- Malekpour, A., Chen, X., 2022. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *J. Funct. Biomater.* 13, 40. <https://doi.org/10.3390/jfb13020040>
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., Kim, D.-H., 2016. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol. Adv.* 34, 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Mano, V., Ribeiro e Silva, M.E.S., 2007. Bioartificial polymeric materials based on collagen and poly(N-isopropylacrylamide). *Mater. Res.* 10, 165–170. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392007000200012>
- Mao, A.S., Mooney, D.J., 2015. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14452–14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- Martini, F. H., Timmons, M. J., y Tallitsch, R. B. (2006). *Human Anatomy.*, Pearson., 2009. *Human Anatomy*, 6ta ed. PEARSON EDUCACIÓN. S.A., Madrid España.
- Matsumoto, Y., Ishii, D., Iwata, T., 2017. Synthesis and characterization of alginate acid ester derivatives. *Carbohydr. Polym.* 171, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.001>
- Mattei, G., Magliaro, C., Pirone, A., Ahluwalia, A., 2017. Decellularized Human Liver Is Too Heterogeneous for Designing a Generic Extracellular Matrix Mimic Hepatic Scaffold: HUMAN VARIABILITY LIMITS SCAFFOLD DESIGN. *Artif. Organs* 41, E347–E355. <https://doi.org/10.1111/aor.12925>
- Mendibil, U., Ruiz-Hernandez, R., Retegi-Carrion, S., Garcia-Urquia, N., Olalde-Graells, B., Abarategi, A., 2020. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5447. <https://doi.org/10.3390/ijms21155447>
- Mironov, V., 2021. Vladimir Mironov (1953-2020). *Религиоведческие Исследования* 77–93. <https://doi.org/10.23761/rrs2021-23.77-93>

- Mironov, V., Reis, N., Derby, B., 2006. Review: Bioprinting: A Beginning. *Tissue Eng.* 12, 631–634. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.631>
- Moffat, D., Ye, K., Jin, S., 2022. Decellularization for the retention of tissue niches. *J. Tissue Eng.* 13, 204173142211011. <https://doi.org/10.1177/20417314221101151>
- Moroni, L., Boland, T., Burdick, J.A., De Maria, C., Derby, B., Forgacs, G., Groll, J., Li, Q., Malda, J., Mironov, V.A., Mota, C., Nakamura, M., Shu, W., Takeuchi, S., Woodfield, T.B.F., Xu, T., Yoo, J.J., Vozzi, G., 2018. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol.* 36, 384–402. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.015>
- Mota, C., Camarero-Espinosa, S., Baker, M.B., Wieringa, P., Moroni, L., 2020. Bioprinting: From Tissue and Organ Development to *in Vitro* Models. *Chem. Rev.* 120, 10547–10607. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00789>
- Müller, M., Öztürk, E., Arlov, Ø., Gatenholm, P., Zenobi-Wong, M., 2017. Alginate Sulfate–Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications. *Ann. Biomed. Eng.* 45, 210–223. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1704-5>
- Murphy, S.V., Atala, A., 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32, 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Nelson, C.-E., Croft, W.A., Nilsson, T., 1979. Characterization of Different Regions of the Normal Human Urinary Bladder by Means of Scanning Electron Microscopy. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 13, 23–29. <https://doi.org/10.3109/00365597909179996>
- Nulty, J., Freeman, F.E., Browe, D.C., Burdis, R., Ahern, D.P., Pitacco, P., Lee, Y.B., Alsberg, E., Kelly, D.J., 2021. 3D bioprinting of prevascularised implants for the repair of critically-sized bone defects. *Acta Biomater.* 126, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.003>
- Ozolat, I.T., 2015. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends Biotechnol.* 33, 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.005>
- Park, J., Lee, S.J., Chung, S., Lee, J.H., Kim, W.D., Lee, J.Y., Park, S.A., 2017. Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: Characterization and evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* 71, 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.069>
- Pati, F., Gantelius, J., Svahn, H.A., 2016. 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 4650–4665. <https://doi.org/10.1002/anie.201505062>
- Petit-Zeman, S., 2001. Regenerative medicine. *Nat Biotechnol* 19, 201–206. <https://doi.org/doi:10.1038/85619>. PMID: 11231542.
- Pietrucha, K., 2005. Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. *Int. J. Biol. Macromol.* 36, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.07.004>
- Ramiah, P., du Toit, L.C., Choonara, Y.E., Kondiah, P.P.D., Pillay, V., 2020. Hydrogel-Based Bioinks for 3D Bioprinting in Tissue Regeneration. *Front. Mater.* 7, 76. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00076>
- Reznikov, N., Shahar, R., Weiner, S., 2014. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater.* 10, 3815–3826. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.024>
- Rho, J.-Y., Kuhn-Spearing, L., Zioupos, P., 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.* 20, 92–102. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1)
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S.Z., Rahim, A., Rizvi, S.A.A., Rehman, I.U., 2018. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Appl. Spectrosc. Rev.* 53, 703–746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>
- Rosario, D.J., Reilly, G.C., Ali Salah, E., Glover, M., Bullock, A.J., MacNeil, S., 2008. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regen. Med.* 3, 145–156. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.2.145>
- Seol, Y.-J., Kang, H.-W., Lee, S.J., Atala, A., Yoo, J.J., 2014. Bioprinting technology and its applications. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 46, 342–348. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu148>
- Shafran, D., Kodish, E., Tzakis, A., 2014. Organ Shortage: The Greatest Challenge Facing Transplant Medicine. *World J. Surg.* 38, 1650–1657. <https://doi.org/10.1007/s00268-014-2639-3>

- Silva-Benítez, E., Soto-Sáinz, E., Pozos-Guillen, A., Romero-Quintana, J.G., Aguilar-Medina, M., Ayala-Ham, A., Peña-Martínez, E., Ramos-Payán, R., Flores, H., 2015. Quantification of DNA in urinary porcine bladder matrix using the ACTB gene. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 51, 1040–1046. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9927-6>
- Simões, I.N., Vale, P., Soker, S., Atala, A., Keller, D., Noiva, R., Carvalho, S., Peleteiro, C., Cabral, J.M.S., Eberli, D., Da Silva, C.L., Baptista, P.M., 2017. Acellular Urethra Bioscaffold: Decellularization of Whole Urethras for Tissue Engineering Applications. *Sci. Rep.* 7, 41934. <https://doi.org/10.1038/srep41934>
- Skardal, A., Devarasetty, M., Kang, H.-W., Mead, I., Bishop, C., Shupe, T., Lee, S.J., Jackson, J., Yoo, J., Soker, S., Atala, A., 2015. A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomater.* 25, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.030>
- Somasekharan, L.T., Raju, R., Kumar, S., Geevarghese, R., Nair, R.P., Kasoju, N., Bhatt, A., 2021. Biofabrication of skin tissue constructs using alginate, gelatin and diethylaminoethyl cellulose bioink. *Int. J. Biol. Macromol.* 189, 398–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.114>
- Tong, Z., Chen, Y., Liu, Y., Tong, L., Chu, J., Xiao, K., Zhou, Z., Dong, W., Chu, X., 2017. Preparation, Characterization and Properties of Alginate/Poly(γ -glutamic acid) Composite Microparticles. *Mar. Drugs* 15, 91. <https://doi.org/10.3390/md15040091>
- Uriarte, J.J., Uhl, F.E., Rolandsson Enes, S.E., Pouliot, R.A., Weiss, D.J., 2018. Lung bioengineering: advances and challenges in lung decellularization and recellularization. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 23, 673–678. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000584>
- Vermeulen, N., Haddow, G., Seymour, T., Faulkner-Jones, A., Shu, W., 2017. 3D bioprint me: a socioethical view of bioprinting human organs and tissues. *J. Med. Ethics* 43, 618–624. <https://doi.org/10.1136/medethics-2015-103347>
- Vijayavenkataraman, S., Yan, W.-C., Lu, W.F., Wang, C.-H., Fuh, J.Y.H., 2018. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 132, 296–332. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.004>
- Walawalkar, S., Almelkar, S., 2019. Fabrication of aortic bioprosthesis by decellularization, fibrin glue coating and re-endothelization: a cell scaffold approach. *Prog. Biomater.* 8, 197–210. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00122-2>
- Wang, X., Bank, R.A., Tekoppele, J.M., Agrawal, C.M., 2001. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J. Orthop. Res.* 19, 1021–1026. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(01\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00047-X)
- Wang, Y., Nicolas, C.T., Chen, H.S., Ross, J.J., De Lorenzo, S.B., Nyberg, S.L., 2017. Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. *Cells Tissues Organs* 204, 125–136. <https://doi.org/10.1159/000479597>
- Weymann, A., Loganathan, S., Takahashi, H., Schies, C., Claus, B., Hirschberg, K., Soós, P., Korkmaz, S., Schmack, B., Karck, M., Szabó, G., 2011. Development and Evaluation of a Perfusion Decellularization Porcine Heart Model - Generation of 3-Dimensional Myocardial Neoscaffolds -: – Generation of 3-Dimensional Myocardial Neoscaffolds -. *Circ. J.* 75, 852–860. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0717>
- Willemse, J., Verstegen, M.M.A., Vermeulen, A., Schurink, I.J., Roest, H.P., van der Laan, L.J.W., de Jonge, J., 2020. Fast, robust and effective decellularization of whole human livers using mild detergents and pressure controlled perfusion. *Mater. Sci. Eng. C* 108, 110200. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110200>
- Wright, C.J., Molino, B.Z., Chung, J.H.Y., Pannell, J.T., Kuester, M., Molino, P.J., Hanks, T.W., 2020. Synthesis and 3D Printing of Conducting Alginate–Polypyrrole Ionomers. *Gels* 6, 13. <https://doi.org/10.3390/gels6020013>
- Wu, J., Han, Y., Fu, Q., Hong, Y., Li, L., Cao, J., Li, H., Liu, Y., Chen, Y., Zhu, J., Shao, J., Fu, P., Wu, H., Cui, D., Wang, B., Zhou, Y., Qian, Q., 2022. Application of tissue-derived bioink for articular cartilage lesion repair. *Chem. Eng. J.* 450, 138292. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138292>

Yang, B., Zhang, Y., Zhou, L., Sun, Z., Zheng, J., Chen, Y., Dai, Y., 2010. Development of a Porcine Bladder Acellular Matrix with Well-Preserved Extracellular Bioactive Factors for Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* 16, 1201–1211. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0311>

Zhang, T., Zhao, W., Xiahou, Z., Wang, X., Zhang, K., Yin, J., 2021. Bioink design for extrusion-based bioprinting. *Appl. Mater. Today* 25, 101227. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101227>