



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA

NANOCOMPÓSITOS HIDROGELES BIOPOLIMÉRICOS CON ÓXIDO DE GRAFENO PARA IMPRESIÓN 3D DE ANDAMIOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDO CARTILAGINOSO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN EN CIENCIA DE LOS MATERIALES

FELIPE ANDRÉS OLATE MOYA

PROFESOR GUÍA:
HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
RAÚL QUIJADA ABARCA
MÓNICA SOLER JAUMA
CRISTIAN TAPIA VILLANUEVA
LORETO VALENZUELA ROEDINGER

SANTIAGO DE CHILE

2020

RESUMEN DE TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE: Doctor en Ciencias de la Ingeniería
con Mención en Ciencia de los Materiales
POR: Felipe Andrés Olate Moya
FECHA: 26/05/2020
PROFESOR GUÍA: Humberto Palza Cordero

NANOCOMPÓSITOS HIDROGELES BIOPOLIMÉRICOS CON ÓXIDO DE GRAFENO PARA IMPRESIÓN 3D DE ANDAMIOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDO CARTILAGINOSO

Enfermedades asociadas a la degeneración del tejido cartilaginoso representan un elevado costo en la calidad de vida de quienes la padecen, produciendo dolor y discapacidad motora, además de un considerable gasto público. La utilización de células madre mesenquimales (MSCs) bajo el concepto de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (ITMR) es una atractiva opción de tratamiento de lesiones del cartílago, ya que permitiría solucionar los problemas asociados a la limitada capacidad auto-regenerativa de este tejido. Andamios basados en hidrogeles bioconjugados con polímeros naturales son atractivos para ITMR debido a que estos imitan las características del tejido humano blando y semirrígido. Los hidrogeles bioconjugados exhiben mayor biocompatibilidad y pueden estimular distintos procesos biológicos como proliferación y diferenciación celular, así como la secreción de la matriz extracelular (ECM) que formará el nuevo tejido. Unas de las técnicas de fabricación más innovadoras son la impresión 3D de andamios y la bioimpresión 3D de constructos cargados con células, para aplicaciones biomédicas en un concepto de medicina personalizada. A pesar de las propiedades únicas de este tipo de biomaterial para aplicaciones en ITMR, los hidrogeles presentan problemas de procesabilidad que limitan su uso en bio-/impresión 3D, motivando la incorporación de nanopartículas que mejoran estas limitantes y que además puedan incrementar la bioactividad. El objetivo de este trabajo es desarrollar nanocompósitos hidrogeles biomiméticos de la ECM de cartílago para la fabricación de andamios y constructos mediante impresión/bioimpresión 3D, con bioactividad y procesabilidad mejorada. La base de este nuevo biomaterial es alginato metacrilado bioconjugado con gelatina y sulfato de condroitina metacrilados, mediante fotoentrecruzamiento de los biopolímeros, el cual es reforzado con óxido de grafeno (GO) para mejorar la calidad de impresión y bioactividad del nanocompósito. Los resultados expuestos muestran que la incorporación de GO permite modular las propiedades tixotrópicas de las tintas de hidrogel, mejorando considerablemente la fidelidad de forma y resolución de los andamios 3D impresos. Además, las tintas con la nanopartícula producen hebras anisotrópicas después de ser impresas por efecto direccionador de las propiedades líquido-cristalinas del GO. Los ensayos *in vitro* con MSCs humanas develan que los andamios bioconjugados presentan mayor proliferación celular que en alginato puro, donde los nanocompósitos exhiben los valores más altos a largo plazo y la viabilidad de las células adheridas a los andamios es cerca del 100 %. Notablemente, las hebras anisotrópicas de los andamios nanocompósitos fueron capaces de guiar el crecimiento celular en dirección del eje mayor de la hebra impresa. Los nanocompósitos hidrogeles en combinación con MSCs permitieron además obtener constructos mediante bioimpresión 3D con alta fidelidad de forma y sobresaliente viabilidad celular a corto y largo plazo. La base de alginato bioconjugado es capaz de inducir diferenciación condrogénica en MSCs sin utilizar factores exógenos pro-condrogénesis, lo cual es potenciado al adicionar GO. La elevada citocompatibilidad y efecto condroinductivo en MSCs humanas de los andamios y constructos, sumado a la calidad de impresión/bioimpresión 3D y obtención de estructuras anisotrópicas, convierten estos nanocompósitos hidrogeles candidatos prometedores para aplicaciones en ITMR del cartílago a través de biofabricación.

*A mis sobrinos
Renato, Agustín y David.*

Agradecimientos

Al finalizar este período de poco más de cinco años de aprender nuevas habilidades y técnicas además de conocer nuevas personas y lugares, nace de mí ante todo agradecer a mi familia por su constante apoyo y compañía en la cercanía y a la distancia. Agradezco también a cada persona que me ofreció su amistad he hizo de esta etapa de estudio e investigación un período ameno y distendido. Agradezco al profesor Humberto Palza por la confianza depositada en mí y a cada integrante del Laboratorio de Ingeniería de Polímeros donde pasé gran parte del tiempo trabajando en este proyecto o sacando la vuelta con algún compañero o compañera de laboratorio. Quisiera también extender mi agradecimiento a cada docente, colega y técnico que compartió parte de su conocimiento en distintas disciplinas para lograr llevar a buen puerto esta tesis doctoral. En particular, agradezco las recomendaciones y correcciones de mi profesor guía, los profesores integrantes de la comisión evaluadora, la Dra. Elisabeth Engel (IBEC, España), el Dr. Manfred Wilhelm (KIT, Alemania), y el Dr. Esteban González (Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Los resultados de esta investigación no habrían sido obtenidos sin la colaboración con distintos laboratorios nacionales y del extranjero, agradezco la buena disposición y amabilidad con que he sido recibido en el grupo *Biomaterials for regenerative therapies* del IBEC, el grupo *Polymeric Materials* del KIT, el Laboratorio de Terapia Celular (Facultad de Medicina, Universidad de Chile), el Laboratorio de Inmunología Traslacional (Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo) y el Laboratorio Raman (FCFM, Universidad de Chile).

El desarrollo de esta investigación requirió del financiamiento necesario para la formación académica doctoral, reactivos y materiales de laboratorio, servicios de análisis, pasantías y congresos. Este financiamiento se obtuvo de distintas instituciones y proyectos a los cuales agradezco enormemente. En particular, agradezco a CONICYT Beca de Doctorado Nacional N° 21150039, proyecto FONDECYT 1150130, proyectos FONDEQUIP EQM150101, EQM170103 y EQM140012, Iniciativa Científica Milenio proyecto “Núcleo Milenio Materiales Mecánicos Suaves e Inteligentes” y al programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, mención Ciencia de los Materiales de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1. Biomateriales en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa.....	1
1.2. Andamios basados en hidrogeles para tejido cartilaginoso.....	2
1.3. Nanocompuestos basados en hidrogeles para ITMR	8
1.4. Impresión 3D como herramienta en ITMR	9
1.5. Propuesta de investigación.....	13
2. Hipótesis y Objetivos	14
2.1. Hipótesis.....	14
2.2. Objetivo general.....	14
2.2.1. Objetivos específicos.....	14
3. Metodología	15
3.1. Materiales y reactivos utilizados en la síntesis de nanocompuestos hidrogeles	15
3.2. Modificación química de biopolímeros y síntesis de óxido de grafeno.....	15
3.2.1. Obtención de ALG-MA y SC-MA.....	15
3.2.2. Obtención de GEL-MA.....	16
3.2.3. Síntesis de GO.....	16
3.3. Caracterización espectroscópica	16
3.4. Caracterización microestructural.....	16
3.5. Caracterización mediante microscopía óptica.....	17
3.6. Impresión 3D de andamios.....	17
3.7. Bioimpresión 3D de constructos	17
3.8. Caracterización reológica.....	18
3.9. Propiedades mecánicas.....	18
3.10. Contenido de agua en nanocompuestos hidrogeles	19
3.11. Liberación de GO desde nanocompuestos.....	19
3.12. Evaluación biológica: biocompatibilidad y bioactividad de los andamios	19
3.12.1. Aislación, caracterización de hMSCs y ensayo MTT	19
3.12.2. Ensayo alamarBlue™.....	20
3.12.3. Tinción fluorescente y ensayo <i>Live/Dead</i>	21
3.12.4. Tinción de inmunofluorescencia	21
3.12.5. Análisis de expresión génica.....	22
3.13. Análisis estadístico.....	24

4.	Resultados y discusión	25
4.1.	Caracterización de biopolímeros modificados	25
4.2.	Caracterización de óxido de grafeno.....	31
4.3.	Fabricación de andamios mediante impresión 3D	34
4.4.	Propiedades reológicas y mecánicas de nanocompuestos hidrogeles.....	43
4.5.	Biofabricación de constructos mediante Bioimpresión 3D.....	46
4.6.	Desempeño biológico de los andamios/constructos con hADMSCs	47
4.6.1.	Obtención y caracterización de hADMSCs desde tejido adiposo.....	47
4.6.2.	Viabilidad de hADMSCs en los andamios.....	49
4.6.3.	Viabilidad de hADMSCs en constructos	52
4.6.4.	Morfología y distribución celular en andamios.....	56
4.6.5.	Morfología y distribución celular en constructos.....	58
4.6.6.	Condrogénesis	59
5.	Conclusiones	66
6.	Bibliografía.....	67
	Apéndice.....	78
	Anexos	81

1. Introducción

1.1. Biomateriales en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa

El desarrollo de nuevos materiales biocompatibles y bioactivos ha sido un pilar en el avance de la medicina desde la antigüedad y su progreso hoy en día ofrece la solución a diversos problemas de salud mediante el uso de biomateriales con diseños biológicamente inspirados.¹ Uno de los campos emergentes de mayor auge en las últimas décadas es la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa (ITMR), en el cual mediante principios de ingeniería de estos materiales y ciencias de la vida se desarrollan sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de un tejido u órgano entero.² La ITMR se ha potenciado con el uso terapéutico de células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), el concepto general de la ITMR considera varias etapas (Figura 1), donde la primera consiste en la extracción de tejido (biopsia) de un paciente y el aislamiento de MSCs desde este tejido. Este fenotipo primitivo de células tiene la capacidad de diferenciarse a múltiples fenotipos celulares como osteocitos (hueso), adipocitos (tejido adiposo), condrocitos (cartílago), entre otras líneas celulares.³ Las MSCs aisladas son luego cultivadas en un andamio tridimensional con poros interconectados como nicho, constituido de un biomaterial determinado. Mediante estímulos bioquímicos o físicos se induce la diferenciación de las MSCs sobre el andamio, para dar lugar a la formación del tejido que se desea reparar. Finalmente, este conjunto andamio-tejido se injerta en la zona con tejido dañado o ausente en el paciente. Pasado un tiempo determinado el andamio termina biodegradándose por la acción de enzimas y células especializadas, siendo reemplazado completamente por tejido nuevo. Las primeras investigaciones en ITMR se centralizaron en regeneración ósea, sin embargo, hoy en día el espectro es mucho más amplio sumándose investigaciones en regeneración de cartílagos, tejido graso, músculos y tejido nervioso.⁴ En particular el tejido cartilaginoso, compuesto por células llamadas condrocitos inmersas en una matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) con pobre vascularización, carece de capacidad auto-regenerativa ante una lesión o degeneración.⁵ Esto ha motivado a varios investigadores a orientar sus estudios a la ITMR para tratar este tipo de lesiones.⁶ En Estados Unidos de América las enfermedades degenerativas del cartílago como la osteoartritis (OA) poseen una alta morbilidad en adultos mayores. En 2015 el número de personas tratadas por esta enfermedad ya se había duplicado respecto a 1996 y representó un gasto público de 81.2 billones de dólares (5 % del gasto total en salud), equivalente al gasto realizado en cáncer.⁷ La OA afecta a 1 de cada 3 personas sobre 65 años y la prevalencia de esta enfermedad ha ido en aumento de la mano con los factores de riesgos como obesidad, falta de actividad física y otros problemas articulares.⁸ En términos de investigación traslacional, el uso de andamios basados en ECM descelularizada o polímeros sintéticos se encuentran en ensayos clínicos entre fase II y III.⁹ De esta manera, se espera que en las próximas décadas se comience a masificar el uso de biomateriales como andamios para ITMR en el tratamiento de diversas afecciones, incluyendo enfermedades degenerativas del cartílago, en la medida que se desarrollen nuevos materiales bioactivos y escalables industrialmente.¹⁰ Considerando el creciente envejecimiento de la población en Chile, resulta imperativo enfrentar este problema de salud pública promoviendo la investigación en la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas del cartílago.

Desde el punto de vista del material utilizado en la fabricación del andamio, existen distintas barreras que se deben superar para que sea apto para aplicaciones en ITMR¹¹: la biocompatibilidad del material con el entorno biológico con el que estará relacionado es fundamental, en ese sentido, la citotoxicidad es uno de los criterios a considerar en la elección

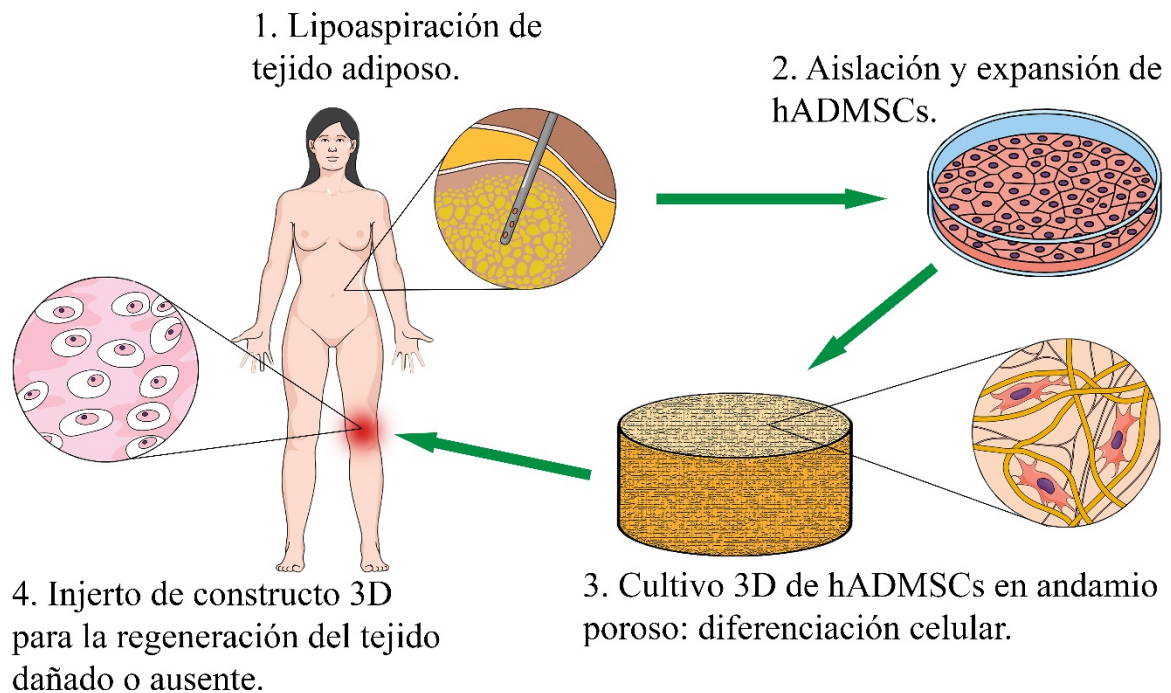


Figura 1. Representación esquemática del concepto de ingeniería de tejidos. Obtención de tejido graso (1), aislamiento de células madre mesenquimales (2), cultivo tridimensional en un andamio (3) y la implantación del injerto en el tejido degenerado o ausente (4).

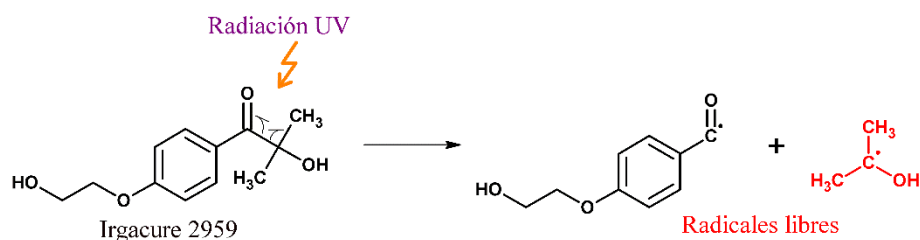
del material. Un segundo criterio son la procesabilidad y las propiedades mecánicas del material, donde se busca características similares al tejido que se desea regenerar. Otro aspecto importante es la degradabilidad del material, que depende principalmente de la composición química del andamio (generalmente polímeros). Lo anterior es relevante dado que la función de un andamio es temporal (semanas a meses), para luego ser reemplazado por el tejido a regenerar.

1.2. Andamios basados en hidrogeles para tejido cartilaginoso

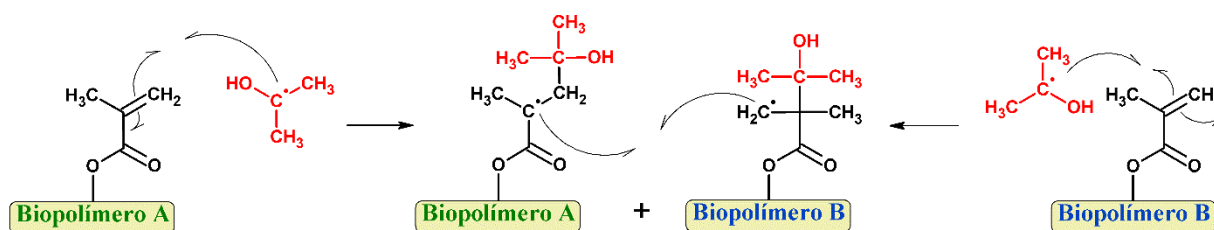
Dentro de la gama de biomateriales, los hidrogeles son unos de los materiales más utilizados en aplicaciones biomédicas y consisten en una red tridimensional (usualmente polimérica) capaz de absorber cantidades significativas de agua.^{12,13} Distintos tipos de hidrogeles se pueden encontrar en la cotidianidad, ejemplo de aquellos son la gelatina comestible, aloe vera, productos cosméticos y farmacéuticos, materiales superabsorbentes de pañales, entre otros. El proceso de gelificación puede seguir una ruta química donde se forman enlaces covalentes que entrecruzan la red polimérica, una ruta física donde se forman estructuras supramoleculares 3D mediante fuerzas intermoleculares (enlaces de hidrógeno y uniones electrostáticas), o bien una ruta que combina las dos vías anteriormente descritas.¹⁴ Los biomateriales basados en hidrogeles son de especial interés debido a su versatilidad sintética, diversidad de fuentes naturales, biocompatibilidad, bioactividad y sobre todo porque forma parte o bien imitan la mayoría de los tejidos del cuerpo humano.^{15,16} Estas características han hecho posible la utilización de distintos tipos de hidrogeles en aplicaciones biomédicas comerciales tales como: transportadores en sistemas de liberación controlada de fármacos, apósitos, lentes de contacto

y cultivo celular tridimensional.¹⁷ En los recientes años se ha reportado investigaciones que muestran el uso de hidrogeles para aplicaciones en ITMR en tejidos de distinta naturaleza como el tejido cardiaco, cartilaginoso y óseo.^{18,19} Hidrogeles basados en polímeros naturales, en adelante biopolímeros, como polisacáridos o polipéptidos poseen grupos funcionales modificables químicamente que permiten distintas opciones de entrecruzamiento, bioconjugación e injerto de motivos moleculares; lo que permite controlar las propiedades mecánicas, tasa de degradación, propiedades químicas y bioactividad del hidrogel.²⁰ En el desarrollo de hidrogeles para ITMR se destaca la bioconjugación, que consiste en la unión covalente con una macromolécula, molécula (biomolécula) o fragmento molecular, que posee grupos funcionales que interactúan directamente con el entorno biológico. El propósito de la bioconjugación es contrarrestar la toxicidad o incrementar la bioactividad como adhesión, proliferación y diferenciación celular.²¹ Existen distintos métodos de entrecruzamiento covalente de hidrogeles, que involucran reacciones como química *click*, adición de Michael, reacción Diels-Alders, formación de bases de Schiff, fotoquímica, entre otras reacciones químicas.¹⁴ En particular, el método de fotoentrecruzamiento de cadenas poliméricas (Figura 2) posee como principales ventajas la velocidad de reacción, control/modulación espacio-temporal (control del tiempo de exposición, intensidad de la luz y zona de reacción mediante direccionamiento de la luz), versatilidad sintética y bajo costo, por sobre las otras rutas de

i) Iniciación:



ii) Propagación:



iii) Terminación:

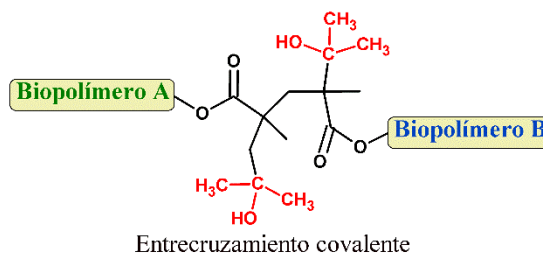


Figura 2. Mecanismo de reacción de fotoentrecruzamiento donde se representa la reacción de formación de radicales libres por fotólisis (iniciación), reacción de radicales libres con dos tipos biopolímeros metacrilados (propagación) y reacción de entrecruzamiento entre biopolímeros (terminación).

entrecruzamiento covalente.²² La reacción de fotoentrecruzamiento puede emplearse como método de formación del hidrogel y/o como vía de bioconjugación con polímeros bioactivos.²³ En las reacciones de fotoentrecruzamiento usualmente se utilizan polímeros funcionalizados con grupos fotopolimerizables (ej.: acrililoilo y metacrililoilo) que reaccionan en presencia de luz y un fotoiniciador (PI) para desencadenar una reacción en cadena vía radicales libres, donde el cloruro de acrililoilo, metacrilato de glicidilo, anhídrido metacrílico y metacrilato de 2-aminoetilo son los agentes de funcionalización con grupos fotopolimerizables más empleados en la modificación química de biopolímeros.¹⁴ Para aplicaciones biomédicas *in situ* de hidrogeles fotoentrecruzables se requiere que el fotoiniciador utilizado sea soluble en agua, citocompatible y activo en una región espectral donde la radiación no produzca daño o muerte celular. Por este motivo, los fotoiniciadores más utilizados son el 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959, activo entre 320-390 nm), fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP, activo entre 320-450 nm) y eosina-Y (más trietanolamina como co-iniciador, activo entre 400-800 nm).²²

De la variedad de biopolímeros que forman hidrogeles destacan el alginato de sodio (ALG, Figura 3a) de origen vegetal o bacteriano y la gelatina (GEL, Figura 3c) de origen animal. El ALG es uno de los biopolímeros más utilizados en aplicaciones biomédicas, ya que es biocompatible, procesable y de rápida gelificación ionotrópica (entrecruzamiento físico en presencia de cationes como Ca^{2+} y Ba^{2+}).²⁴ La transición desde un fluido viscoso (solución de ALG) a un hidrogel rígido ocurre mediante interacciones electrostáticas fuertes entre cationes metálicos divalentes y los segmentos de α -L-guluronato presentes en las cadenas de ALG.²⁵ Este comportamiento ha sido aprovechado para algunas aplicaciones en el ámbito biomédico como sistemas de liberación controlada de fármacos, apósitos, encapsulación de células y microorganismos, fabricación de andamios, entre otras aplicaciones. Debido a que este biopolímero se encuentra principalmente en la estructura de algunas algas marinas, la interacción entre este biomaterial y células animales es bastante pobre, dado que usualmente la adhesión célula animal-ECM esta mediada por interacciones no covalentes entre proteínas presentes en la membrana celular y en la ECM.²⁶ Por esta razón, para aplicaciones en ITMR es necesario bioconjuguar el ALG (unir covalentemente a una molécula, motivo molecular o macromolécula, capaz de interactuar biológicamente con células o microorganismos) para impartir bioactividad y así mejorar, por ejemplo, la adhesión, proliferación y diferenciación celular.²⁷ El biopolímero más utilizado debido a su bioactividad es el colágeno, que en realidad es una estructura supramolecular formada por una triple hélice de cadenas polipeptídicas.²⁸ El colágeno se encuentra en la ECM de la mayoría de los tejidos animales, de ahí su buena bioactividad como andamio. Producto de la hidrólisis ácida o básica del colágeno (principalmente colágeno tipo I) se obtiene respectivamente GEL tipo A y GEL tipo B, que mantienen un excelente desempeño biológico (incrementa la adhesión y proliferación celular), se solubiliza fácilmente en agua (el colágeno solo forma suspensiones acuosas) y posee una gelificación termotrópica entorno a los 18-20 °C.²⁹ Los segmentos de aminoácidos RGD (arginina-glicina-aspartato) presentes en las cadenas poliméricas de GEL son capaces de formar uniones con proteínas de la membrana celular llamadas integrinas (encargadas de la adhesión/interacción célula-ECM y célula-célula), lo cual favorece la proliferación celular.³⁰ Sin embargo, la gelificación termorreversible y deficientes propiedades mecánicas de hidrogeles de GEL limitan sus aplicaciones como andamios para ITMR. No obstante, la utilización de este biopolímero como agente de bioconjugación aparece como un método sencillo y de bajo costo para impartir bioactividad en andamios. Por ejemplo, andamios fabricados con una mezcla de ALG y GEL han exhibido una proliferación de hADMSCs hasta 2.5 veces mayor que lo observado en andamios de ALG puro.³¹ Otra estrategia es unir

químicamente la GEL a la superficie de polímeros rígidos para incrementar la adhesión celular hasta en un 300 %³² o entrecruzar las cadenas de GEL con otros polímeros para dar lugar a hidrogeles bioactivos.³³

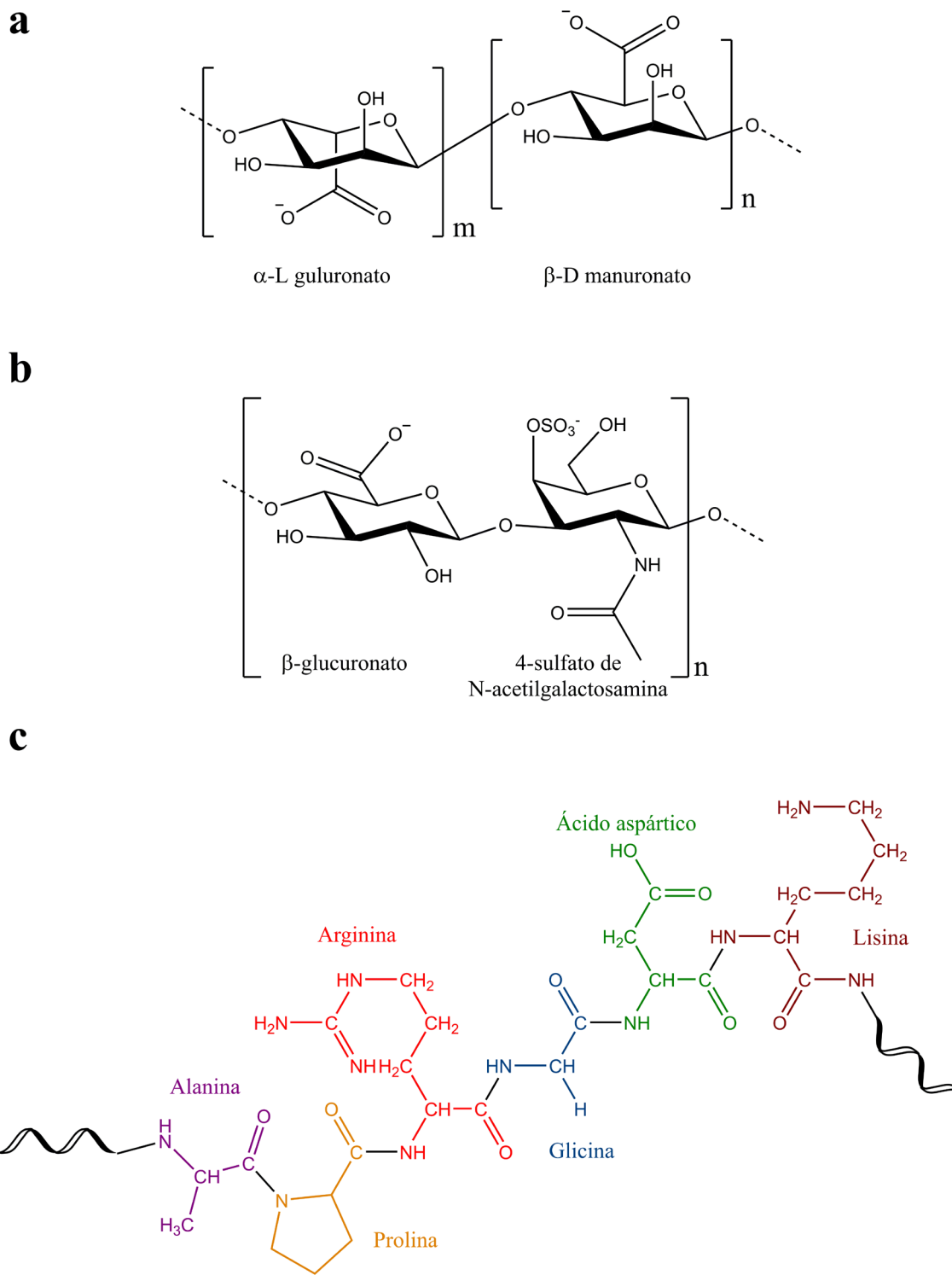


Figura 3. Biopolímeros utilizados en este trabajo: Estructuras químicas de alginato (**a**) y sulfato de condroitina tipo A (**b**). Ilustración representativa de la estructura molecular de la gelatina (**c**).

De las diferentes modificaciones posibles para bioconjugar estos biopolímeros, se destaca la formación de amidas mediada por una carbodiimida (Figura 4). Esto se puede realizar gracias a la presencia de grupos funcionales de ácidos carboxílicos (en ALG y SC) y amino (en GEL) en las cadenas poliméricas permite modificar químicamente los biopolímeros mediante la reacción de amidación. Esta metodología de modificación química de biopolímeros tiene la ventaja de ser eficiente en medio acuoso, por lo que es ampliamente utilizada en bioconjugación de polímeros naturales para aplicaciones en ITMR de cartílago.³⁴ En el caso de ALG, esta estrategia se ha utilizado para bioconjugar el polímero con biomoléculas como el tripéptido RGD (RGD-ALG), incrementando 11 veces la proliferación de MSCs en comparación con ALG puro.³⁵ Además, como se mencionó anteriormente, la modificación química de biopolímeros con grupos metacrililo (MA) ha sido una estrategia utilizada para producir hidrogeles con propiedades superiores (mecánicas, químicas y biológicas), mediante el fotoentrecruzamiento de distintos biopolímeros obteniendo un material con propiedades de cada componente.³⁶ Esta estrategia es ampliamente utilizada en el caso de la GEL, donde mediante una sencilla reacción con anhídrido metacrílico se obtiene metacrililo de gelatina (GEL-MA) que al fotoentrecruzarse se obtiene un hidrogel que no se solubiliza sobre la temperatura de gelificación de GEL, lo que permite su utilización a la temperatura fisiológica (37 °C).²³

Una de las estrategias en el diseño de nuevos andamios es imitar tanto química como físicamente el microambiente del tejido que se desea regenerar. En la Figura 5 se muestra una representación gráfica de la estructura del cartílago y la composición de este, donde los condrocitos usualmente se distribuyen en duplas o grupos pequeños de células en la ECM avascular del tejido. La ECM del cartílago (basado en cartílago articular) consiste en un rango de 65-80 % de agua, lo cual está en el rango de contenido de agua en los hidrogeles. Considerando el peso seco, los principales componentes de la ECM del cartílago son colágeno (hasta ~ 60 %, principalmente colágeno tipo II) y proteoglicanos (30-40 %, principalmente agregano o agregán) que consisten en proteínas unidas de forma covalente a glicosaminoglicanos (GAGs).³⁷ Estos GAGs son polisacáridos con alta densidad de cargas negativa que consisten en unidades repetitivas de un disacárido formado por una amino-azúcar unida a una azúcar de ácido urónico o galactosa.³⁸ Con la idea de imitar la ECM del tejido cartilaginoso, varios trabajos reportan el uso de GAGs como parte de una red de hidrogel en andamios.^{39,40} Entre los diferentes GAGs presentes en el cartílago que usualmente se emplean para estos andamios de hidrogeles, se destacan el ácido hialurónico (hialuronato),⁴¹ sulfato de

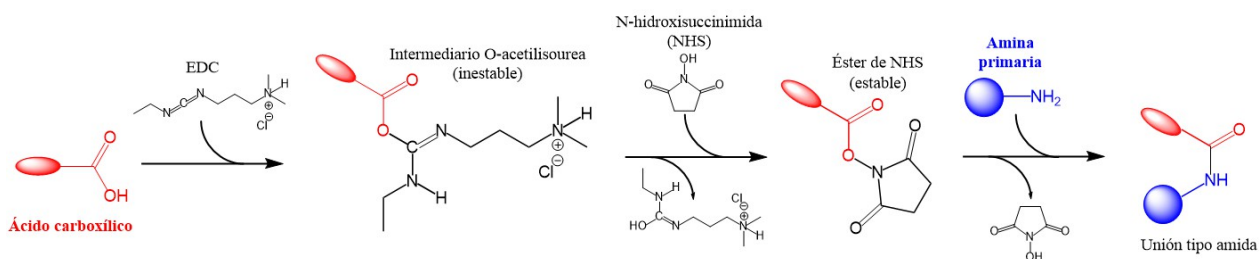


Figura 4. Esquema de reacción de amidación mediada por activación del ácido carboxílico con N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

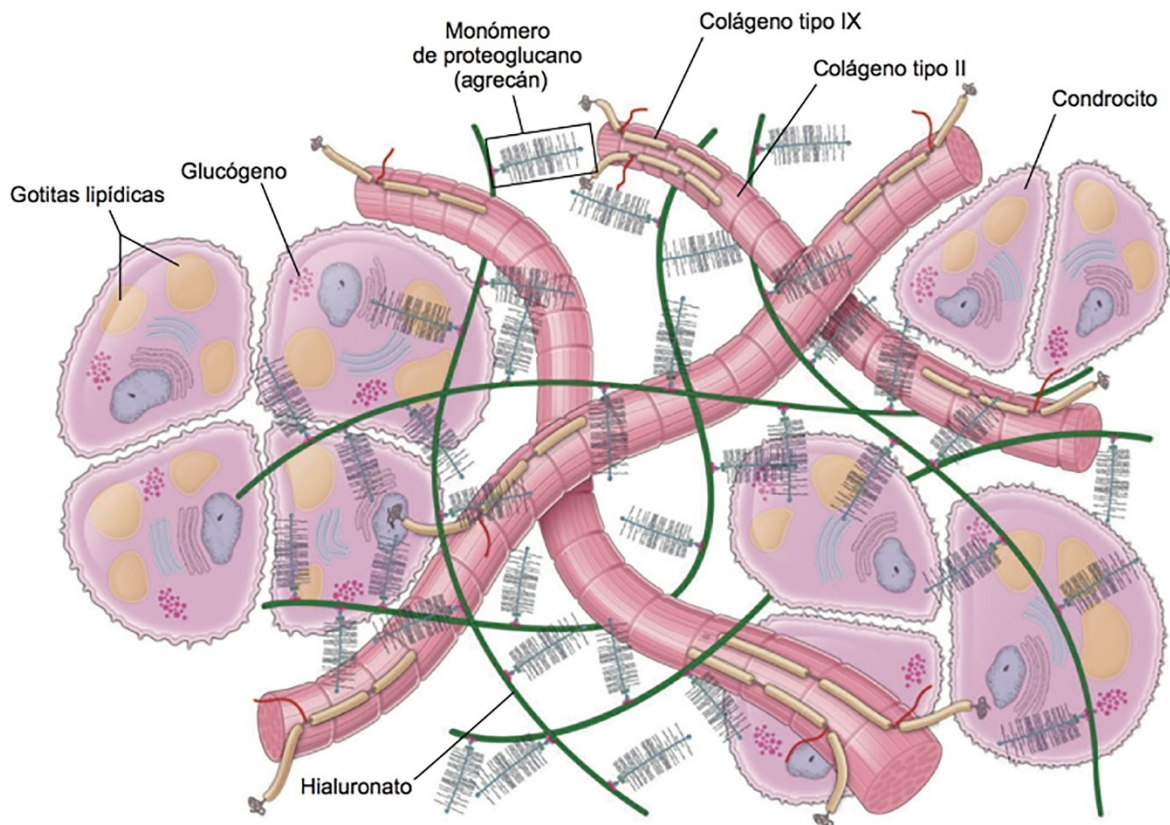


Figura 5. Ilustración de la estructura y composición del tejido cartilaginoso. Adaptado de Ross Histología, Wojciech Pawlina, 7^{ma} edición, 2015.

heparano⁴² y sulfato de condroitina⁴³ (SC, Figura 3b). De estos tres biopolímeros, el SC tiene gran potencial para ingeniería de tejido cartilaginoso debido a sus propiedades condrogénicas (induce la diferenciación celular de MSCs a condrocitos) y bajo costo.^{44,45} Varios estudios indican que el SC tiene un rol modulador de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF β , por sus siglas en inglés), regulando la señalización celular en la condrogénesis de hMSCs y el proceso morfogénico del cartílago.^{45,46} El factor TGF β es capaz de unirse a proteoglicanos que contienen SC (ej.: agrecano, biglicano, betaglicano y decorina), de esta manera el SC puede modular la respuesta celular dependiente de TGF β de una manera específica, ya que las señales activadas por TGF β son propagadas intracelularmente por proteínas llamadas SMAD (segundo mensajero) hacia el núcleo para regular la expresión génica.⁴⁷ Por otro lado, la elevada densidad de cargas negativa en SC (grupos sulfatos y carboxilatos) aumenta la osmolaridad del microambiente. Se ha reportado que las condiciones hiperosmóticas tiene efectos positivos en condrocitos y MSCs diferenciadas condrogénicamente, incrementando la secreción de ECM por efecto de la activación de transcritores osmosensibles.⁴⁷ Los andamios basados en SC pueden ser formados ya sea por mezcla con otros polímeros o mediante entrecruzamiento covalente con otras cadenas poliméricas para formar la red del hidrogel, mostrando su eficacia como agente pro-condrogénico en andamios con MSCs humanas (hMSCs).⁴⁸⁻⁵⁰ Un reciente trabajo ha demostrado que la bioconjugación superficial de andamios de poli(caprolactona) (PCL) con SC mejora la diferenciación de hMSCs a condrocitos, exhibiendo los mismos niveles de condrogénesis de hMSCs que al utilizar un medio de cultivo con suplementos condrogénicos.⁵¹

Otro ejemplo de bioconjugación con SC es el trabajo de Chen *et al.*, donde un hidrogel basado en el polisacárido pululano entrecruzado químicamente con SC exhibió una mayor diferenciación condrogénica y deposición de ECM que pululano por sí solo. En este estudio, condrocitos encapsulados en hidrogeles pululano/SC en relación de masa 3:1 mostraron una expresión génica de colágeno tipo II y agregano 130 % y 75 % superior, respectivamente, por efecto de la bioconjugación con SC.⁵² Desde la perspectiva de la terapia regenerativa, el uso de la ingeniería de tejido cartilaginosa empleando hMSCs para su diferenciación al fenotipo de condrocito, es una atractiva opción para el tratamiento de lesiones y enfermedades degenerativas del cartílago.⁵³ De esta manera, los andamios basados en hidrogeles bioconjugados con GEL y SC conjunto a hMSCs son una estrategia razonable para el diseño de biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejido cartilaginosa.^{54,55} Sin embargo, a pesar de las destacables características de ALG en procesabilidad y de la GEL y SC en bioactividad para potenciales aplicaciones en ingeniería de tejido cartilaginosa, no se ha estudiado la fabricación de andamios basados en ALG-GEL-SC covalentemente entrecruzados.

1.3. Nanocompósitos basados en hidrogeles para ITMR

A pesar de las sobresalientes cualidades de los hidrogeles, las deficientes propiedades mecánicas siguen siendo una limitante para fabricación de andamios de hidrogeles para aplicaciones en ingeniería de tejido cartilaginosa.⁵⁶ Existen varias estrategias para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, una de ellas es entrecruzar covalentemente las cadenas poliméricas.^{57,58} Otra estrategia ampliamente utilizada es la incorporación de nanomateriales como refuerzo de hidrogeles para aplicaciones en ITMR, tales como nanocelulosa,⁵⁹ arcilla,⁶⁰ y nanomateriales basados en carbono.⁶¹ Estos nanocompósitos no sólo han mostrado mejores propiedades mecánicas y reológicas, sino que además suelen impartir propiedades adicionales como propiedades ópticas, anisotropía, bioactividad, entre otras características, para obtener materiales multifuncionales.⁶² Uno de los nanomateriales más interesante para aplicaciones biomédicas es el óxido de grafeno (GO, por sus siglas en inglés), un derivado de grafito basado en una o varias capas de átomos de carbono de estructura aromática (hibridación sp_2) parcialmente funcionalizada con grupos ricos en átomos de oxígeno (principalmente grupos carboxilatos, hidroxilos y epóxidos).⁶³ El GO es muy estable en suspensiones acuosas a diferencia del grafeno, GO-reducido y nanotubos de carbono que presentan una naturaleza hidrofóbica, lo que se debe a la polaridad de los grupos funcionales ricos en átomos de oxígeno. Esta propiedad permite utilizar GO para aplicaciones biomédicas tales como liberación controlada de fármacos, biosensores, fototerapia e ITMR.⁶⁴ Hoy en día, es sabido que nanocompósitos hidrogel/GO exhiben mejores propiedades mecánicas comparado con la base de hidrogel sin GO.⁶⁵ Cuando los polímeros utilizados para formar el hidrogel poseen grupos funcionales dadores/aceptores de hidrógeno en su estructura (ej.: grupos amido, hidroxilo, amino o carboxilo), el GO puede actuar como un entrecruzante físico a través de múltiples interacciones por enlaces de hidrógeno.⁶⁶ Estas características pueden explicar las propiedades mecánicas superiores de los hidrogeles nanocompósitos que incorporan GO. Otra propiedad relevante del GO es su bioactividad,⁶⁴ que ha motivado su incorporación en biomateriales principalmente para propósitos antimicrobianos. Se han producido varios nanocompósitos polímero/GO antimicrobianos, basados en los diferentes mecanismos bactericida propuestos para esta nanopartícula.⁶⁷ Respecto a la respuesta de MSCs al interactuar con GO, en el contexto de ITMR, se han desarrollado andamios basados en nanocompósitos polímero/GO para analizar principalmente su efecto osteogénico,⁶⁸ sin embargo, durante los últimos años también se ha explorado la diferenciación de MSCs hacia otros fenotipos celulares.⁶⁴ De hecho, se han reportado andamios bioactivos basados en

nanocompuestos polímero/GO con mejores desempeño (comparados con la matriz sin GO) en la diferenciación neurogénica,⁶⁹ adipogénica⁷⁰ y condrogénica.⁷¹⁻⁷³

El método usual para la diferenciación condrogénica de MSCs en ingeniería de tejido de cartílago es el empleo de un cóctel bioquímico como medio condrogénico. Estos agentes pro-condrogénesis incluyen el factor TGF β , dexametasona, ácido ascórbico, piruvato de sodio, entre otros suplementos.⁷⁴ En particular, TGF β es una familia de citocinas que juegan un rol mediador en la cascada de señalización de la diferenciación condrogénica y el mantenimiento del fenotipo de condrocitos diferenciados.⁷⁵ El trabajo reciente de Zhou *et al.* es un ejemplo de la utilización de un medio de cultivo con suplementos condrogénicos, donde se utiliza un nanocompuesto hidrogel basado en GEL-MA, diacrilato de poli(etilenglicol) y GO como andamio para hMSCs. La presencia de GO en los andamios incrementó la viabilidad celular y la expresión de marcadores condrogénicos debido a la adsorción y concentración localizada de los suplementos condrogénicos como TGF β , lo cual aceleró el proceso condrogénico.⁷⁶ Estos resultados muestran un prometedor futuro de hidrogeles combinados con GO para aplicaciones en el ámbito de ITMR del cartílago. No obstante, el uso de TGF β como suplemento condrogénico para hMSCs además de incrementar costes, podría seguir caminos no deseados como osteogénesis y diferenciación condrogénica hipertrófica,⁷⁷ así como tumorigénesis y metástasis en cáncer humano.⁷⁸ Estos aspectos son parte de los problemas relacionados con terapias que utilizan MSCs. Por estos motivos, es necesario desarrollar biomateriales y métodos de terapias regenerativas libres de factores de crecimiento exógenos para una traslación clínica de la ingeniería de tejido más segura y menos costosa.

1.4. Impresión 3D como herramienta en ITMR

Una de las metodologías que se ha ido posicionando en los últimos 5 años es la impresión 3D de andamios para ingeniería de tejido.⁷⁹ Esta versátil herramienta tiene la capacidad de fabricar constructos con libertad de forma, lo que ha permitido imprimir andamios de hidrogeles con forma de vasos sanguíneos,⁸⁰ válvula aorta,⁸¹ huesos,¹⁵ cartílagos faciales (oreja y nariz),⁸² entre otras estructuras anatómicas. La ventaja de fabricar andamios mediante impresión 3D radica en la obtención de estructuras complejas hechas a la medida, de acuerdo con las necesidades que podría requerir un paciente, y la capacidad de controlar aspectos estructurales como el tamaño de poro y la composición química (impresión 3D multimaterial).⁷⁹ Existen distintas técnicas de impresión 3D en ITMR que se utilizan dependiendo principalmente del material utilizado en la fabricación. Los principales tipos de impresión 3D con sus: ventajas, desventajas, y aplicaciones se resumen en la Tabla 1. Para construir el objeto tridimensional, usualmente se fabrica un diseño asistido por computador (archivo CAD) capa a capa en el eje z. En el caso particular de la ITMR de cartílago, se han reportado varias investigaciones que utilizan la impresión 3D como herramienta de fabricación de andamios. Entre los biomateriales más utilizados para fabricar estos andamios se encuentran termoplásticos como PCL e hidrogeles como ALG, colágeno, celulosa nanocrystalina, entre otros polímeros, donde la técnica de impresión 3D más empleada es la microextrusión.^{59,79} La impresión 3D de hidrogeles mediante micro-extrusión requiere de una rápida transición fluido/sólido con el propósito de obtener estructuras bien definidas y reproducibles, por este motivo estudiar las propiedades reológicas de las tintas de impresión es fundamental. Los hidrogeles basados en ALG son ampliamente utilizados en biofabricación mediante impresión 3D debido a sus buenas propiedades reológicas y rápido entrecruzamiento ionotrópico.⁸³ En este proceso una solución de ALG es extruida sobre un medio de ploteo que suele ser una solución de cloruro de calcio, donde ocurre el entrecruzamiento ionotrópico que rigidiza el hidrogel.⁵⁶

Tabla 1. Principales técnicas utilizadas en impresión 3D

Tipo de impresión 3D (referencias)	Ventajas	Desventajas	Materiales y Aplicaciones
FDM (<i>fused deposition modeling</i> , ref. ^{15, 79})	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Alta fidelidad de forma • Variedad de polímeros termoplásticos • Industrialmente escalable 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta temperatura de procesamiento (incompatible para bioimpresión) • Rigidez y fragilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Termoplásticos como PLA, PCL y ABS • Andamios de tejido óseo. • Andamios de tejido osteocondral
Microextrusión (<i>3D plotting</i> , ref. ^{15, 30, 56, 79})	<ul style="list-style-type: none"> • Diversidad de materiales • Impresión con multicomponentes • Apto para bioimpresión 3D 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de transición fluido-rígido rápida • Menor resolución que otras técnicas • Optimización de parámetros dependiente del material 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrogeles, pastas de cerámicos y metales • Andamios de tejidos blandos y semirígidos • Bioimpresión de constructos • <i>Tissue/organ-on-a-chip</i>
<i>Inkjet</i> (ref. ^{30, 79})	<ul style="list-style-type: none"> • Alta velocidad de impresión • Impresión multicomponente • Apto para bioimpresión 3D 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitado a tintas poco viscosas • Requiere de soportes de sacrificio 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrogeles y soluciones de polímeros • Andamios de tejido hepático • Modelos de cáncer
SLA (estéreolitografía, ref. ^{15, 30, 23, 56, 79}) y DLP (<i>digital light processing</i> , ref. ^{23, 79})	<ul style="list-style-type: none"> • Alta velocidad de impresión • Acabado liso de superficie • Alta resolución y fidelidad de forma • Apto para bioimpresión 3D 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitado a materiales fotocurables • Requiere de mayor cantidad de material • La intensidad de la luz láser puede producir muerte celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Resinas fenólicas, poli(acrilatos), hidrogeles fotoentrecruzables • Andamios de tejido óseo y cartilaginoso • Dispositivos médicos
SLS (<i>selective laser sintering</i> , ref. ^{15, 79})	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere de plataforma de soporte • Material en polvo 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado costo • Utiliza un láser de alta potencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Nylon, cerámicos, aluminio, acero y otros metales • Prótesis

Bioimpresión 3D
libre de andamios
(ref. ¹⁵, ³⁰, ²³, ⁵⁶, ⁵⁹, ⁷⁶,
⁷⁹)

- | | | |
|---|--|--|
| <p>2. Biofabricación directa con células</p> <p>3. No existen problemas de biocompatibilidad</p> <p>4. Constructos completamente biológicos</p> | <p>5. Método sofisticado y costoso</p> <p>6. Constructos con baja fidelidad de forma</p> <p>7. Propiedades mecánicas deficientes</p> | <p>8. Células como material biológico</p> <p>9. Constructos de tejido cardiaco, cartílagos, músculos, entre otros</p> <p>10. Modelos de cáncer humano.</p> |
|---|--|--|
-

En particular, andamios basados en ALG bioconjugado exhiben un balance perfecto entre procesabilidad (calidad de impresión) y bioactividad con hMSCs. Ejemplo de aquello es el reciente trabajo de Lin *et al.*, donde fabricó andamios basados en ALG bioconjugado con ϵ -lisina, utilizando impresión 3D.⁸⁴ Estos andamios bioconjugados exhibieron una gran procesabilidad y fidelidad de forma durante la impresión 3D, además de un incremento de un 8 % a un ~ 60 % de adhesión celular al compararse con andamios de alginato puro. Muchos investigadores han desarrollado nanocompósitos de hidrogeles con el propósito de mejorar la calidad de impresión de los andamios. Entre las distintas nanopartículas utilizadas como relleno, destacan la celulosa nanocristalina,⁸⁵ arcillas como Laponita,⁸⁶ sílica⁸⁷ y nanotubos de carbono.⁸⁸ No obstante, la impresión 3D de nanocompósitos basados en hidrogel/GO no ha sido muy estudiada. El trabajo de Li *et al.* ha sido pionero en ese sentido, en esta investigación se estudia el efecto del GO en la impresión 3D de nanocompósitos ALG/GO y se concluye que el GO sirve como puente entre cadenas de ALG, que permite mejorar las características reológicas de la tinta de impresión y en consecuencia obtener estructuras más definidas.⁸⁹

Un método más sofisticado de construcción de estructuras para aplicaciones en ITMR es la bioimpresión 3D, que consiste en la impresión de una biotinta compuesta por células embebidas en un pre-hidrogel para fabricar estructuras tridimensionales con células *in situ* denominadas constructos.⁹⁰ El concepto de constructo se utiliza para diferenciarse de los andamios, donde las células son sembradas sobre la estructura 3D en una etapa posterior al proceso de fabricación. Este método de biofabricación es aplicable sólo a biomateriales que forman hidrogeles y requiere considerar otros aspectos que puedan afectar la viabilidad celular, tal como los esfuerzos mecánicos a los que se someten las células en el caso que sea mediante un proceso de extrusión o la radiación UV a la que se exponen las células cuando se realiza fotoentrecruzamiento de polímeros.⁹¹ La bioimpresión 3D ofrece la posibilidad de fabricar constructos “vivos” estructuralmente más complejos que con la aproximación tradicional con andamios, como tejidos heterogéneos y órganos (o partes de órganos).⁹²⁻⁹⁴ La bioimpresión 3D de constructos para ITMR posee ciertas ventajas sobre la aproximación convencional utilizando andamios, la principal tiene que ver con la homogeneidad en la distribución de las células que en andamios muy grandes o con formas complejas puede ser muy baja. En cambio, la distribución celular en los constructos suele ser muy homogénea al poseer una movilidad celular limitada en el seno del hidrogel.⁹⁵ No obstante, se debe tener en consideración dos importantes desventajas: el proceso de fabricación requiere de materiales y condiciones de trabajo estériles, y la escalabilidad de esta técnica está supeditada a la capacidad de expansión de las células a utilizar.⁹⁶ Los métodos de bioimpresión 3D más utilizados son la extrusión,

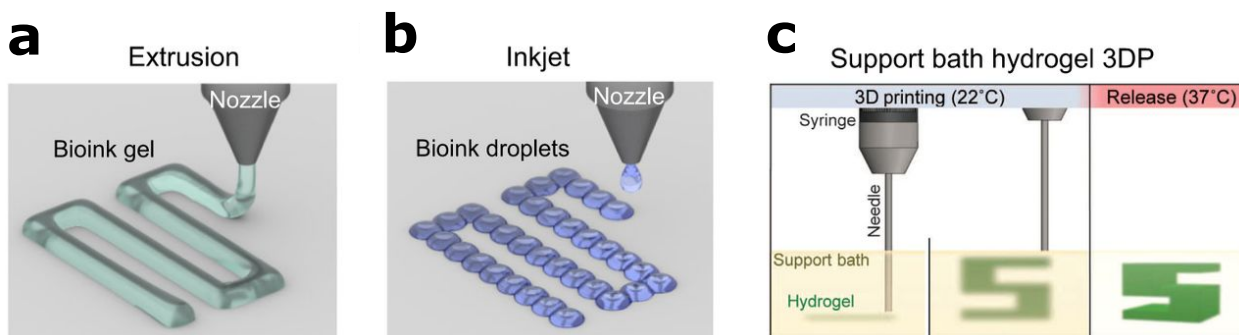


Figura 6. Métodos utilizados usualmente en bioimpresión 3D: microextrusión (a), inkjet (microgotas) (b) y método *gel-in-gel* (c). Adaptado de ref. 97.

inkjet y la técnica *gel-in-gel* donde se utiliza un hidrogel de soporte como medio de ploteo (Figura 6).⁹⁷ Todos estos métodos requieren hacer pasar la biotinta a través de una aguja o boquilla estrecha (diámetro entre 100 y 800 μm), por lo que se debe tomar en consideración la presión y esfuerzos de corte a que las células de la biotinta son sometidas. Este estrés mecánico sumado a los métodos de entrecruzamiento (incremento/descenso de temperatura, radiación UV, reacciones químicas), son aspectos que aumentan la mortalidad celular en el proceso de bioimpresión 3D.⁹⁸ La biomimética de la composición del hidrogel de la biotinta con el entorno natural del tejido u órgano que se desea biofabricar es un factor clave en la obtención de estructuras biológicamente funcionales.^{36,79,82,90} Entre las investigaciones más relevantes destaca el trabajo de Noor *et. al.* publicado en 2019, en este trabajo se presenta el primer corazón completamente 3D bioimpreso que posee toda la complejidad estructural y variedad de tejidos que componen el órgano (Figura 7).⁹⁹ En esta investigación se empleó un hidrogel personalizado proveniente del tejido omental humano (grasa abdominal) de un paciente, en combinación con distintos fenotipos de células para dar lugar a diferentes biotintas que permitieron construir las diferentes zonas del órgano. En este caso, utilizar una matriz de origen natural (del propio paciente) ayudó para obtener una tinta biocompatible para embeber las distintas células, no obstante, la reprogramación y diferenciación de las células requieren realizarse previamente a la formulación de las biotintas.

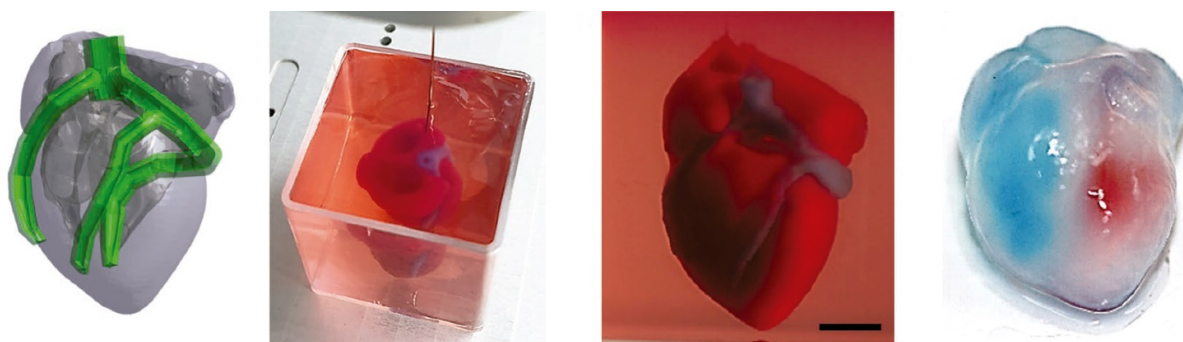


Figura 7. Corazón a escala fabricado mediante bioimpresión 3D. De izquierda a derecha: modelo de dibujo 3D utilizado, donde se distingue en verde el tejido endotelial de los vasos sanguíneos; proceso de bioimpresión 3D utilizando un hidrogel de soporte temporal (técnica *gel-in-gel*); corazón 3D bioimpreso terminado, aún dentro del hidrogel de soporte (barra de escala = 5 mm); fotografía del corazón 3D bioimpreso después de retirar el hidrogel de soporte y con los ventrículos llenos con soluciones de distinto color. Adaptado de referencia 99).

1.5. Propuesta de investigación

La principal motivación de este trabajo de tesis es abrir una ruta desde la perspectiva de los biomateriales y la ITMR, para encontrar una solución potencialmente trasladable a la clínica que permita regenerar tejido cartilaginoso deteriorado o ausente. Debido a la necesidad de desarrollar biomateriales intrínsecamente condroinductivos para aplicaciones en ITMR del cartílago, el propósito de este trabajo de tesis es producir una matriz de hidrogel reforzada con GO para imitar el ambiente extracelular del tejido cartilaginoso. Para obtener este nanocompósito hidrogel, se plantea bioconjuguar el polisacárido ALG con los polímeros bioactivos GEL y SC, para incrementar la adhesión-proliferación celular e inducir condrogénesis en hMSCs, respectivamente. Para llevar a cabo la bioconjugación se procederá a modificar químicamente los biopolímeros ALG, GEL y SC con grupos metacrililo (ALG-MA, GEL-MA y SC-MA respectivamente) para obtener cadenas poliméricas foto-entrecruzables entre sí. A esta matriz de hidrogel se adicionará GO para producir tintas de nanocompósitos hidrogeles con mejor procesabilidad en la impresión 3D de andamios y potenciar la bioactividad del material. En la Figura 8 se muestran ilustraciones representativas de los cuatro componentes base que se propone obtener. Se espera que las formulaciones de los nanocompósitos permitan obtener andamios que imiten la ECM del tejido cartilaginoso. Este entorno artificial biomimético sería propicio para la proliferación de hMSCs y además podría inducir la diferenciación condrogénica de estas células sin la necesidad de estímulos o agentes pro-condrogénicos exógenos (cóctel bioquímico), debido a la composición química del nanocompósito. Adicionalmente, se pretende evaluar los hidrogeles propuestos como biotintas para la bioimpresión 3D de constructos andamio-hMSCs. Para lo anterior, se tomará como precedente los resultados obtenidos con las distintas formulaciones utilizadas en la fabricación de andamios, así como el desempeño biológico en términos de viabilidad celular.

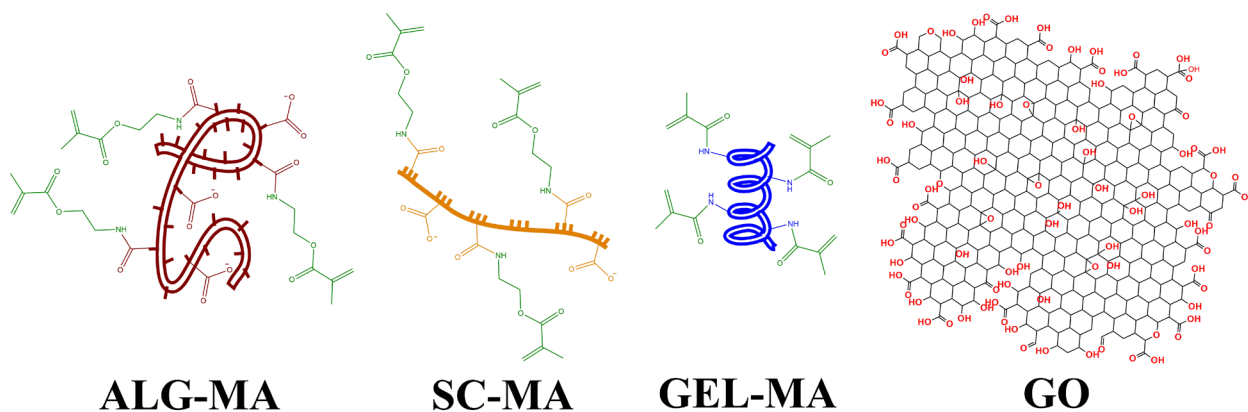


Figura 8. Representación esquemática de los materiales base propuestos.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis.

- Los nanocompuestos hidrogeles de alginato bioconjugados con gelatina y sulfato de condroitina, más óxido de grafeno, serán una plataforma biocompatible y condrogénica para la fabricación de andamios mediante impresión 3D, aptos para el cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- La inclusión de óxido de grafeno permitirá modular las propiedades mecánicas y reológicas de los hidrogeles, adicionalmente impartirá bioactividad incrementando la adhesión celular a los andamios impresos.

2.2. Objetivo general.

Sintetizar nuevos biomateriales nanocompuestos multifuncionales de hidrogeles biopoliméricos basados en alginato de sodio bioconjugado con gelatina y sulfato de condroitina metacrilados, con óxido de grafeno para fabricar mediante impresión 3D andamios para ingeniería de tejido cartilaginoso.

2.2.1. Objetivos específicos.

- a) Modificar químicamente los biopolímeros alginato de sodio, gelatina y sulfato de condroitina para su posterior entrecruzamiento y estudiar las propiedades reológicas de las formulaciones preparadas para impresión 3D de los andamios y el efecto de la adición de óxido de grafeno.
- b) Fabricar y caracterizar andamios mediante impresión/bioimpresión 3D a partir de los nanocompuestos de los biopolímeros metacrilados y óxido de grafeno, mediante gelificación ionotrópica/térmica primaria y foto-entrecruzamiento secundario post-impresión.
- c) Extraer, aislar y expandir células madre mesenquimales desde tejido adiposo humano para realizar ensayos de citotoxicidad a los nanocompuestos hidrogeles sintetizados, evaluando el efecto de la bioconjugación mediante análisis de la viabilidad y proliferación celular.
- d) Estudiar la expresión del fenotipo de condrocitos para comprobar la condrogénesis en los andamios 3D impresos sembrados con hMSCs, analizando el efecto de la composición de las distintas formulaciones.
- e) Evaluar la bioimpresión 3D de una biotinta basada en los nanocompuestos hidrogeles con hMSCs. Estudiando la viabilidad, migración, morfología y diferenciación celular en los constructos.

3. Metodología

3.1. Materiales y reactivos utilizados en la síntesis de nanocompuestos hidrogeles

Los biopolímeros grado *BioReagent* alginato de sodio de algas pardas (ALG, relación M/G = 0.72, Lot #BCBS1047V), sulfato de condroitina A de tráquea bovina (SC, 85 % SC tipo A y 15 % SC tipo C, Lot #SLBQ0017V) y gelatina de piel porcina (GEL, tipo A y fuerza del gel ~ 300, Lot #SLBQ9498V) fueron comprados a Sigma-Aldrich (Noruega, China y EE. UU., respectivamente) y utilizados tal como fueron recibidos. Clorhidrato de metacrilato de 2-aminoetilo (AEMA, por sus siglas en inglés), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), anhídrido metacrílico (AMA), fotoiniciador 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (PI), grafito, permanganato de potasio, nitrato de sodio, cloruro de calcio, ácido sulfúrico, peróxido de hidrógeno, etanol y óxido de deuterio fueron comprados a Sigma-Aldrich o Merck Millipore (China, EEUU o Alemania). Tubos de diálisis Spectra/Por® 1 (MWCO= 6-8 kDa, 50 mm de ancho plano) utilizados en la purificación de los biopolímeros metacrilados fueron comprados a Spectrum Laboratories (EE. UU.). Para la síntesis y purificación de los biopolímeros metacrilados se utilizó agua Tipo I (ultrapura) de un sistema de purificación Simplicity® UV (Merck Millipore).

3.2. Modificación química de biopolímeros y síntesis de óxido de grafeno

La modificación química de los polímeros naturales y la síntesis de GO se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros, FCFM, Universidad de Chile. Los tres biopolímeros ALG, SC y GEL fueron funcionalizados con grupos metacrililoilo polimerizables, para obtener respectivamente ALG-MA, SC-MA y GEL-MA.¹⁰⁰ El foto-entrecruzamiento de los biopolímeros metacrilados, para bioconjuguar ALG con los biopolímeros bioactivos SC y GEL, fue llevado a cabo utilizando el fotoiniciador radical PI al 0.05 % (p/v). La síntesis de GO fue realizada mediante el método de Hummers modificado, a partir de grafito en polvo.¹⁰¹

3.2.1. Obtención de ALG-MA y SC-MA

Las cadenas de los polisacáridos ALG y SC fueron modificadas incorporando grupos metacrilato de 2-amidoetilo, utilizando el método de amidación mediante activación de grupos carbonilos de los biopolímeros con EDC/NHS. Para esto, 1.0 g de polisacárido (ALG o SC) es disuelto en 100 mL de solución amortiguadora de MES 50 mM (pH = 6.5) con NaCl 0.5 M. Luego se agrega a esta solución 0.87 g (4.6 mmol) de EDC y 0.26 g (2.3 mmol) de NHS para activar los grupos carbonilos. Después de cinco minutos, se agrega 0.38 g (2.3 mmol) de AEMA a la mezcla y se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, el biopolímero metacrilado es precipitado en etanol absoluto, el producto sólido es filtrado al vacío y secado en una estufa con vacío a 70 °C durante la noche. El producto sólido es disuelto en ~60 mL de agua tipo I y la solución obtenida es dializada en un tubo de diálisis contra agua tipo I (3 L) durante cuatro días (cambiando el agua de dialisato cada 12 h). Finalmente, el producto purificado es liofilizado en un liofilizador Martin Christ Alpha 1-2 LDplus y almacenado a -20 °C hasta su utilización. Los biopolímeros ALG-MA y SC-MA fueron caracterizado mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN).

3.2.2. Obtención de GEL-MA

Gel fue químicamente modificada con grupos metacrililo mediante la ampliamente utilizada reacción bifásica con AMA. En resumen, 1.0 g de GEL es disuelto en 10 mL de solución amortiguadora PBS a pH = 7.4 y 50 °C. Cuando el sólido está completamente disuelto, se agrega gota a gota 0.65 mL (4.4 mmol) de AMA bajo agitación vigorosa (300 rpm). La reacción es mantenida a 50 °C por 2 h, manteniendo el valor de pH entre 7 y 7.5 mediante la adición de una solución diluida de NaOH. Luego, la mezcla es diluida en 90 mL de agua y dializada en un tubo de diálisis contra agua tipo I (3 L) durante cuatro días (cambiando el agua de dialisato después de 2 h y luego cada 12 h). Finalmente, el producto purificado es liofilizado y almacenado a -20 °C hasta su utilización. GEL-MA fue caracterizado mediante FTIR y ¹H RMN.

3.2.3. Síntesis de GO

Se sintetizó óxido de grafeno de acuerdo con el método de Hummers modificado. Primero, se mezcla grafito en polvo (1.0 g) con nitrato de sodio (0.5 g) seguido de la adición de 25 mL de ácido sulfúrico concentrado bajo constante agitación. Después de 30 minutos, se agrega gradualmente KMnO₄ (3.0 g) a la mezcla, manteniendo la temperatura bajo 20 °C con un baño de hielo. Luego la mezcla se mantiene a 35 °C bajo agitación por 2 h y la solución resultante se diluye con 500 mL de agua bajo agitación vigorosa durante 1 h. Para asegurar la reacción completa del KMnO₄, se agrega 5 mL de H₂O₂ al 30 % v/v a la mezcla reaccionante. La suspensión resultante fue centrifugada y lavada con HCl_(dil) y agua respectivamente, seguido de una filtración al vacío. El sólido obtenido es resuspendido en agua desionizada, exfoliado mecánicamente por una hora con un cañón de ultrasonido Vibra-Cell Ultrasonic Processors VC 505 (Sonics & Materials) y liofilizado para obtener las láminas secas de GO. El GO sintetizado fue caracterizado a través de FTIR, espectroscopía UV-Visible, microscopía óptica con luz polarizada (POM, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y difracción de rayos X (DRX).

3.3. Caracterización espectroscópica

Los espectros FTIR con Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR, por sus siglas en inglés) fueron adquiridos en un espectrómetro Agilent Cary 630 FTIR. El estudio mediante espectroscopía Raman se llevó a cabo en un micro-espectrómetro Horiba HR Evolution acoplado a un microscopio óptico Olympus con un objetivo 100X, utilizando un láser de 532 nm, potencia de fuente de 107 mW y empleado el *software* LabSpec6 para adquirir los espectrogramas (tres escaneos acumulados con 90 s de adquisición). El análisis de ¹H RMN fue realizado en un espectrómetro Bruker AVANCE III HD-400, los experimentos se llevaron a cabo disolviendo las muestras en óxido de deuterio y los archivos FID obtenidos fueron procesados con MestReNova V.12. El espectro UV-Visible de GO fue obtenido utilizando un espectrofotómetro Rayleigh UV-1601 (cubeta de cuarzo, camino óptico de 10 mm).

3.4. Caracterización microestructural

El análisis mediante DRX fue realizado utilizando radiación Cu K α con un difractómetro Bruker D8 Advance. Las imágenes TEM fueron adquiridas con un microscopio electrónico FEI Tecnai F20 S/TEM, montando la muestra en una grilla *Holey Carbon on 300 mesh Cu grid*.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM, por sus siglas en inglés) fueron adquiridas con un microscopio FEI Quanta™ FEG SEM.

3.5. Caracterización mediante microscopía óptica

El análisis mediante POM se realizó en un microscopio Leica DMLS equipado con un sistema de filtros polarizador/analizador y un filtro de retardo de onda completa (λ). El estudio de los cultivos celulares fue realizado en un microscopio de contraste de fase/fluorescencia Leica DM IL LED y un estereomicroscopio Leica MZ10 F. Los instrumentos fueron equipados con una cámara digital Leica MC170 HD para la adquisición de microfotografías.

3.6. Impresión 3D de andamios

La formulación de las distintas tintas y la fabricación de andamios mediante impresión 3D se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros, FCFM, Universidad de Chile. Para fabricar los andamios mediante impresión 3D, se preparó tres tintas redisolviendo los biopolímeros metacrilados liofilizados con las siguientes formulaciones: **ASG** compuesta por ALG 10 mg mL⁻¹ + ALG-MA 6 mg mL⁻¹ + CS-MA 6 mg mL⁻¹ + GEL-MA 6 mg mL⁻¹ + PI 0.5 mg mL⁻¹ en agua tipo I, **ASG/GO0.1** con la composición de ASG + GO 0.1 mg mL⁻¹ y **ASG/GO1** con la composición de ASG + GO 1.0 mg mL⁻¹. La impresión 3D de los andamios fue llevada a cabo en una impresora 3D Bioplotter™ de cuarta generación (Envisiontec, Alemania). Los andamios fueron diseñados utilizando el *software* de dibujo Materialise Magics y los archivos STL obtenidos fueron procesados con Perfactory®. Para imprimir los andamios se llenaron cartuchos de polietileno de 30 mL (Optimum® Components, Nordson EFD) con cada tinta. El cartucho con tinta se ubica en un cabezal dispensador de baja temperatura a 5 °C y la tinta es extruida a través de una aguja de 25 G, sobre una placa Petri a 2 °C. Las tintas son físicamente entrecruzadas mediante un proceso ionotrópico con una solución de CaCl₂ 100 mM (para las cadenas de ALG) y mediante un proceso termotrópico (para las cadenas de GEL) al entrar en contacto con la superficie fría. La primera capa impresa se deposita sobre la placa humedecida con una pequeña cantidad de solución entrecruzante (~ 100 µL) para evitar que las hebras se desprendan de la superficie de vidrio, luego las capas sucesivas son entrecruzadas agregando solución de CaCl₂ en exceso con una jeringa. Luego, los andamios impresos son irradiados con una lámpara Blak-Ray® UV (Ted Pella, EE. UU.) con una longitud de onda de 365 nm e intensidad de 9 mW cm⁻² por 5 minutos (a 20 cm de distancia), para foto-entrecruzar los biopolímeros metacrilados. Finalmente, los andamios son liofilizados y almacenados a -20 °C hasta su evaluación biológica.

3.7. Bioimpresión 3D de constructos

La formulación de la biotinta y la fabricación de constructos mediante bioimpresión 3D se llevó a cabo en el grupo *Biomaterials for Regenerative Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia* (IBEC), Barcelona, España. La Bioimpresión 3D de constructos se realizó empleando una biotinta reformulada compuesta por: ALG 17 mg mL⁻¹ + ALG-MA 10 mg mL⁻¹ + CS-MA 10 mg mL⁻¹ + GEL-MA 10 mg mL⁻¹ + PI 0.5 mg mL⁻¹ + 8.4 · 10⁵ hMSCs/mL en PBS con 10 % de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés). Los componentes de la biotinta se esterilizaron con radiación UV-C durante una hora, excepto la solución de PI que fue esterilizada mediante filtración a través de un filtro de 0.22 µm. Los constructos fueron fabricados en una bioimpresora 3DDiscovery™ Evolution (regenHU, Suiza). Primero, se llena un cartucho de polietileno de 3 mL (Optimum® Components, Nordson EFD) con la biotinta en

condiciones estériles y se mantiene a 5 °C durante una hora utilizando una camisa de control de temperatura en el cabezal de impresión PH1. La impresión de constructos se realiza mediante micro-extrusión de la biotinta a través de una aguja de 25 G, en placas de cultivo de 6 pocillos *Ultra-low Attachment Surface* (Corning). Una vez impresa la primera capa, se procede a rociar el constructo con solución de CaCl₂ 100 mM contenido en un cartucho de polietileno acoplado a una micro-válvula electromagnética (cabezal PH2) para dispensar un *jet* de solución sobre la capa impresa. Al terminar la impresión del constructo, se procede a foto-entrecruzar las cadenas biopoliméricas metacriladas con el cabezal UV, iluminando los constructos con luz de 365 nm durante 5 segundos (480 mW cm⁻² a ~ 2.8 cm). Finalmente, el exceso de solución entrecruzante se retira por aspiración, se adiciona medio de cultivo y se ubican las placas de cultivo en una incubadora a 37 °C con una atmósfera de 5% CO₂.

3.8. Caracterización reológica

El estudio reológico de los hidrogeles utilizados en la fabricación de andamios mediante impresión 3D se llevó a cabo en el grupo *Polymeric Materials, Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology* (KIT), Karlsruhe, Alemania. Las mediciones de las propiedades reológica de las tintas de impresión formuladas se realizaron en un equipo Discovery Hybrid Rheometer III (TA Instruments), equipado con un sistema Peltier de control de temperatura. Todas las mediciones se realizaron a 4 °C y las muestras se dejaron equilibrar por 60 s antes de iniciar cada experimento. Se utilizó una geometría cono-plato (40 mm, 2 °) y se midió la viscosidad en función de la velocidad de corte en el rango de 0.01-1000 s⁻¹. Se realizó un barrido de amplitud de esfuerzo de corte de la oscilación entre 0.1-1000 Pa a una frecuencia de 1 Hz para definir la región viscoelástica lineal (LVR, por sus siglas en inglés). Considerando la LVR, se eligió un esfuerzo de 10 Pa para llevar a cabo las mediciones de oscilación de frecuencia medidas en el rango de 10⁻³-10² Hz. Para el estudio de recuperación de viscosidad, la viscosidad de las tintas fueron medidas durante 130 s, donde se fijó una velocidad de corte de 0.1 s⁻¹ por 60 s en la etapa I, 100 s⁻¹ por 10 s en la etapa II y nuevamente 0.1 s⁻¹ por 60 s en la etapa III. Este procedimiento imita el proceso de impresión 3D por extrusión y permite obtener información sobre la recuperación de viscosidad de las tintas post impresión. Se estima que una velocidad de corte de 100 s⁻¹ es la máxima velocidad de corte experimentada por tintas basadas en alginato durante procesos de impresión 3D.⁸⁹ El cambio del módulo en cada tinta durante el entrecruzamiento ionotrópico fue medido usando una geometría de platos paralelos (diámetro de 8 mm y espaciado = 1.4 mm). Las mediciones se llevaron a cabo a una deformación de 0.1 % y una frecuencia de 1 Hz por 800 s. Un minuto después de iniciar la medición, se dispensó 0.5 mL de CaCl₂ 100 mM alrededor de la tinta provocando el entrecruzamiento mientras se mide los módulos de almacenamiento y pérdida simultáneamente.

3.9. Propiedades mecánicas

Se estudió las propiedades mecánicas de los compósitos hidrogeles mediante ensayos de compresión mecánica uniaxial sin confinamiento en un instrumento Electromechanical Universal Testing Machine WDW-S5 (Jinan Testing Equipment IE Corporation), provisto de una celda de carga de 5 kN. Se ensayaron probetas de geometría cilíndrica de 10 mm de diámetro y 5 mm de altura, midiendo cinco probetas de cada composición. Las muestras se prepararon vertiendo los tres tipos de tintas de impresión utilizadas, en moldes de resina fenólica donde se procedió a entrecruzar ionotrópicamente con un exceso de solución de CaCl₂ 100 mM durante 24 h para asegurar la difusión de cationes de Ca²⁺ al centro del hidrogel.

Posteriormente, las probetas son desmoldadas e irradiadas con una lámpara UV en las mismas condiciones que las empleadas durante la impresión 3D (sección 3.6), para luego ser sometidas a los ensayos mecánicos de compresión. El ensayo se realizó una vez aplicada una fuerza de 0.10 N para verificar el contacto con la probeta y la velocidad de compresión aplicada fue de 1 mm min⁻¹. El módulo de compresión fue calculado a partir de la región lineal de deformación elástica en las curvas de esfuerzo-deformación promediadas.

3.10. Contenido de agua en nanocompuestos hidrogeles

Se estudió el contenido de agua en los tres tipos de andamios (ACG, ACG/GO01 y ACG/GO1), calculando la razón de hinchamiento y la fracción en masa de agua en los hidrogeles utilizando las ecuaciones:

$$\text{Razón de hinchamiento} = \frac{W_h - W_s}{W_s}$$

$$\text{Fracción de agua} = \frac{W_h - W_s}{W_h}$$

donde, W_h y W_s son la masa del andamio hidratado y la masa del andamio no hidratado respectivamente. La razón de hinchamiento se define como el incremento fraccional de la masa del hidrogel debido a la absorción de agua. Se determinó la masa de cinco andamios de cada composición en una balanza analítica en las siguientes condiciones: i) recién iono-/fotoentrecruzado, ii) liofilizado y iii) rehidratado por inmersión en PBS durante 24 h.

3.11. Liberación de GO desde nanocompuestos

El estudio de liberación de GO desde los andamios ACG/GO01 y ACG/GO1 durante 28 días a 37 ° C. Para aquello se sumerge los andamios nanocompuestos y ACG como blanco en 3 mL de PBS y se analizó la concentración de GO libre fotométricamente por absorciometría a 236 nm. Cada medición se realizó por triplicado.

3.12. Evaluación biológica: biocompatibilidad y bioactividad de los andamios

La aislación y caracterización de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hADMSC, por su sigla en inglés), para llevar a cabo ensayos preliminares de biocompatibilidad se realizó en el Laboratorio de Terapia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y en Laboratorio de Inmunología Traslacional, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo (Santiago, Chile). El desempeño biológico de los andamios y constructos (bioimpresos) detallado en las secciones 3.8.2 a 3.8.4, se desarrolló en el grupo *Biomaterials for Regenerative Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC)*, Barcelona, España. Para estos ensayos se utilizaron hADMSCs proporcionadas por el *Texas A&M Health Science Center College of Medicine, Institute for Regenerative Medicine at Scott & White*, USA (NIH Grant P40RR017447).

3.12.1. Aislación, caracterización de hMSCs y ensayo MTT

Se realizó un estudio preliminar de proliferación celular mediante el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para llevar a cabo este ensayo se aisló hADMSCs desde tejido adiposo lipoaspirado.¹⁰² En resumen, 15 g de tejido

adiposo fue lavado con PBS (tres veces) y luego fue digerido en 50 mL de colagenasa al 0.1 % (Gibco) durante 1.5 h a 37 °C bajo agitación continua. Después del procedimiento de digestión, la muestra fue centrifugada a 600 g durante 20 min para separar el *pellet* con la fracción vascular estromal (SVF, por su sigla en inglés). El *pellet* obtenido es resuspendido en el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12, Gibco) suplementado con 10 % FBS, gentamicina 100 µg mL⁻¹ (Laboratorio Chile), ciprofloxacina 5 µg mL⁻¹ (Laboratorio Chile) y ketoconazol 5 µg mL⁻¹ (Laboratorio Pasteur). Las células son expandidas a 37 °C y atmósfera con 5 % CO₂, durante la expansión el medio es reemplazado cada 3 días. Las células del pasaje 3 a 4 se utilizaron para la caracterización mediante citometría de flujo y el ensayo MTT.

El inmunofenotipo de las células aislada se caracterizó mediante citometría de flujo. Brevemente, 1 · 10⁶ células del pasaje 3 son cultivadas con anticuerpos monoclonales específicos individuales, conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) en 250 µL de PBS durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron CD29 (BD Pharmingen), CD44 (Invitrogen), CD73 (BD Pharmingen), CD90 (BD Pharmingen), CD105 (Invitrogen), CD11b (BD Pharmingen), CD19 (Invitrogen), CD34 (Immunotech, Beckman Coulter), CD45 (Immunotech, Beckman Coulter) and HLA-DR (Invitrogen). Luego las células son diluidas en 4 mL de PBS, centrifugadas y resuspendidas en 600 µL de PBS-formaldehído 2 %. La adquisición y análisis del experimento fueron realizado en un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman Coulter) utilizando System II Software (Beckman Coulter). Los controles de isotipo utilizados fueron los anticuerpos monoclonales inmunoglobulina G (IgG1)-FITC e IgG1-PI (BD Pharmingen). Para el análisis y procesado de los datos se utilizó el *software* FCS Express 6 (De Novo Software).

El ensayo MTT fue realizado ubicando andamios liofilizados, cortados con un *punch* para biopsia (discos de 5 mm de diámetro), dentro de SPLInsertsTM (poros de membrana de 8 µm) en placas de cultivo de 12 pocillos. Los andamios impresos fueron esterilizados con etanol absoluto durante 1 h, lavados con PBS (tres veces) e irradiados con luz UV-C durante 1 h. Se sembraron 8000 células /pocillo sobre los andamios y control. Las células fueron cultivadas en DMEM/F12 suplementado y luego se llevó a cabo el protocolo general del ensayo MTT a diferentes tiempos. Para esto, el medio de cultivo fue aspirado y los andamios son lavados con PBS, luego se adiciona 200 µL de solución de MTT 5 µg mL⁻¹ (USB Corporation) suplementada con 10 % FBS y se cultivó durante 2.5 h a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO₂. Cuando el tiempo de incubación ha finalizado, el medio es aspirado y los cristales de formazán formados son disueltos con 200 µL de isopropanol. La absorbancia de esta disolución es medida a 540 nm en un lector de placas Titertek® Multiskan® MCC/340 MKII (Lab Systems).

3.12.2. Ensayo alamarBlueTM

La evaluación biológica de los andamios mediante ensayo *alamarBlue*TM, tinción fluorescente, ensayo *Live/Dead* e inmunofluorescencia, se realizó utilizando hADMSCs proporcionadas por el *Texas A&M Health Science Center College of Medicine Institute for Regenerative Medicine at Scott & White* (NIH Grant P40RR017447) y fueron utilizada sin caracterización adicional. Estas células fueron expandidas siguiendo el protocolo del proveedor: las hADMSCs se cultivaron a baja densidad de siembra (150 células /cm²) en Medio de Cultivo Acondicionado (MCA), compuesto por *Minimum Essential Medium*

Alpha (MEM α , Invitrogen) suplementado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen), penicilina 100 U/mL (Invitrogen), estreptomina 100 U/mL y Hyclone FBS 16 % (GE Healthcare). Durante la expansión los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5 % y el medio fue cambiado cada tres días.

Para llevar a cabo el ensayo de proliferación celular, se ubicó los andamios liofilizados (discos de 7 mm de diámetro) en placas Ultra-Low Attachment Surface de 24 pocillos (Corning) y se esterilizaron mediante la metodología descrita anteriormente. Se sembró las hADMSCs (pasaje 9, 40000 células/andamio) sobre cada andamio y se cultivó en 1 mL de MCA llevando a cabo el protocolo del ensayo a diferentes tiempos. Para esto, se agregó 100 μ L de solución de *alamarBlue*TM a cada pocillo y se cultivó durante 2 h a 37 °C y atmósfera con CO₂ al 5 %. Una vez alcanzado el tiempo de incubación, se transfirió una alícuota de 100 μ L a una placa de 96 pocillos y se midió la intensidad de fluorescencia a 590 nm aplicando una longitud de onda de excitación de 530 nm en un lector de placas multimodo Infinite® 200 PRO (TECAN). Cada muestra fue medida en triplicado y las intensidades de fluorescencia fueron corregidas restando el blanco sin células respectivo.

3.12.3. Tinción fluorescente y ensayo *Live/Dead*

Se estudió la proliferación, viabilidad, morfología y adhesión de hADMSCs en los andamios mediante microscopía de fluorescencia. El análisis de adhesión, proliferación y morfología celular se realizó mediante tinción del núcleo y actina F con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Life Technologies) y faloidina-FITC (o faloidina-TRITC, Life Technologies), respectivamente. Transcurrido un tiempo definido de cultivo de hADMSCs en los andamios (siembra de 40000 células/andamio) o en los constructos bioimpresos, las células son fijadas con paraformaldehído al 4 % (Electron Microscopy Sciences) y lavadas con PBS. Los filamentos de actina en el citoesqueleto fueron teñidos con faloidina-FITC o faloidina-TRITC a dilución 1/200 (300 unidades mL⁻¹) en PBS-Glicina (PBS-Gly; 15 g de glicina/100 mL de PBS, Sigma-Aldrich), incubado por 30 minutos a temperatura ambiente y lavado con PBS-Gly (tres veces por 5 minutos). Luego, la tinción de núcleos fue llevada a cabo mediante incubación con DAPI 2 μ g mL⁻¹ en PBS-Gly durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavados con PBS-Gly. Finalmente, las muestras son observadas en un microscopio de fluorescencia (cada una en triplicado).

La vitalidad de las hADMSCs adheridas a los andamios o embebidas en los constructos fue estudiada *in vitro* mediante un ensayo de tinción *Live/Dead* utilizando calceína-AM (Invitrogen) para identificar células vivas y yoduro de propidio (Invitrogen) para teñir células muertas. La tinción de las hADMSCs se llevó a cabo aspirando el medio de cultivo y lavando los andamios/constructos con *buffer Dulbecco's* PBS (DPBS, Invitrogen). Luego, los andamios (o constructos) fueron incubados en calceína-AM 5 mM/yoduro de propidio 5 mM en DPBS durante 20 minutos a 37 °C y atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron lavadas con DPBS y observadas en un microscopio de fluorescencia (cada muestra en triplicado).

3.12.4. Tinción de inmunofluorescencia

La tinción de inmunofluorescencia de los marcadores condrogénicos colágeno tipo II (COLLII), agregano (ACAN) y SOX 9 fue realizada a las hADMSCs cultivadas en los andamios y en constructos después de diferentes tiempos de cultivo en MCA. La

inmunotinción se llevó a cabo de la siguiente manera, los andamios/constructos fueron lavados dos veces en PBS a 37 °C, fijados en paraformaldehído al 4% por 10 minutos y lavados nuevamente en PBS. Las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 0.25 % en PBS-Gly por 10 minutos, luego se lavó tres veces en PBS-Gly. Los andamios/constructos fueron tratados con solución *buffer* bloqueante (albúmina de suero bovino 6 % en PBS-Gly, Sigma-Aldrich) durante 45 minutos a temperatura ambiente y posteriormente incubado toda la noche a 4 °C con anticuerpo policlonal de conejo anti-COLLII (ab34712, dilución 1/100), anti-ACAN (ab36861, dilución 1/100) o anti-SOX 9 (ab3697, dilución 1:100), (Abcam). Después de lavar tres veces en PBS-Gly, los andamios o constructos fueron incubados en presencia del anticuerpo secundario de cabra Alexa Fluor 488 anti-conejo IgG H&L (ab150077, dilución 1/100, Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos y filamentos de actina en las células fueron teñidos utilizando DAPI y faloidina-TRITC, respectivamente, empleando el procedimiento anteriormente descrito. Se utilizaron andamios/constructos incubados sin anticuerpos primarios y sin células para realizar controles negativos y blancos, respectivamente.

3.12.5. Análisis de expresión génica

Para determinar los niveles de expresión de genes condrogénicos, se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante reacción en cadena de polimerasa transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR). Se estudió la expresión génica de colágeno tipo I (COLL I), colágeno tipo II (COLL II), agrecano (ACAN) y SOX 9 en células sembradas en los distintos andamios 3D impresos y a distintos tiempos de cultivo post bioimpresión 3D. Se extrajo y purificó el ácido ribonucleico (ARN) total utilizando RNeasy® Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Anexo). La concentración de ARN total fue determinada fotométricamente en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, midiendo la absorbancia a 260 nm a cada muestra (en triplicado). El ARN total obtenido de cada muestra fue retrotranscrito a ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) utilizando RT2 First Strand Kit (Qiagen), de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Anexo). Se sintetizó el cADN de cada muestra a partir de 100 ng del ARN correspondiente, utilizando un equipo ThermoMixer (Eppendorf) para el control de la temperatura. Una vez sintetizado el cADN de cada muestra, se realizó la reacción de PCR utilizando RT² SYBR® Green/ROX™ Mastermix (Qiagen), de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Anexo). Cada reacción de amplificación se realizó por triplicado mezclando 12.5 µL de RT² SYBR® Green/ROX™ Mastermix con 1 µL de la solución de cADN sintetizado, 1 µL de solución que contiene cebadores (*primers*) 10 µM y 10.5 µL de agua libre de nucleasa. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 2. Todas las reacciones se ubicaron en placas MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems), selladas con MicroAmp™ Optical Adhesive Films y se procedió a iniciar las reacciones de amplificación en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los parámetros del termociclador se configuraron en 10 minutos a 95 °C (activación), seguido de 40 ciclos consistente en 15 s a 95 °C (desnaturalización) y 60 s a 60 °C (extensión). Para cada muestra/condición se empleó el gen de actina β para la normalización de los datos (*housekeeping gene*, HKG). Se realizó un control positivo por placa utilizando Human XpressRef Universal Total RNA (Qiagen). Se realizaron controles negativos sin cebador (*non-template control*) para controlar contaminación en el muestreo y sin retrotranscribir (*no reverse transcription control*) para controlar contaminación por ADN genómico. Para analizar los resultados se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde C_t es el ciclo umbral de amplificación.¹⁰³

Tabla 2. Cebadores y HKG utilizados en el estudio mediante RT-qPCR

Cebador	Secuencia	Proveedor
Human COL1a1 <i>foward</i>	5'- AGACGGGAGTTTCTCCTCGG-3'	Merck (Cod. SY181118860-070 8812221733-000010 HA12359033-001)
Human COL1a1 <i>reverse</i>	5'- CGGAGGTCCACAAAGCTGAA-3'	Merck (Cod. SY181118860-071 8812221733-000020 HA12359034-001)
Human COL2a1 <i>foward</i>	5'-ATGACAATCTCGCTCCCAAC-3'	Merck (Cod. SY181118860-072 8812221733-000030 HA12359035-001)
Human COL2a1 <i>reverse</i>	5'-CTTCAGGGCAGTGTACGTGA-3'	Merck (Cod. SY181118860-073 8812221733-000040 HA12359036-001)
Human ACAN <i>foward</i>	5'-TGGTGATGATCTGGCACGAC-3'	Merck (Cod. SY181118860-078 8812221733-000110 HA12359043-001)
Human ACAN <i>reverse</i>	5'-CGTTTGTAGGTGGTGGCTGT-3'	Merck (Cod. SY181118860-079 8812221733-000120 HA12359044-001)
Human SOX 9 <i>foward</i>	5'-CAGACGCACATCTCCCCCAA-3'	Merck (Cod. SY181118860-076 8812221733-000090 HA12359041-001)
Human SOX 9 <i>reverse</i>	5'-GCTTCAGGTCAGCCTTGCC-3'	Merck (Cod. SY181118860-077 8812221733-000100 HA12359042-001)
Human ACTB	<i>Housekeeping gene</i>	Quiagen (Cod. PPH00073G-200 201708080124)

3.13. Análisis estadístico

Los datos graficados se expresan como la media aritmética \pm desviación estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba posterior de Tukey para obtener la significancia estadística entre los grupos, utilizando OriginPro 8.6 (Origin Lab) y Prism 6 (GraphPad).

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de biopolímeros modificados

Los tres biopolímeros utilizados (ALG, SC y GEL) fueron modificados con grupos metacrililoilo con el propósito de obtener un alto grado de funcionalización con grupos foto-polimerizables, de acuerdo con lo reportado en la literatura reciente.^{24,36} La metacrilación de los biopolímeros fue confirmada y cuantificada mediante espectroscopía ATR-FTIR y ¹H RMN. En la Figura 9 se muestra los espectrogramas ATR-FTIR de los biopolímeros antes y después de la metacrilación, donde es posible observar un hombro en el espectro de ALG-MA a 1707 cm⁻¹ (*stretching* de enlaces C=O) y un desplazamiento hipsocrómico de la banda del carbonilo a 1636 cm⁻¹ en SC-MA debido a la incorporación de grupos metacrilato de 2-amidoetilo. En adición, ambos polisacáridos (con y sin metacrilar) exhiben sus bandas características de vibración en modo *stretching* de enlaces O-H (alrededor de 3300 cm⁻¹), enlaces C_{sp3}-H (alrededor de 2900 cm⁻¹), enlaces C=O (alrededor de 1600 cm⁻¹) y enlaces C-O (alrededor de 1020 cm⁻¹). El espectrograma ATR-FTIR de GEL y GEL-MA no muestra mayores diferencias, en ambos espectrogramas se observan las bandas de vibración en modo *stretching* de enlaces O-H y N-H (alrededor de 3290 cm⁻¹), enlaces C_{sp2}-H (alrededor de 3070 cm⁻¹), enlaces C_{sp3}-H (alrededor de 2940 cm⁻¹), enlaces C=O (alrededor de 1630 cm⁻¹) y enlaces C=C (alrededor de 1530 cm⁻¹). Las bandas de los grupos metacrililoilo en GEL-MA probablemente están apantallados por la intensa señal de las bandas propias de GEL (coincidentes con las bandas de enlaces C_{sp3}-H y C=O).

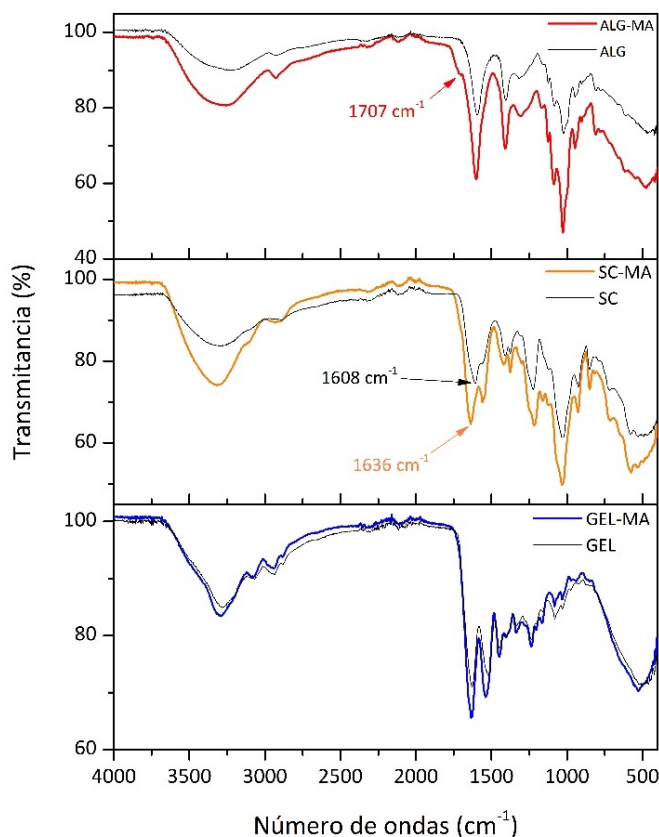


Figura 9. Espectrogramas ATR-FTIR de los biopolímeros antes y después de la metacrilación.

El análisis posterior mediante espectroscopía ^1H RMN confirmó la funcionalización de los tres biopolímeros (Figura 10). Los espectros de ALG-MA y SC-MA exhiben los dobletes característicos de protones vinílicos a 5.75 y 6.14 ppm, multipletes de protones metilénicos a 3.39 y 3.55 ppm y singletes de protones metílicos a 1.94 ppm; correspondientes a las funcionalidades de metacrilato de 2-amidoetil. El espectro ^1H RMN de GEL-MA muestra picos de protones vinílicos de grupos metacrilamida a 5.44 y 5.67 ppm, un doblete adicional de protones vinílicos a 5.75 y 6.14 ppm correspondiente a grupos metacrilato y el singlete de protones metílicos a 1.94 ppm.

El exceso molar de AMA utilizado da lugar reacciones de metacrilación secundaria en grupos hidroxilos presentes en GEL, obteniendo así una pequeña proporción de grupos metacrilato adicionales a los de metacrilamida en las cadenas polipeptídicas.¹⁰⁴ El grado de metacrilación de los biopolímeros fue determinado a partir de sus espectros ^1H RMN mediante la integración de los respectivos picos afectados por la modificación química en los biopolímeros, antes y después de la metacrilación.^{105–108} La Figura 11a muestra el espectro ^1H RMN de ALG precursor donde el desplazamiento químico de protones de ácido L-glucurónico (G) unido al carbono 1 (pico de referencia) y 5 (carbono anomérico) son denotados G1 y G5 respectivamente. El átomo de hidrógeno unido al carbono 5 de ácido D-manurónico(M) es rotulado como pico M5, el cual está sobrepuesto con M5 en el espectro. El grado de metacrilación de ALG-MA fue determinado por el decremento de la integral de los picos G5 y M5. La Figura 11b muestra los valores de integración para los picos G5 (0.56) y M5 (1.62) en el espectro de ALG-MA (utilizando la integral del pico G1= 1, como referencia).

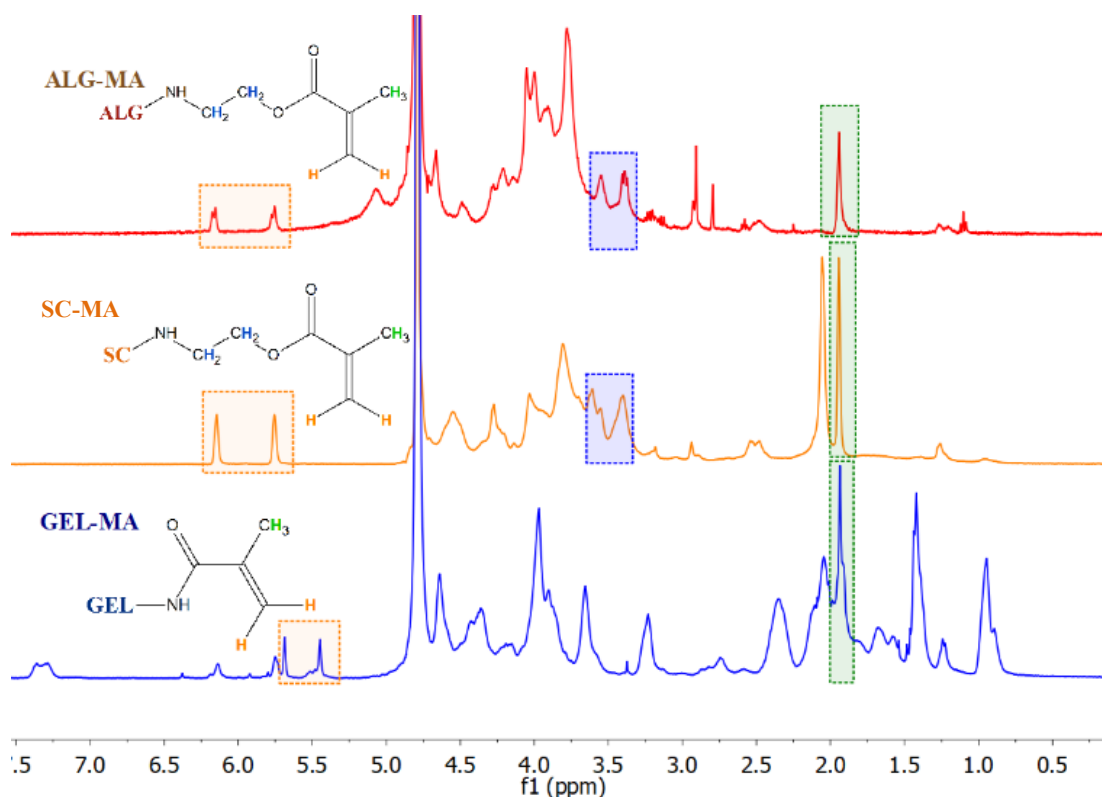


Figura 10. Espectrogramas ^1H NMR de los biopolímeros metacrilados. Los picos característicos de los grupos metacrilato se destacan encerrados en cuadrados.

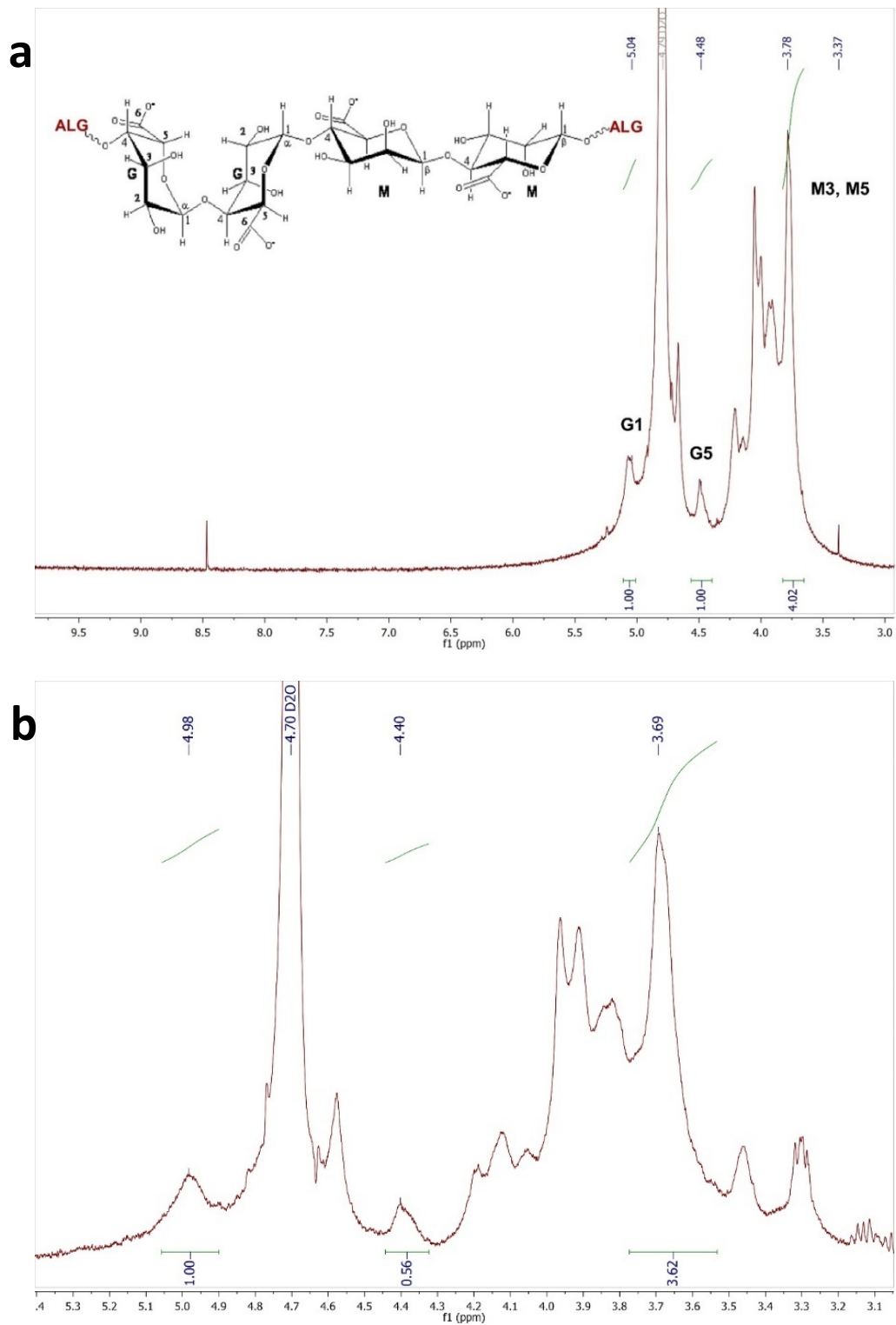


Figura 11. Espectrograma ^1H NMR de alginato comercial utilizado para la obtención de ALG-MA, donde se muestra una ilustración representativa de los bloques de ácido L-gulurónico (G) y ácido D-manurónico (M) presentes en la estructura química de este polímero (a). Integración de los picos G5 y M5 en ALG-MA para el cálculo del grado de metacrilación (b).

El grado de metacrilación en el epímero M fue calculado mediante la sustracción de la integral del átomo de hidrógeno unido al carbono 3 de ácido D-manurónico que es rotulado como pico M3 en la Figura 11a (integral pico M5 = 3.62 – 2 = 1.62) del pico a 3.69 ppm. De esta manera, el grado de funcionalización de ALG-MA se calcula como:

$$\begin{aligned} \%Metacrilación\ ALG - MA &= \left(1 - \frac{(G5 + M5)ALG - MA}{(G5 + M5)ALG}\right) \times 100 \\ &= \left(1 - \frac{(0.56 + 1.62)}{(1 + 2)}\right) \times 100 = 27\% \end{aligned}$$

En la Figura 12a se muestra el espectro ¹H RMN de SC, donde el pico a 2.06 ppm es utilizado como referencia para la integración de las señales y corresponde a los protones metílicos de los grupos N-acetilo del sacárido de galactosamina sulfatada en el monómero de SC. La Figura 12b muestra el espectro de SC-MA en la región de los protones metílicos, el grado de metacrilación fue determinado como la razón entre las integrales de los protones metílicos de los grupos metacrilato (1.95 ppm) y los protones metílicos de los grupos N-acetilo (2.06 ppm), y es dado por:

$$\%Metacrilación\ SC - MA = \left(\frac{1.5}{3}\right) \times 100 = 50\%$$

En el caso del espectro ¹H RMN de GEL (Figura 13a), la señal de los protones aromáticos en los segmentos de fenilalanina de las cadenas polipeptídica (cuadrado verde en Figura 13a) fue usada como referencia para la integración de los picos. Para calcular el grado de metacrilación en GEL-MA, se determinó la disminución del valor de la integral de protones metilénicos unidos a átomos de carbono con grupos amino libres en los segmentos del aminoácido lisina presente en GEL (*I*_{Lys}, cuadro rojo en Figura 13a). En la Figura 13b-c se muestran los espectros ¹H RMN de GEL (rojo) y GEL-MA (azul) sobrepuestos y acotados a las regiones de interés. Es posible observar los picos de los protones de los grupos amino libres a 6.80 y 7.08 ppm en el espectro de GEL (Figura 13b), los cuales desaparecen completamente después de la metacrilación. Por otro lado, el pico a 3.02 ppm es completamente desplazado a campo bajo en el espectro de GEL-MA (Figura 13c). Estos resultados indican que se produjo la metacrilación de todos los grupos amino disponibles de los segmentos de lisina en GEL, de acuerdo con la ecuación:

$$\begin{aligned} \%Metacrilación\ GEL - MA &= \left(1 - \frac{I_{Lys}^{3.02\ ppm}\ GEL - MA}{I_{Lys}^{3.02\ ppm}\ GEL}\right) \times 100 = \left(1 - \frac{0}{5.76}\right) \times 100 \\ &= 100\% \end{aligned}$$

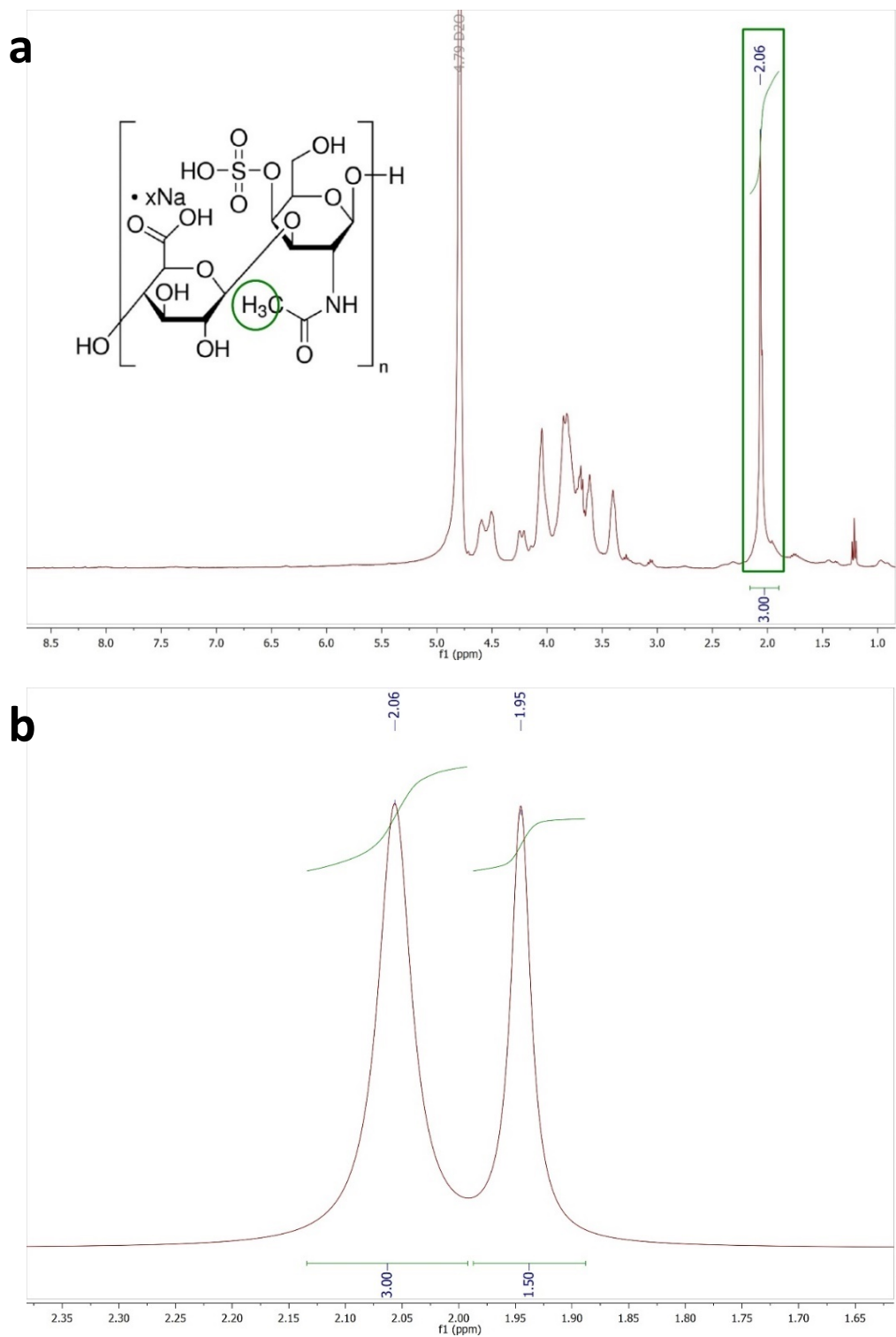


Figura 12. Espectrograma ^1H NMR de SC comercial utilizado para la obtención de SC-MA, donde se destaca el pico correspondiente a los protones metílicos de los grupos N-aceto del biopolímero (**a**). Detalle de espectrograma ^1H NMR de SC-MA, donde se muestra las integrales de los protones metílicos de los grupos N-aceto y metacrilatos del biopolímero modificado (**b**).

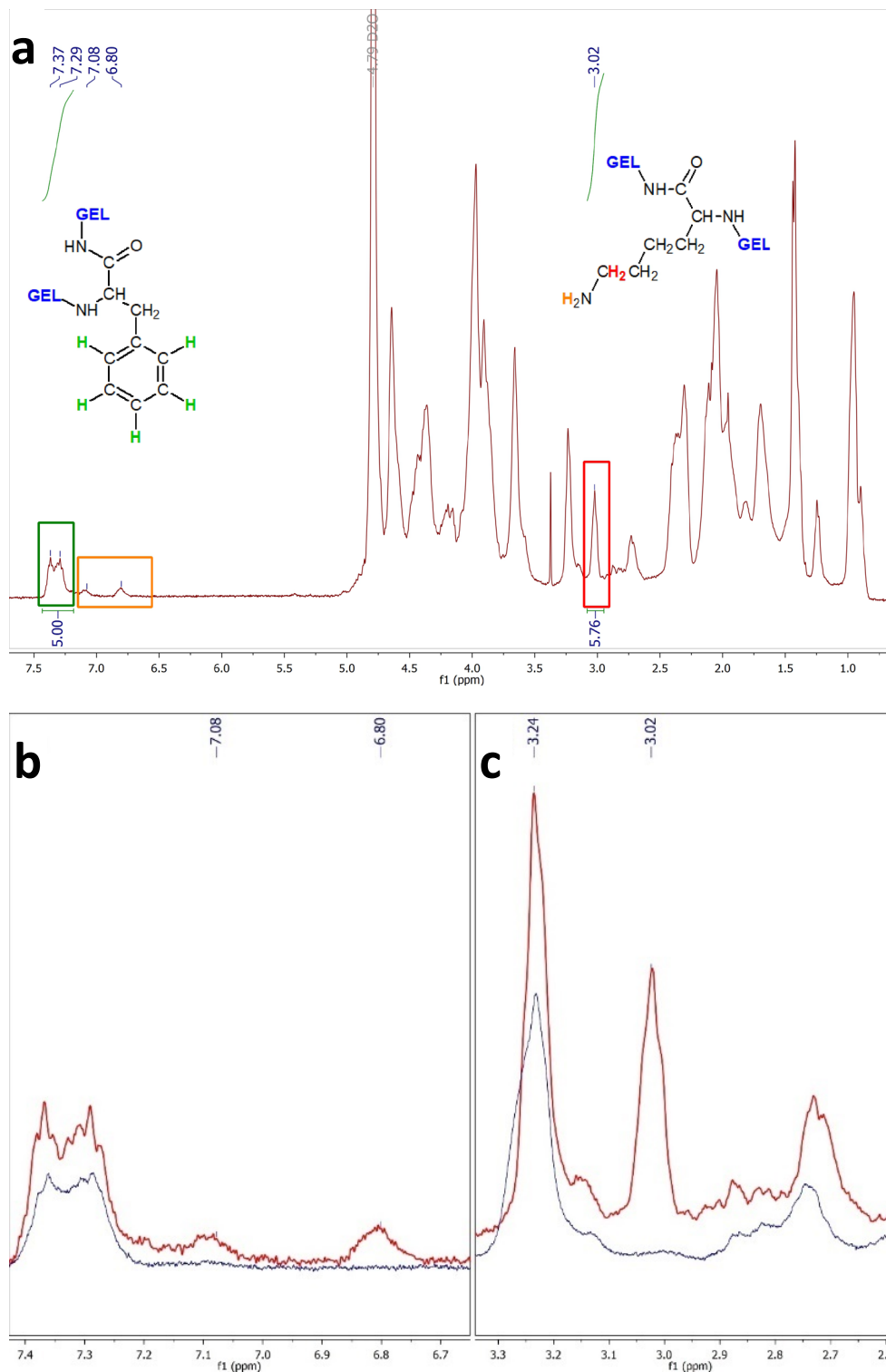


Figura 13. Espectrograma ¹H NMR de gelatina comercial utilizada para la obtención de GEL-MA, donde se muestra una ilustración representativa de los segmentos de los aminoácidos fenilalanina (izquierda) y lisina (derecha). Los protones aromáticos de la fenilalanina están destacados en verde, los protones metilénicos y de los grupos amino de la lisina se destacan en rojo y anaranjado respectivamente (a). Espectrogramas ¹H NMR superpuestos de GEL y GEL-MA, donde se muestra la desaparición de las señales correspondientes a protones de grupos amino (b) y el desplazamiento de la señal de protones metilénicos adyacente al grupo amino (c), de los segmentos de lisina.

Tanto los resultados de los análisis de ATR/FTIR como los obtenidos mediante estudios de ^1H RMN concuerdan con los expuestos en distintos trabajos en donde se funcionalizó ALG, SC y GEL con grupos metacrilato. ^{104,107-109} Los tres biopolímeros se modificaron con un alto grado de metacrilación relativo a grupos carboxilatos en el caso de ALG-MA y SC-MA (27 % y 50 % respectivamente) y respecto a grupos amino libres en el caso de GEL (100 %). El menor grado de metacrilación en ALG-MA podría deberse a la menor reactividad de los carboxilatos de los bloques M. No obstante, los biopolímeros metacrilados obtenidos fueron capaces de foto-entrecruzarse covalentemente al ser irradiados con luz UV en presencia de PI 5 mg mL^{-1} . En la Figura 14 se observa un ensayo de tubo invertido que evidencia el incremento de la viscosidad después del foto-entrecruzamiento que permite bioconjugarse las cadenas de ALG con SC y GEL.

4.2. Caracterización de óxido de grafeno

La síntesis de GO, llevada a cabo mediante el método modificado de Hummers, se confirmó mediante ATR-FTIR, UV-Vis, DRX, TEM y POM. En la Figura 15 se muestra el análisis espectroscópico en estado sólido del GO sintetizado, donde el espectrograma ATR-FTIR (Figura 15a) muestra las bandas típicas de grupos funcionales oxidados: banda ancha del *stretching* de enlaces O-H en torno a 3200 cm^{-1} , *stretching* de carbonilos a 1712 cm^{-1} , *stretching* de enlaces dobles C=C del plano basal aromático a 1618 cm^{-1} y *stretching* de enlaces C-O a 1040 cm^{-1} . En contraste, en el espectro del precursor grafito (línea punteada) destacan la banda correspondiente a vibraciones en modo *stretching* de enlaces dobles C=C a 1691 cm^{-1} y una banda de baja intensidad correspondiente a *stretching* de enlaces $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ (alrededor de 2926 cm^{-1}) atribuible a defectos cristalinos. Por otra parte, el espectro UV-Vis de una suspensión en agua del GO sintetizado muestra un máximo de absorción a 230 nm, correspondiente a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ en el plano basal aromático, y un hombro alrededor de 300 nm consistente con transiciones $n \rightarrow \pi^*$ debido a la presencia de átomos de oxígeno en los grupos funcionales del GO (Figura 15b). La Figura 15c muestra las bandas características de GO en espectroscopía Raman: la banda G está asociada al modo vibracional de tipo *stretching* de la estructura gráfica planar de átomos de carbono con hibridación sp^2 , por otro lado, la banda D está asociada a la presencia de defectos que cambian la hibridación de los átomos de carbono a sp^3 . La incorporación de grupos funcionales en el GO durante el proceso de oxidación incrementa considerablemente la cantidad de defectos, mostrando una razón de intensidades de las bandas D y G ($I_{\text{D}}/I_{\text{G}}$) 8.4 veces mayor que el grafito. El estudio microestructural confirmó la obtención de GO con ordenamiento en pocas capas. En la Figura 16 se muestran los patrones de DRX de



Figura 14. Prueba del tubo invertido que demuestra la formación del hidrogel mediante fotoentrecruzamiento covalente de los biopolímeros metacrilados.

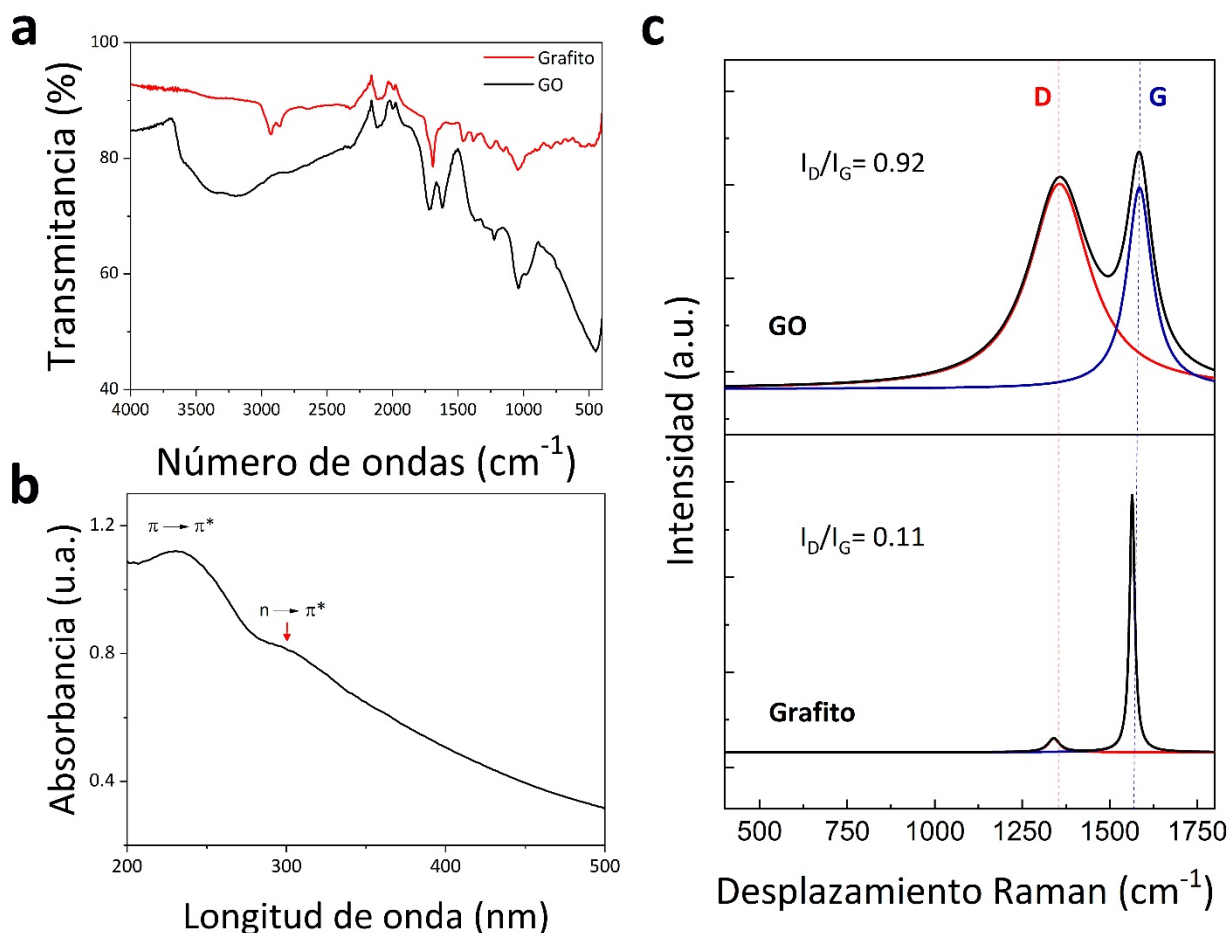


Figura 15. Caracterización espectroscópica del GO sintetizado: espectrograma ATR-FTIR de GO (línea negra) y del precursor grafito (línea roja) (a). Espectrograma UV-VIS de GO medido a una suspensión acuosa con una concentración de 0.05 mg mL^{-1} . Espectrograma Raman de GO y grafito, donde se muestran las bandas características ajustadas a una función Lorentziana y se indica las respectivas razones de intensidades de las bandas D (línea roja) y G (línea azul) (c).

grafito y GO, demostrando que la oxidación y el proceso de exfoliación durante la síntesis produce un incremento de la distancia entre capas (d). Mientras el grafito presenta una intensa reflexión característica a 26.38° (2θ , $d = 0.34 \text{ nm}$), el difractograma de GO exhibe un pico de baja intensidad a 12.37° (2θ , $d = 0.71 \text{ nm}$) correspondiente a las reflexiones del plano 001 producido por pocas capas de GO. Cabe destacar la ausencia de reflexiones atribuibles a estructuras gráficas residuales en el GO sintetizado. Lo anterior se corrobora mediante las imágenes TEM de la Figura 17a, donde se puede apreciar la morfología laminar 2D del GO obtenido. Basado en estos resultados, es posible concluir que el proceso de oxidación del grafito y posterior exfoliación utilizado permitió obtener GO en pocas capas, mediante la adición de grupos funcionales ricos en oxígeno y disrumpiendo el orden interlaminar. La observación de las nanopartículas de GO mediante FE-SEM, permitió determinar la distribución de tamaño lateral por medio de análisis de las imágenes. La Figura 17b muestra el histograma de distribución de tamaño lateral de GO con una imagen FE-SEM representativa de las nanopartículas de GO depositadas sobre una oblea de silicio (*inset*). El tamaño lateral de GO se ajusta a una distribución normal centrada en $1 \mu\text{m}$.

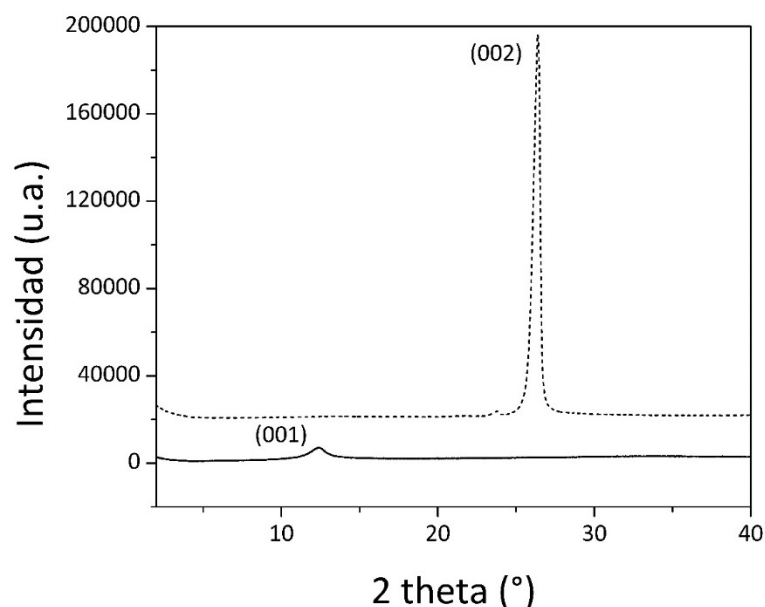


Figura 16. Difractogramas de polvo de GO (línea sólida) y del precursor grafito (línea punteada).

Las propiedades líquido-cristalinas (LC) de GO en suspensiones acuosas son una característica inexplorada en ITMR, a pesar del alto potencial para inducir cierto grado de ordenamiento en biomateriales.^{110,111} La Figura 17c-f muestra la naturaleza LC del GO sintetizado, analizada a través de POM. Se observó una textura birrefringente en una suspensión acuosa con 10 mg mL^{-1} de GO (Figura 17c-d) y en una hojuela humectada de GO (Figura 17e-f) cuando las muestras fueron observadas entre polarizador/analizador cruzados en 90° (Figura 17d y 17f). Esta birrefringencia es evidencia de ordenamiento debido a la formación de una mesofase del tipo nemática (orientación de preferencia) de origen liotrópico (interacción con el solvente). En el Video A1 (apéndice) se exhibe la naturaleza fluida y ordenada (birrefringencia observada con

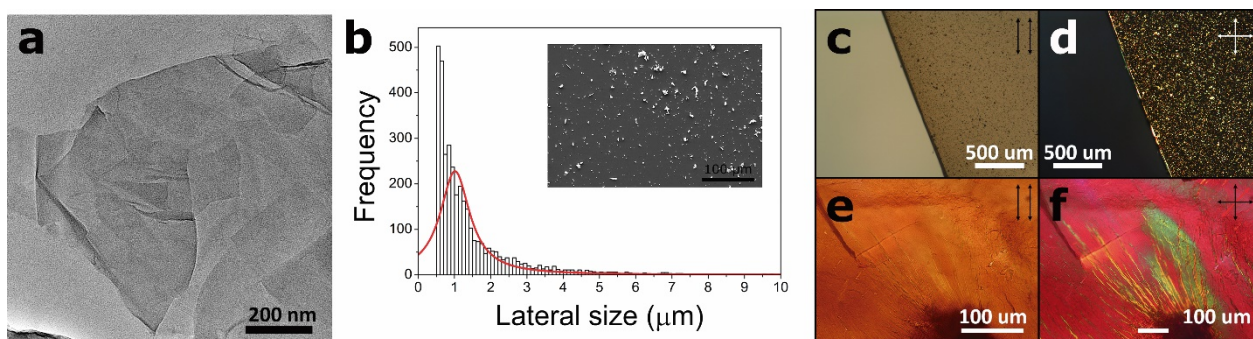


Figura 17. Análisis microscópico del GO sintetizado. Microfotografía TEM de láminas de GO (a). Distribución de tamaño lateral de las láminas de GO, analizadas mediante FE-SEM (imagen representativa de nanopartículas de GO *inset*) (b). Propiedades líquido-cristalinas estudiada mediante POM, en una suspensión acuosa con $\sim 10 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO observada entre filtros polarizador/analizador paralelos (c) y cruzados (d). El orden líquido cristalino se mantiene al formar hojuelas humectadas de GO, lo cual se observa en la muestra entre polarizador/analizador paralelos (e) y cruzados (más un filtro de retardo de onda completa) (f).

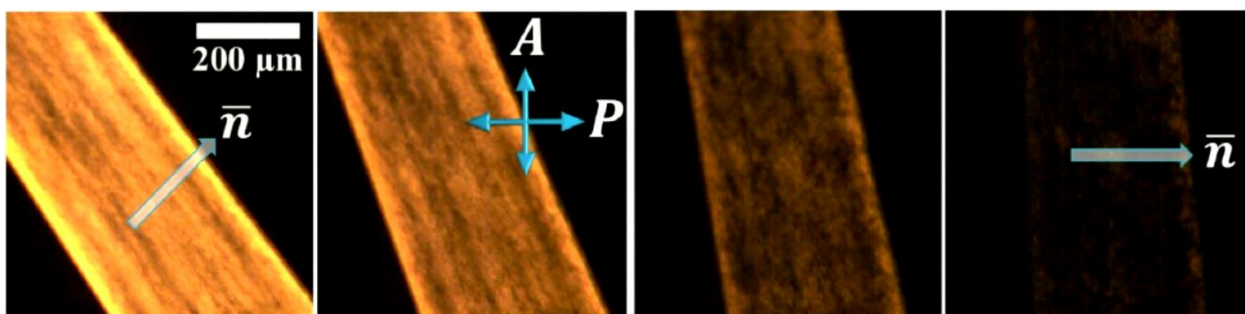


Figura 18. Alineamiento líquido cristalino de una suspensión de GO inducido por confinamiento en un microcanal observado a través de POM con polarizador (P)/analizador (A) cruzados. El estado claro y oscuro ocurre con una periodicidad de 90° , con una máxima intensidad de brillo por refringencia a 45° y el vector director de la mesofase nemática (\bar{n}) ortogonal al microcanal(adaptado de referencia 112).

polarizador/analizador cruzados) de este tipo de cristal líquido. El orden LC de GO en suspensiones acuosa permite obtener estructuras anisotrópicas como hojuelas 2D o papeles, como los mostrados en la Figura 17e-f; y alineamientos 1D bajo determinadas condiciones (aplicación de un campo magnético, esfuerzo mecánico, etc.), tal como se observa en los reportes mostrados en la revisión de Liu *et al.* (Figura 18), donde el confinamiento de una suspensión acuosa de GO en un microcanal induce la orientación de la mesofase nemática a lo largo del microcanal.¹¹²

4.3. Fabricación de andamios mediante impresión 3D

Para realizar la fabricación de andamios de hidrogeles utilizando un equipo de impresión 3D, se utilizaron tres formulaciones de tinta (ACG, ACG/GO0.1 y ACG/GO1, tal como se detalla en la Tabla 3) para estudiar el efecto del GO en este proceso. La concentración de biopolímeros empleada (ALG-MA, SC-MA y GEL-MA) fue una proporción en peso de 1:1:1, se seleccionó esta proporción de concentraciones considerando la capacidad de impresión de las tintas, y trabajos previos que indican que en sistemas binarios ALG-GEL esta proporción ($\sim 1:1$) han mostrado una adhesión y proliferación celular mejorada.^{31,36,113} Además, bajo aquellas

Tabla 3. Composición de tintas para impresión 3D (mg mL^{-1}).

	ACG	ACG/GO0.1	ACG/GO1
ALG	10	10	10
ALG-MA	6	6	6
SC-MA	6	6	6
GEL-MA	6	6	6
GO	0	0.1	1
PI	0.5	0.5	0.5

condiciones, la proporción de SC respecto a ALG y otros polímeros bioconjugados está en el rango condroinductivo (25-75 %).^{36,48,49,114} Adicionalmente, se agregó ALG puro a cada formulación de tinta debido a que la metacrilación en ALG-MA reduce la cantidad de sitios entrecruzables y, en consecuencia, el entrecruzamiento ionotrópico con calcio(II) es menos eficiente.¹¹⁵

Mediante el uso del *software* de dibujo 3D Materialise Magics, se diseñó un andamio de 30x30x1 mm³ (largo x ancho x alto) y el archivo STL obtenido fue procesado con Perfactory® Software Suite para dividir la estructura diseñada en las cuatro capas (en el eje z) que serán impresas posteriormente. Finalmente, se configuró un patrón interno de impresión con forma de malla cuadrícula con un espaciado de hebras de 1.5 mm, utilizando para esto el *software* VisualMachine que controla la 3D Bioplotter. Con este diseño se obtienen andamios porosos que permiten la penetración y proliferación celular. Debido a la heterogeneidad (peso molecular y composición química) de los biopolímeros, tanto la concentración de los polímeros como los parámetros de impresión se optimizan de acuerdo con pruebas de impresión preliminares. La impresión 3D de cada andamio se realiza cargando las tintas en cartuchos de polietileno con puntas tipo aguja de calibre 25 (250 µm de diámetro interno). El cartucho se ubica en el cabezal de impresión a 5 °C y se imprimió los andamios mediante micro-extrusión sobre una placa Petri con una solución de cloruro de calcio 100 mM para efectuar el entrecruzamiento ionotrópico de cadenas de alginato. La plataforma de impresión se ajusta a 2 °C para favorecer la gelificación termotrópica de los segmentos de gelatina. Cuando se ha impreso algunas capas del diseño, se adiciona más solución entrecruzante de calcio(II) para asegurar el entrecruzamiento de ALG y ALG-MA. Los parámetros óptimos de impresión utilizados se muestran en la Tabla 4 y el proceso de impresión 3D de andamios se muestra en el Video A2 (apéndice). Los andamios 3D impresos luego son irradiados con luz UV para realizar el entrecruzamiento covalente secundario (bioconjugación), lavados posteriormente con agua desionizada y liofilizados. La Figura 19 muestra imágenes representativas de los andamios en distintas etapas desde el andamio recién impreso (Figura 19a), liofilizado (Figura 19b) hasta su rehidratación para los ensayos biológicos (Figura 19c).

Tabla 4. Parámetros óptimos de impresión 3D de andamios.

Parámetro	Valor
Temperatura tinta	5 °C
Temperatura plataforma de impresión	2 °C
Presión de impresión	1.0 bar
Velocidad de impresión	50 mm/s
<i>PreFlow</i>	0.2-0.8 s
<i>PostFlow</i>	0.1-0.4 s
Tiempo de espera entre capas	10 s

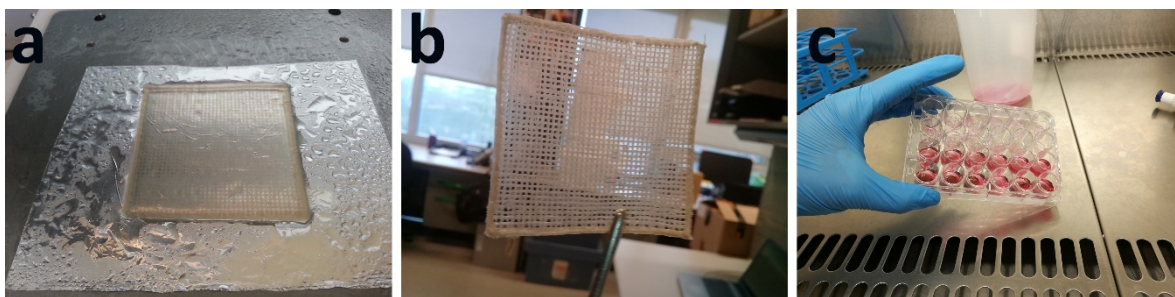


Figura 19. Imágenes representativas de andamios en distintas etapas de estudio: andamio ACG/GO01 recién impreso y fotoentrecruzado (a), el mismo andamio anterior después de ser liofilizado (b) y andamios rehidratados con medio de cultivo después de ser cortados y esterilizados para el estudio biológico.

En la Figura 20 se muestra una representación esquemática de los nanocompuestos hidrogeles posterior al entrecruzamiento ionotrópico y fotoquímico. En esta ilustración además se individualizan las distintos tipos de interacciones resultantes de la combinación y entrecruzamiento de los distintos componentes de la formulación, específicamente, las uniones covalentes debido al fotoentrecruzamiento de las cadenas metacriladas, los enlaces iónicos entre los cationes de calcio y grupos carboxilato de ALG y ALG-MA, y los enlaces de hidrogeno que se pueden formar entre los grupos dadores/aceptores de hidrógeno presentes en los biopolímeros y el GO.

En la Figura 21a-c se muestran fotografías digitales de los andamios 3D impresos liofilizados, utilizando las tres formulaciones de tinta. Bajo las mismas condiciones de impresión, los andamios impresos con las tintas que poseen GO muestran una fidelidad de forma y resolución espacial considerablemente superior que usando la tinta sin GO. Las imágenes obtenidas mediante FE-SEM muestran una mayor definición las hebras impresas cuando se adiciona GO, obteniendo así andamios con hebras regulares y planas (Figura 21d-f). Esto posiblemente se debe a ordenamientos laminares en las hebras impresas inducido por el GO. Mientras que la topografía superficial en los andamios ACG es mayoritariamente lisa, en los andamios ACG/GO01 y ACG/GO1 se observan micro-rugosidad con forma de estrías y protuberancias, respectivamente (Figura 21g-i).

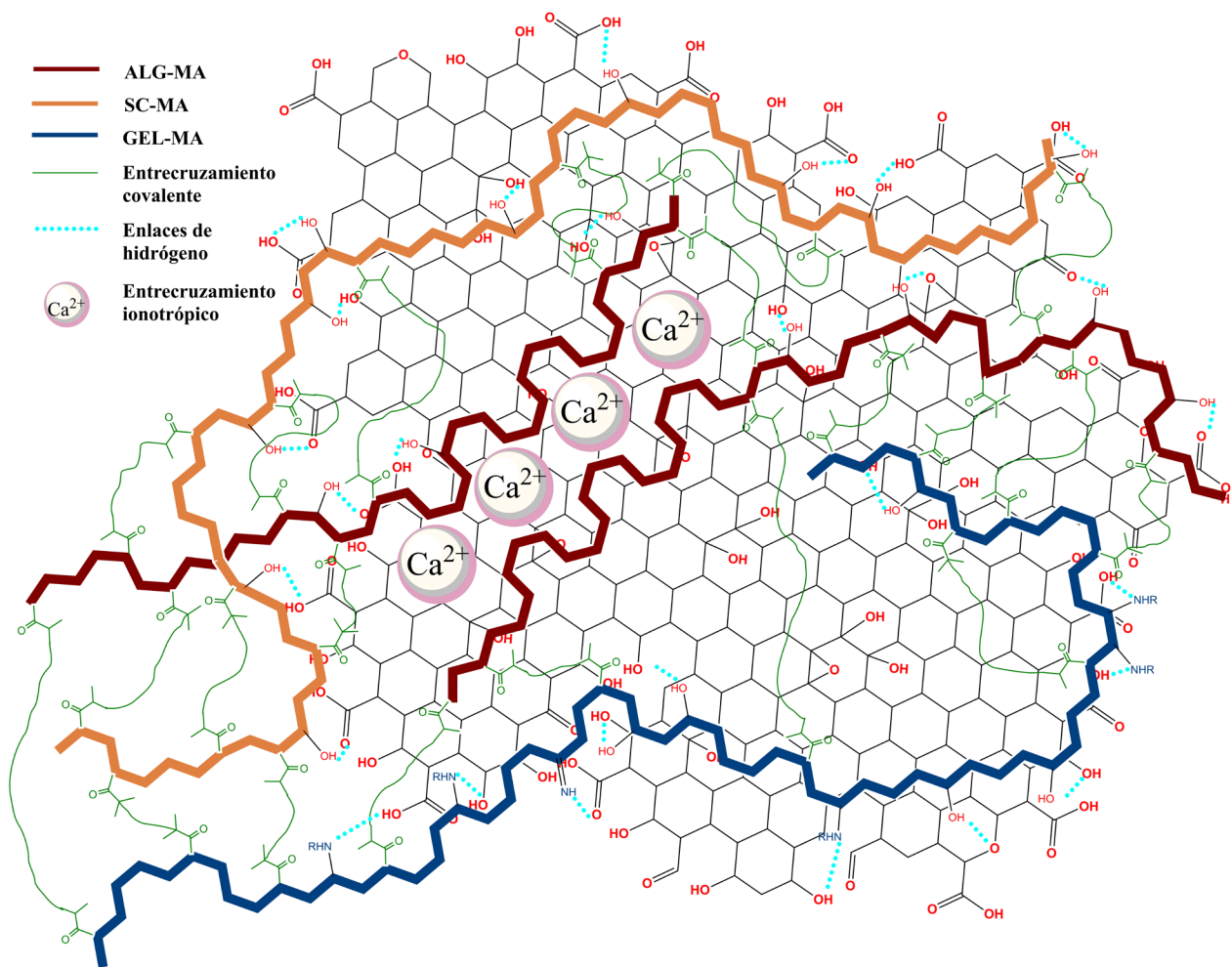


Figura 20. Representación esquemática de la matriz entrecruzada de los nanocompuestos hidrogeles.

Fibras 3D impresas con las tres formulaciones, liofilizadas y posteriormente rehidratadas fueron estudiadas mediante POM. La Figura 22 muestra imágenes POM de una hebra o fibra 3D impresa con la tinta ACG/GO1. Las hebras exhibieron birrefringencia al formar un ángulo con el plano de la luz polarizada distinto de 0° y 90° , lo cual indica un ordenamiento anisotrópico de las cadenas biopoliméricas y/o del GO (Figura 22a-d). Dependiendo del ángulo direccional de la fibra respecto con el plano de luz polarizada, esta exhibe interferencias de ondas que producen color rojizo o azulado cuando la muestra es observada entre filtros polarizador/analizador cruzados y un filtro de retardo de primer orden (λ).

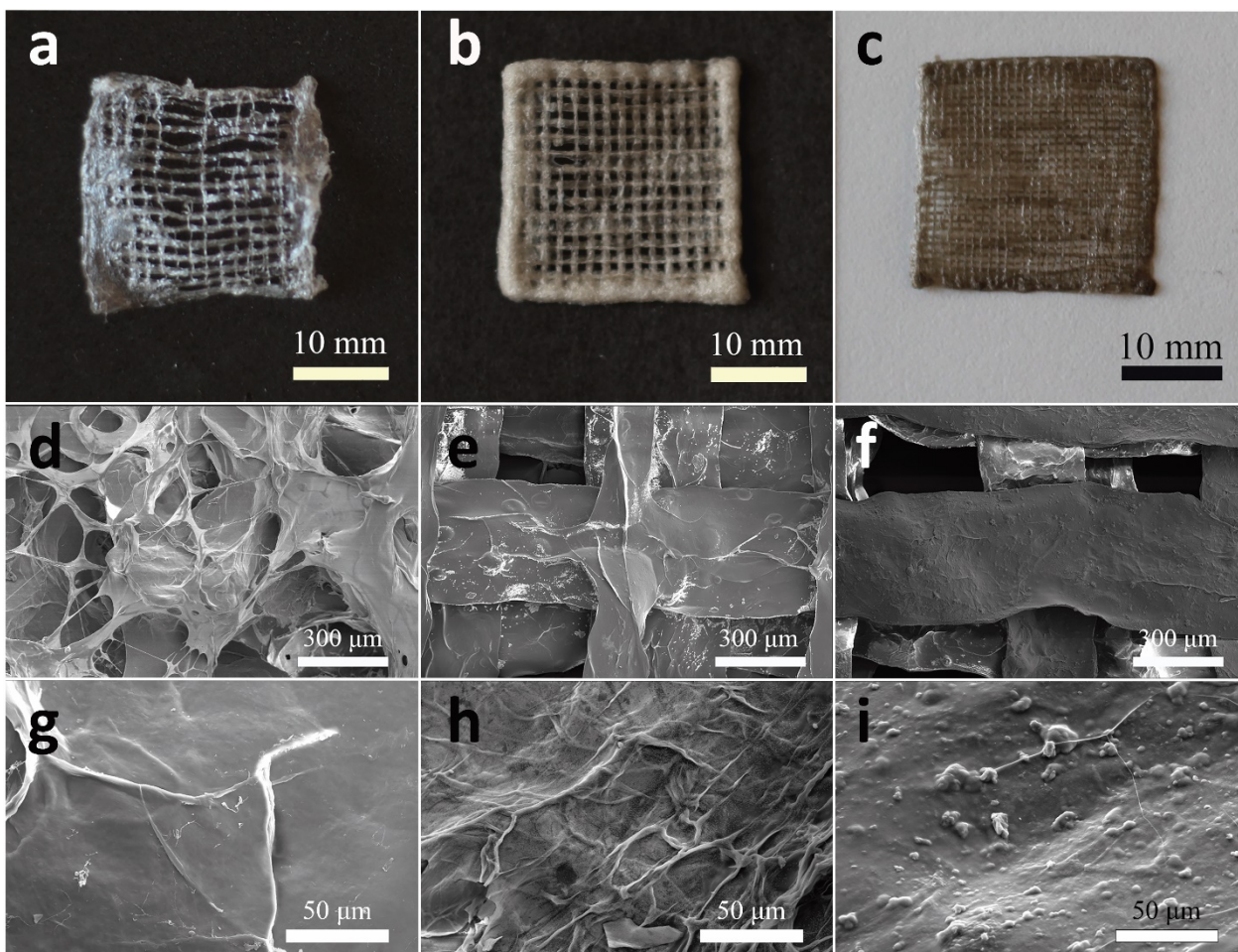


Figura 21. Fotografías digitales de andamios liofilizados obtenidos mediante impresión 3D, empleando las formulaciones ACG (a), ACG/GO0.1 (b) y ACG/GO1 (c). Microfotografías FE-SEM de andamios ACG (d), ACG/GO0.1 (e) y ACG/GO1 (f), después de liofilizar. Imágenes FE-SEM de la topografía de las hebras en los andamios liofilizados correspondiente a la formulación ACG (g), ACG/GO01 (h) y ACG/GO1 (i).

Mientras la fibra recién fotoentrecruzada no exhibe birrefringencia a 0° y 90° con respecto al polarizador (Figura 22 e y g), la fibra adquiere un color de interferencia rojo de primer orden (eje rápido) cuando la orientación de la fibra es suroeste-noreste (Figura 22f) y azul de segundo orden cuando la orientación de la fibra es noroeste-sureste (Figura 22h). La birrefringencia homogénea en la fibra confirma un orden a nivel molecular, a lo largo del eje geométrico mayor en la fibra. Cuando los andamios se sometieron al proceso de liofilización y posterior rehidratación, la naturaleza anisotrópica de las hebras se mantuvo intacta (Figura 22i-l). Este orden fue menos evidente en fibras impresas con ACG/GO01 e inexistente en las hebras de ACG al no exhibir birrefringencia cuando se observó entre filtros polarizador/analizador cruzados (Figura 23a-c). En la observación de las muestras ACG/GO01 no se observó birrefringencia en las hebras recién impresas (Figura 23e), pero se observó birrefringencia débil con forma de líneas sobre la superficie de las hebras liofilizadas/re-hidratadas (Figura 23f), esto indica un orden anisotrópico parcial que coincide con las micro-estrías observadas mediante

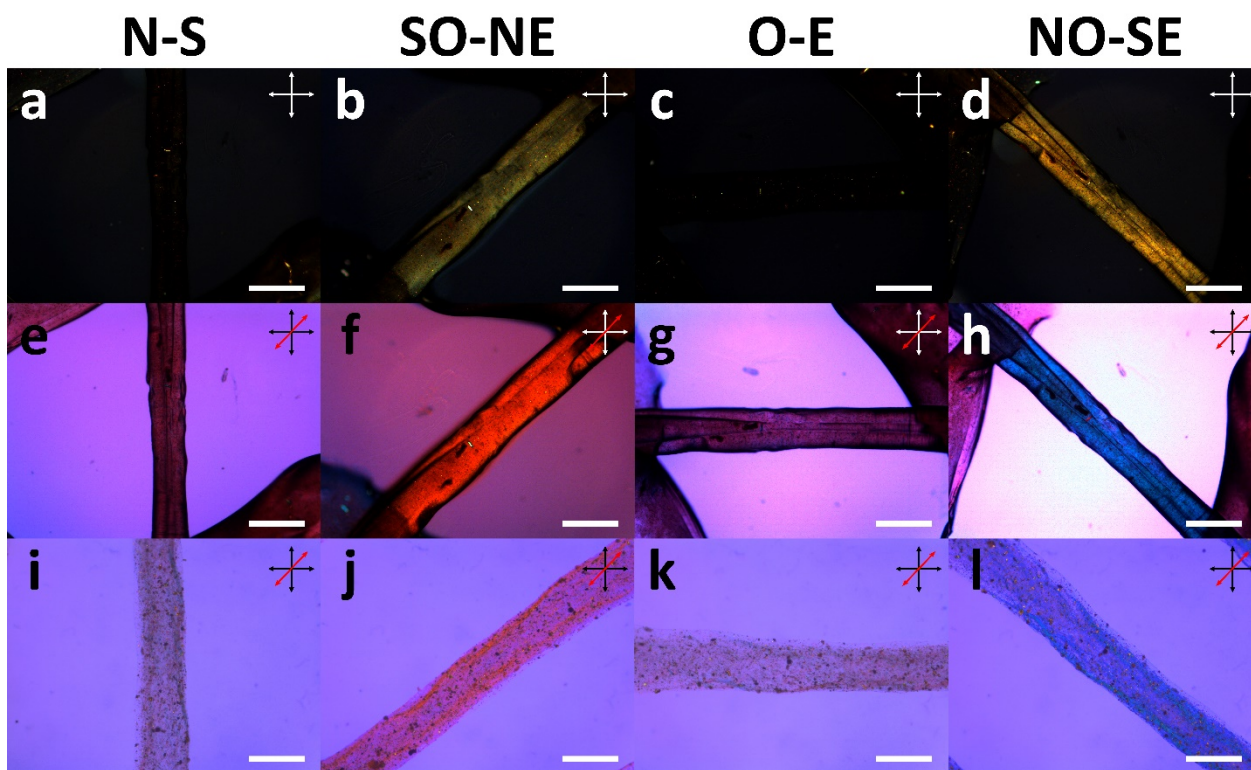


Figura 22. Hebras anisotrópicas 3D impresas con ACG/GO1. Imágenes POM con polarizador/analizador cruzados, observando la hebra con distintas direcciones (**a-d**) Imágenes POM con polarizador/analizador cruzados más un filtro de retardo de onda completa, observando la hebra recién fotoentrecruzada (**e-h**) y después del proceso de liofilización/re-hidratación (**i-l**). N-S: dirección norte-sur, SO-NE: dirección suroeste-noreste, O-E: dirección oeste-este, NO-SE: dirección noroeste-sureste, barra de escala: 400 μm .

FE-SEM en la superficie de los andamios ACG/GO01 (Figura 21h). Algunos compuestos con mesofases LC pueden producir este tipo de ordenamiento en microfibras¹¹⁶ o inducir el alineamiento de cadenas poliméricas en compósitos durante el proceso de fabricación de fibras, ejemplo de lo último es el trabajo de Buyuktanir *et al.*, donde se utilizó 4-pentil-4'-cianobifenilo (5CB, mesógeno con mesofase nemática) para inducir alineamiento de cadenas poliméricas en fibras de PLA obtenidas mediante electro-hilado.¹¹⁷

Suspensiones acuosas de GO han exhibido mesofases nemáticas liotrópicas estables (con una fracción en volumen de 100 %) en concentraciones mayores a 8 mg mL^{-1} .³³ Por debajo de esta concentración coexisten las fases isotrópicas y nemática, mostrando solo ~ 3 % de mesofase nemática en suspensiones de 1 mg mL^{-1} de GO. Sin embargo, cuando una suspensión de GO a baja concentración (incluso $< 1 \text{ mg mL}^{-1}$) pasa a través de un tubo a alta velocidad – tal como en la punta de aguja de la impresora 3D – las láminas de GO pueden ordenarse por efecto de la dirección de flujo.¹¹⁸ Además, recientes estudios muestran que las propiedades líquido cristalinas liotrópicas del GO son estabilizadas y la concentración crítica para la formación de la mesofase es reducida por la influencia de alginato en nanocompósitos hidrogeles.^{119,120} Por este motivo, es probable que el proceso de micro-extrusión sumado a las propiedades LC del GO conduzcan a una orientación molecular preferencial a lo largo de las fibras 3D impresas. En el contexto biológico, muchas de las estructuras biológicas (membranas

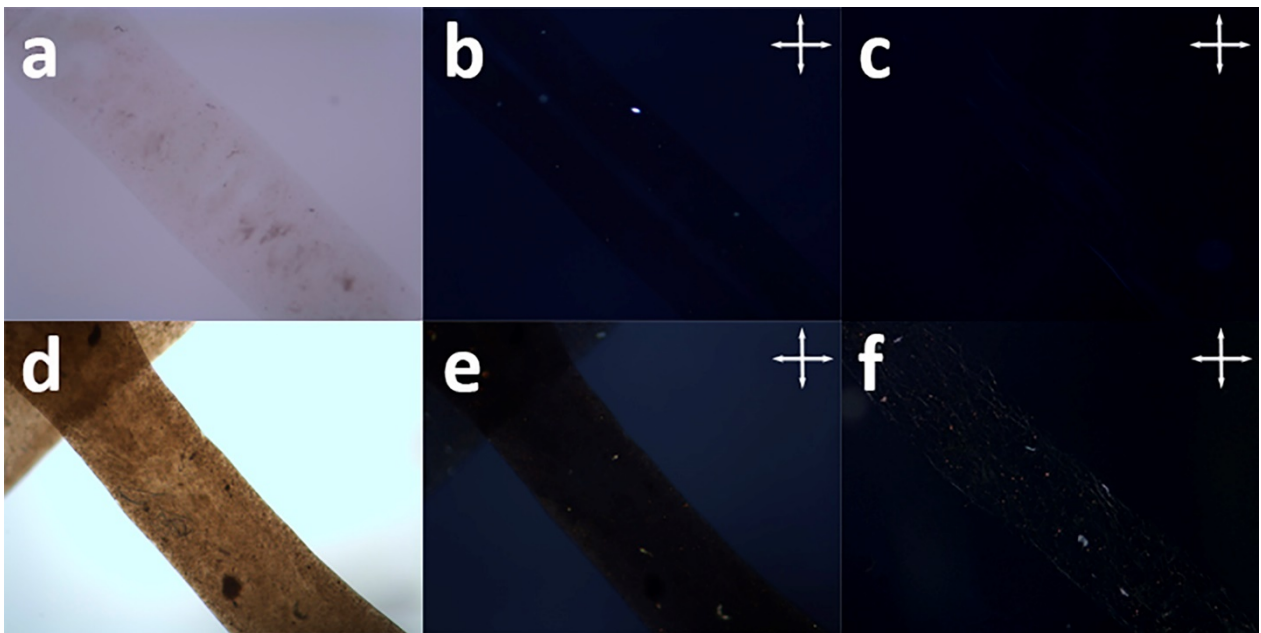


Figura 23. Fibras isotrópicas 3D impresas con ACG (a) y ACG/GO0.1 (b) observadas mediante POM con polarizador/analizador cruzados y orientación de las fibras noroeste-sureste. Las imágenes fueron adquiridas con campo claro (izquierda), observando hebras recién fotoentrecruzadas (centro) y después del proceso de liofilización/rehidratación.

celulares, tejidos fibrilares, tendones y ligamentos) se componen de ordenamientos anisotrópicos en forma jerárquicas desde la nano- a macroescala como fibras y láminas 2D. Por esta razón, andamios anisotrópicos biomiméticos para aplicaciones en tejido muscular,¹²¹ neuronal¹²² y de tendón¹²³ han suscitado gran interés. En los recientes años, algunos investigadores en el área de ITMR han focalizado sus estudios en el desarrollo de andamios anisotrópicos utilizando materiales con ordenamiento líquido cristalino como plantillas para guiar el crecimiento celular (tal como células neuronales) o incrementar la adhesión y proliferación de células (Figura 24).¹²⁴ De este modo, el GO aparece como un nuevo relleno en compósitos para inducir ordenamientos anisotrópicos en soluciones acuosas de biopolímeros.

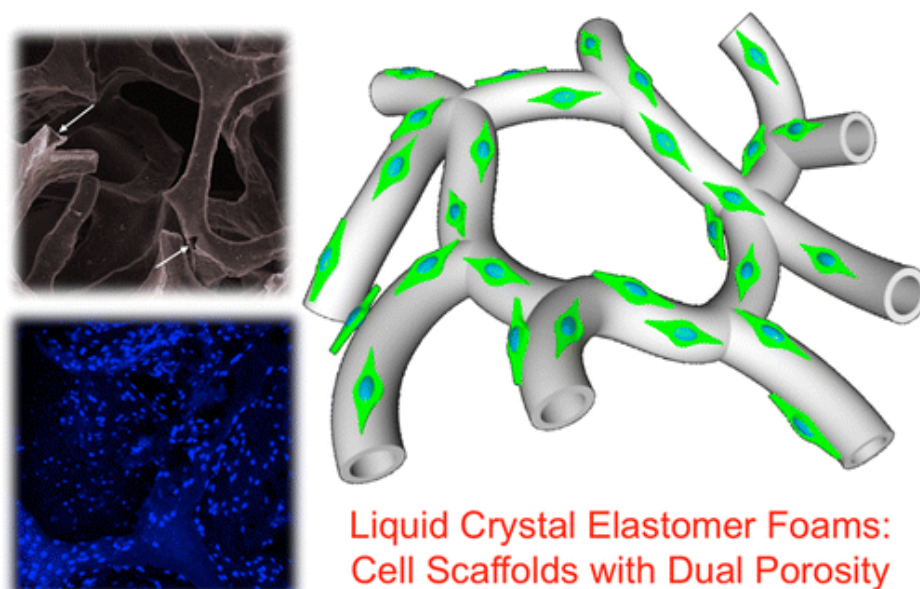


Figura 24. Andamio tipo espuma o esponja basado en micro-canales originados por ordenamiento líquido cristalino de un elastómero. Los micro-canales anisotrópicos actúan como guías para el crecimiento celular, incrementando la proliferación celular. Adaptado de referencia 124.

La naturaleza química de los andamios 3D impresos (liofilizados) se analizó mediante espectroscopía FTIR. La Figura 25 muestra los espectrogramas ATR-FTIR de los tres andamios superpuestos con los espectros de los biopolímeros metacrilados y de GO. La modificación química de ALG con grupos metacrililo forma un hombro en la banda de *stretching* de carbonilos de la estructura del ALG sobre los 1700 cm^{-1} . Posterior a la reacción de fotoentrecruzamiento, este hombro desaparece por el desplazamiento de la señal a menor energía (espectrogramas de línea negra en Figura 25) y se observa una intensa banda ancha que resulta de la sobreposición de las vibraciones en modo *stretching* de enlaces C=O de los carbonilos presentes en los biopolímeros y el GO, además de *stretching* C=C de estructuras aromáticas presentes en la gelatina y GO.

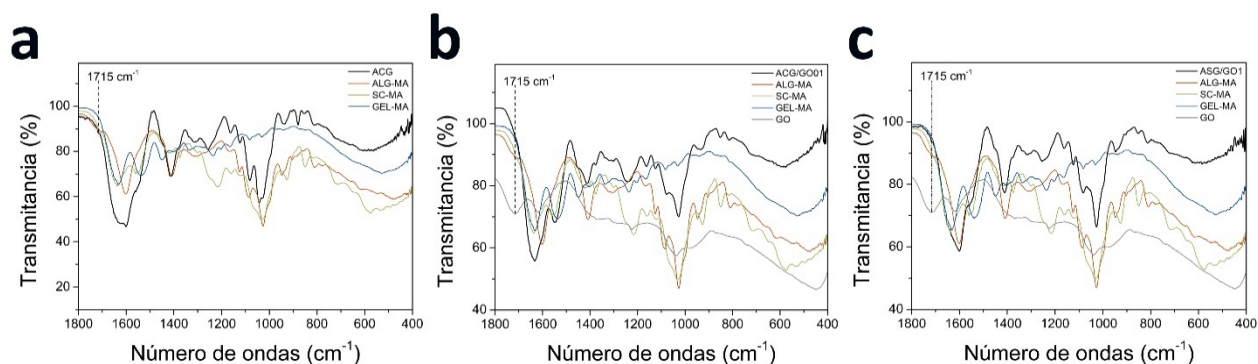


Figura 25. Espectrogramas ATR-FTIR de los andamios *post* fotoentrecruzamiento (línea negra), 3D impresos con las formulaciones ACG (a), ACG/GO01 (b) y ACG/GO1 (c). Se superponen los espectrogramas de los biopolímeros metacrilados precursores ALG-MA (línea roja), SC-MA (línea verde), GEL-MA (línea azul) y el relleno GO (línea gris).

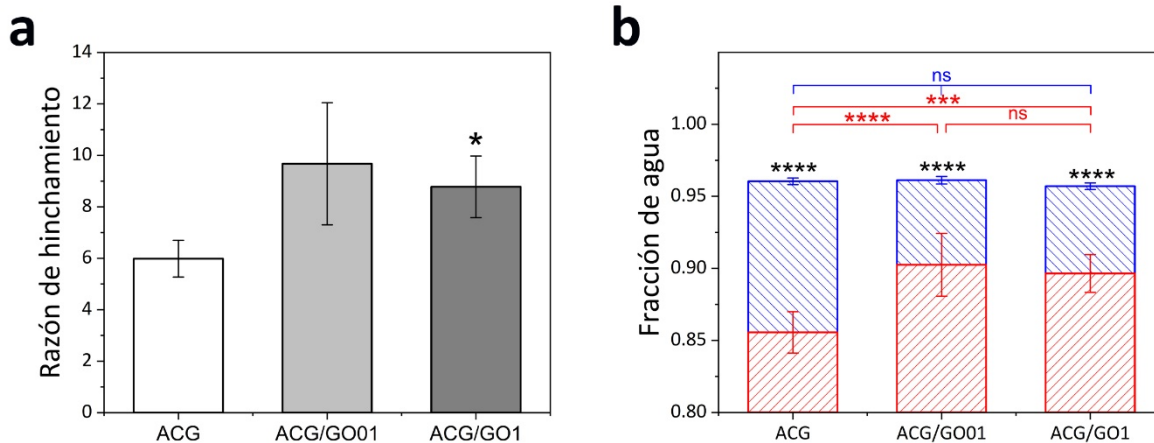


Figura 26. Capacidad de absorción de agua. Razón de hinchamiento de andamios de distinta composición (a). Fracción de agua en los tres tipos de andamios recién entrecruzados (azul) y después del proceso de liofilización (rojo) (b). *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ y ****: $p < 0.0001$.

Mediante un estudio gravimétrico se determinó la cantidad de agua en los andamios y capacidad de absorber agua luego de ser liofilizados. La Figura 26 muestra la razón de hinchamiento de los tres tipos de andamios. Los andamios incrementan entre 6-10 veces su masa seca al absorber agua, entre ACG y ACG/GO01 no existen diferencias significativas en sus razones de hinchamiento, en cambio los andamios ACG/GO1 presentaron una razón de hinchamiento significativamente superior a ACG ($p < 0.05$) (Figura 26a). Por otro lado, la cantidad de agua en los hidrogeles recién fotoentrecruzados es cerca de 96 % independiente de la composición (barras azules en Figura 26b). Después del proceso de deshidratación/rehidratación la fracción de agua en los andamios fue significativamente inferior en todos los andamios ($p < 0.0001$), alcanzando una composición de cercana a la encontrada en el tejido cartilaginoso que puede llegar a ser del 80%.³⁷ Al comparar la capacidad de absorción de agua, los andamios que contienen GO exhibieron una capacidad significativamente superior a los andamios ACG (barras rojas en Figura 26b). Estos resultados demuestran que la incorporación de GO como relleno en los nanocompuestos aumenta la hidrofiliidad de los xerogeles (hidrogeles deshidratados).

4.4. Propiedades reológicas y mecánicas de nanocompósitos hidrogeles

Con el objetivo de comprender el efecto del GO en la calidad de impresión 3D de los andamios, se estudió las propiedades reológicas de las tres tintas de impresión utilizadas (ACG, ACG/GO0.1 y ACG/GO1), todas las mediciones se realizaron a 4 °C. La base de la matriz de hidrogel (ACG) y las tintas nanocompósitos exhibieron viscosidades similares con un comportamiento de adelgazamiento durante el rango completo de velocidades de corte aplicado (Figura 27a). A pesar de que se empleó bajas concentraciones de GO, las tintas de nanocompósitos mostraron viscosidades más bajas que la tinta ACG. Este comportamiento probablemente está asociado con la reducción del volumen libre de los polímeros¹²⁵ o la adsorción de moléculas de polímero en la superficie de las partículas de relleno.¹²⁶ La Figura 27b muestra el módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'') como función de la frecuencia de oscilación (ω), para las tres formulaciones de tinta. Todas las tintas exhibieron un comportamiento de hidrogel tipo líquido antes del entrecruzamiento, con valores de módulos bajos (entre 10 y 100 Pa) y $\tan \delta = G''/G' > 1$. Los datos de los módulos de almacenamiento y de pérdida en función de la frecuencia se ajustan al modelo de Maxwell, lo cual significa que a bajas frecuencias ($\omega \rightarrow 0$), G' es proporcional a ω^2 y G'' es proporcional a ω . En la Figura 27c se muestra el estudio de propiedades tixotrópicas (cambio de la viscosidad en el tiempo, después de someterse a un cambio en el ritmo de esfuerzo de corte) de las tintas de impresión, con el propósito de imitar el efecto de la velocidad de esfuerzo de corte en la viscosidad de las tintas durante el proceso de impresión 3D.¹²⁷ El experimento procede de la siguiente manera: los primeros 60 s a baja velocidad de corte de 0.1 s^{-1} (Etapa I) representa a las tintas en los cartuchos, seguido de un breve incremento a una alta velocidad de corte (100 s^{-1} por 10 s) en la Etapa II, lo cual imita el flujo de las tintas a través de la aguja, y los últimos 60 s a 0.1 s^{-1} muestra la recuperación de viscosidad de los hidrogeles después del proceso de extrusión (Etapa III). Las tintas que contienen GO exhibieron tanto una menor disminución de la viscosidad durante la Etapa II, como menores tiempos de recuperación de la viscosidad que lo mostrado en la tinta ACG. Ya que la viscosidad de las tintas es similar, esta propiedad parece no tener un efecto significativo en la calidad de impresión de los andamios. Por lo tanto, las propiedades tixotrópicas de las tintas con GO podrían tener un importante rol en la mejor resolución y fidelidad de forma de los andamios 3D impresos, puesto que el tiempo requerido para recuperar la viscosidad inicial de las tintas (Etapa I) está directamente relacionado con el ancho de la hebra impresa.^{89,128} Utilizando la tinta ACG, las hebras impresas pueden segmentarse o fusionarse con hebras vecinas debido al elevado tiempo de recuperación. Empleando tintas con esta formulación toma 64 s para alcanzar el 97 % de la viscosidad inicial promedio en la Etapa I (23.4666 Pa s). En contraste, la recuperación del 97 % de viscosidad usando las tintas ACG/GO0.1 y ACG/GO1 toma sólo 12s y 1 s respectivamente (viscosidad inicial promedio de 11.1092 Pa s y 11.5401 Pa s respectivamente). Esta disminución en el tiempo de recuperación permite obtener hebras más delgadas hasta la adición del entrecruzante ionotrópico. Las láminas de GO pueden interaccionar con las cadenas biopoliméricas mediante enlaces de hidrógeno, donde el GO actúa como un entrecruzante físico que mejora el tiempo de recuperación de viscosidad de la tinta.⁸⁹

Se estudió la cinética del entrecruzamiento ionotrópico, al agregar la solución de cloruro de calcio ($t = 60 \text{ s}$), se observa una clara transición hacia un hidrogel tipo sólido rígido, con un incremento drástico en el valor del módulo de varios órdenes de magnitud, mientras que la curva de G' cruza la curva de G'' ($\tan \delta < 1$), tal como se muestra en las curvas cinéticas de entrecruzamiento ionotrópico (Figura 27d). La transición hidrogel fluido-hidrogel sólido es casi instantánea y el módulo alcanzado en el hidrogel ACG resultó ser cerca de un orden de

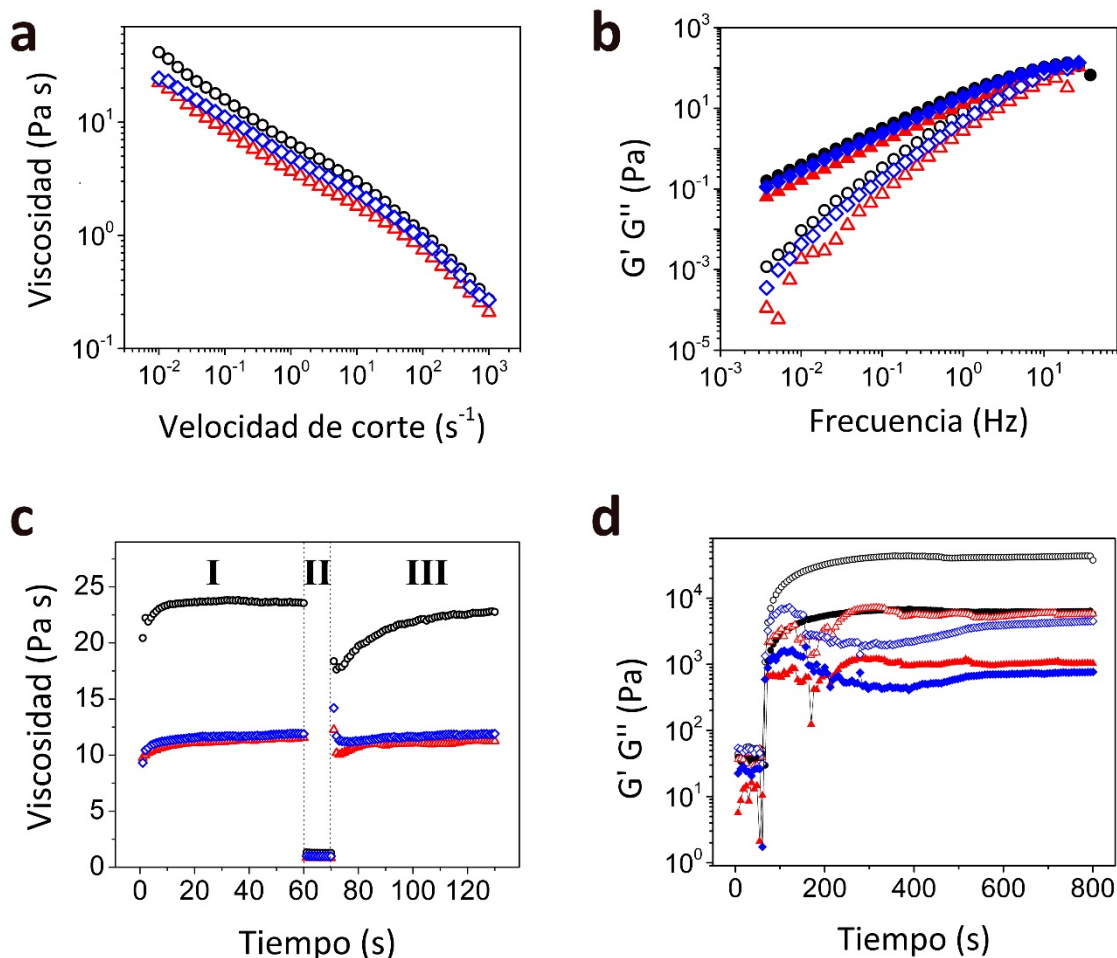


Figura 27. Caracterización reológica de las tintas ACG (círculos negros), ACG/GO0.1 (triángulos rojos) y ACG/GO1 (rombos azules). Curvas de flujo de las distintas formulaciones de tinta (a). Módulo de almacenamiento G' (símbolos abiertos) y módulo de pérdida (símbolos cerrados) en función de la frecuencia para cada tinta (b). Propiedades de adelgazamiento y recuperación de viscosidad de los hidrogeles, simulando el proceso de impresión mediante análisis reológico: antes de la impresión, Etapa I; durante la impresión, Etapa II y después de la impresión, Etapa III (c). Módulo de almacenamiento G' (símbolos abiertos) y módulo de pérdida (símbolos cerrados) medidos durante 800 s donde se agregó solución entrecruzante de CaCl_2 100 mM 60 s después de iniciar el experimento (d).

magnitud superior a los valores mostrados en hidrogeles ACG/GO01 y ACG/GO1. Esto se puede deber a que la difusión de cationes de calcio(II) en los nanocompuestos puede ser más lenta debido a la interacción iónica con los grupos carboxilatos del GO.¹²⁹

Para estudiar el efecto de la incorporación de GO como relleno en la matriz biopolimérica de los hidrogeles sobre las propiedades mecánicas del biomaterial, se realizaron ensayos de compresión uniaxial sin confinamiento a probetas de geometría cilíndrica para los tres tipos de andamios. En la Figura 28a se muestran las probetas en el molde después de ser entrecruzadas ionotrópicamente, luego las muestras son mantenidas a 4 °C y fotoentrecruzadas (Figura 28b), finalmente las probetas desmoldadas son utilizadas para los ensayos de compresión mecánica

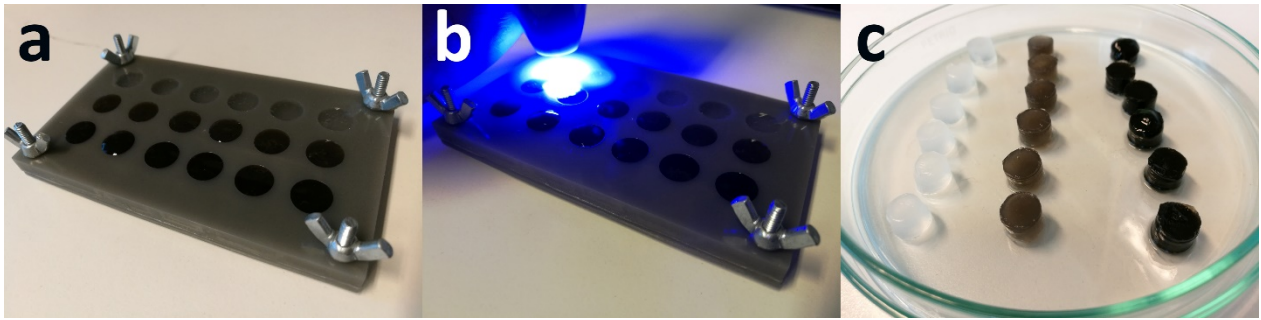


Figura 28. Fabricación de probetas cilíndricas para ensayos de compresión mecánica. Fotografía de probetas posterior al entrecruzamiento ionotrópico con solución acuosa de CaCl_2 (a). Fotoentrecruzamiento de las cadenas biopoliméricas metacriladas (b). Probetas cilíndricas desmoldadas antes de realizar los ensayos de compresión mecánica (c).

(Figura 28c). La Figura 29a muestra las curvas de esfuerzo-deformación de los nanocompuestos hidrogeles y la matriz de hidrogel sin GO. El perfil de la curva de ACG/GO01 (rojo) no difiere considerablemente de ACG (negro), por ende, no existe un refuerzo mecánico por efecto del GO debido a la baja concentración en esta formulación. El nanocompuesto con mayor concentración de GO, ACG/GO1; exhibió propiedades mecánicas mejoradas (curva azul en Figura 29a) en comparación con ACG. El módulo de compresión en ACG/GO1 es $\sim 60\%$ superior al de los hidrogeles sin y con baja concentración de GO (Figura 29b). Los módulos de compresión de ACG y ACG/GO01 no presentaron diferencias significativas. El incremento del módulo de compresión se puede atribuir a las interacciones no-covalentes entre el GO y las cadenas biopoliméricas, donde las láminas de GO actúan como un puente que refuerza la estructura tridimensional del hidrogel.¹³⁰

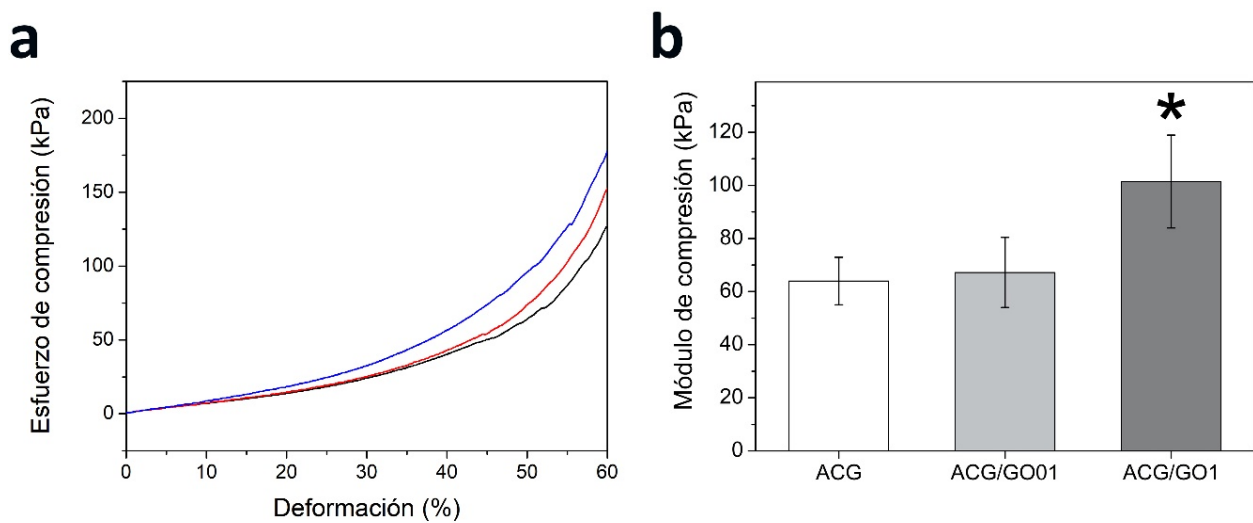


Figura 29. Curvas de esfuerzo-deformación en compresión de hidrogeles ACG (línea negra), ACG/GO01 (línea roja) y ACG/GO1 (línea azul) (a). Módulo de compresión de los tres tipos de hidrogeles (*: $p < 0.05$) (b).

4.5. Biofabricación de constructos mediante Bioimpresión 3D

La bioimpresión 3D es el siguiente paso para la construcción de estructuras funcionales y heterogéneas como tejidos complejos y órganos. Por este motivo, se evaluó la tinta que exhibió el mejor desempeño en los ensayos de biocompatibilidad y proliferación celular (ACG/GO0.1). La base de la fabricación de estructuras 3D “vivas” (biofabricación) es la formulación de una biotinta, la cual se compone por células embebidas en una matriz de hidrogel. En el presente trabajo se formuló una matriz de hidrogel que imita la ECM del cartílago. La base de la biotinta empleada es alginato que permite mejor procesabilidad durante la bioimpresión además de aportar densidad de cargas negativas característico de la ECM del cartílago, bioconjugado con gelatina (homólogo al colágeno del cartílago) y sulfato de condroitina (GAG presente en la ECM del cartílago), en compósito con óxido de grafeno (aporta densidad de cargas negativas y mejora la calidad de impresión). Antes de realizar la bioimpresión se realizó ensayos de impresión 3D en la impresora 3D Discovery, para optimizar los parámetros de impresión. Los mejores resultados (Figura 30) se obtuvieron imprimiendo la tinta ACG/GO0.1 a 30-35 mm/s con una presión de 1.5-2 bar, a 5 °C y utilizando una punta de aguja con diámetro interno de 0.25 mm (25 G). Esta matriz de hidrogel se combinó con hADMSCs ($2 \cdot 10^6$ hMSCs/mL) empleando las mismas concentraciones de biopolímeros utilizadas en la impresión 3D de andamios, pero las soluciones se prepararon esta vez en PBS + FBS al 10 %. Sin embargo, la incorporación de hADMSCs y FBS modificó las propiedades reológicas del hidrogel formulado, disminuyendo visiblemente la viscosidad. En consecuencia, la biotinta formulada no fue capaz de mantener una viscosidad apropiada para formar constructos y colapsó la estructura diseñada. A pesar de aquello, se utilizó esta tinta para evaluar la vitalidad de las células después de ser sometidas al proceso de bioimpresión.

Para mejorar la calidad de impresión se aumentó la concentración de los biopolímeros para incrementar la viscosidad. La Figura 31 muestra un esquema general de la preparación de la biotinta. Se incrementó la concentración final de los biopolímeros metacrilados a 10 mg mL^{-1} , la de ALG sin modificar a 17 mg mL^{-1} y esta vez la cantidad de células fue de $8.4 \cdot 10^5$ hADMSCs/mL. Esta formulación de biotinta permitió fabricar constructos cilíndricos de 15 mm de diámetro, 0.25 mm por capa y espaciado entre hebras de 2 mm, diseñados en el *software* BioCAD™ para luego ser impresos en placas de cultivo de 6 pocillos (Figura 32). Pevio a comenzar con la bioimpresión, la biotinta en el cartucho se mantiene a 5 °C durante una hora para pre-gelificar termotrópicamente la gelatina presente, esto además ayuda a manter las

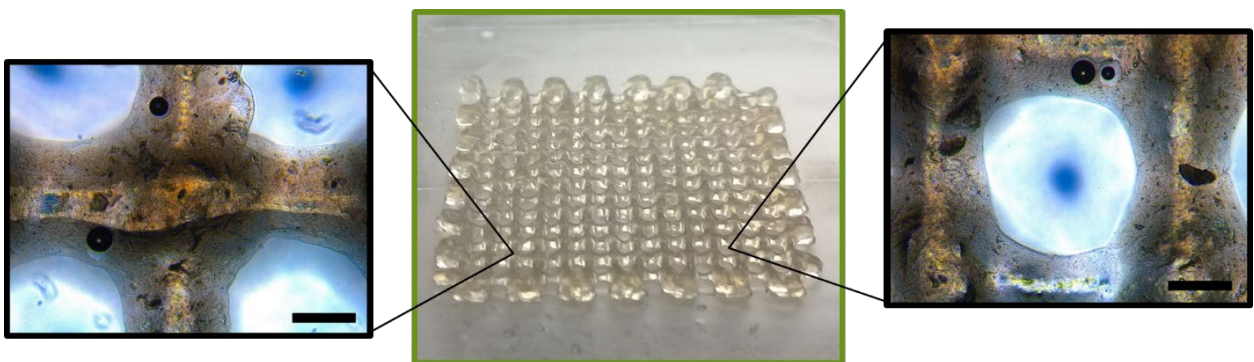


Figura 30. Andamio impreso con ACG/GO01 en la impresora 3D Discovery (centro). Detalle de la intersección de dos hebras (izquierda) y macroporo formado por el patrón interno de la estructura (derecha). Barra de escala = 400 μm .

hADMSCs con una mínima actividad metabólica para evitar la muerte celular.¹³¹ El proceso de bioimpresión 3D comienza con la impresión de dos capas de la estructura diseñada con el cabezal que contiene el cartucho con biotinta (velocidad: 30-35 mm s⁻¹, presión: ~ 1.5 bar), seguido de la aplicación de una solución de CaCl₂ 200 mM utilizando un cabezal equipado con una micro-válvula para formar un flujo *jet* sobre las capas impresas y finalmente el constructo es iluminado con una lámpara LED UV durante 5 s (480 mW/cm² a ~ 2.8 cm) para realizar el fotoentrecruzamiento de los biopolímeros metacrilados (Video A3 en apéndice). En la Figura 33a-c se muestra un constructo de cuatro capas a distintas magnificaciones después de terminar el proceso de bioimpresión, los constructos presentaron hebras íntegras que permitieron construir la estructura con forma de malla deseada inclusive imprimiendo estructuras tan pequeñas como cilindros de 10 mm de diámetro por 2.2 mm de alto (12 capas de impresión), como se muestra en la Figura 33d-e. Constructos de dos capas de impresión se utilizaron para las posteriores evaluaciones biológicas.

4.6. Desempeño biológico de los andamios/constructos con hADMSCs

4.6.1. Obtención y caracterización de hADMSCs desde tejido adiposo

El ensayo preliminar para evaluar la biocompatibilidad de los andamios 3D impresos (ensayo MTT) fue llevado a cabo utilizando hADMSCs aisladas desde la fracción vascular estromal de tejido adiposo humano. El resto de las pruebas biológicas y la bioimpresión 3D se realizaron con hADMSCs proporcionadas por el *Texas A&M Health Science Center College of Medicine, Institute for Regenerative Medicine at Scott & White, USA* (NIH Grant P40RR017447). La Figura 34 muestra de izquierda a derecha el proceso de obtención

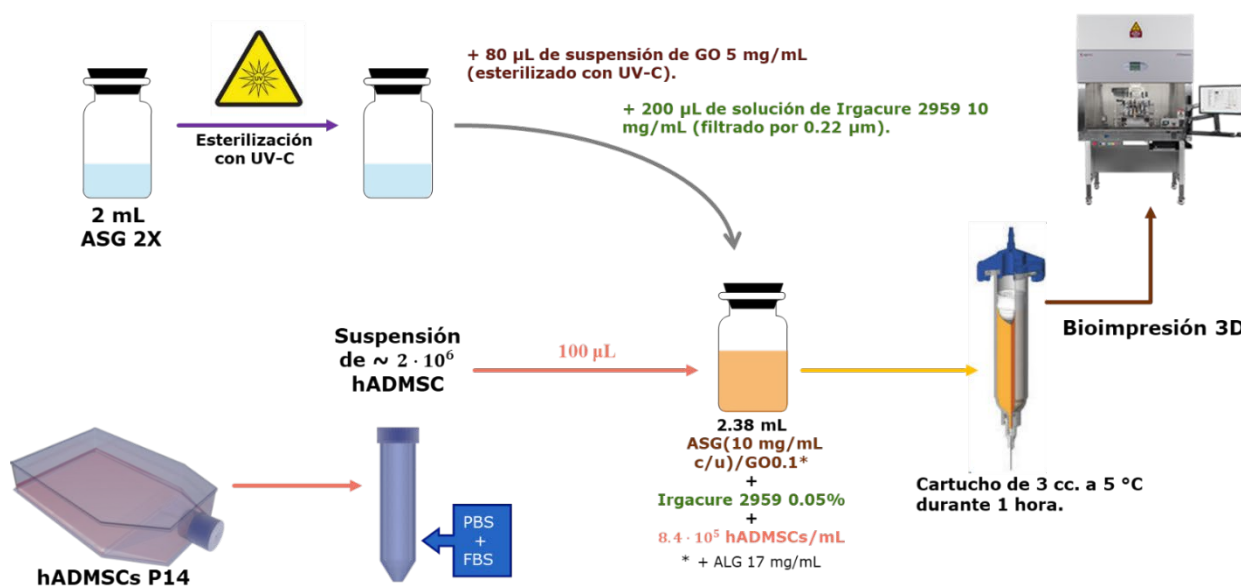


Figura 31. Esquema general de preparación de la biotinta: una solución al doble de concentración de los biopolímeros metacrilados se esteriliza mediante luz UV y se mezcla con las soluciones estériles de GO y PI, a esta base de hidrogel se adicionó una suspensión de hADMSCs (pasaje 14) en PBS/FBS para obtener así la biotinta. Finalmente, se transfiere la biotinta al cartucho de impresión y se mantiene a 5 °C durante una hora previo a comenzar con la bioimpresión 3D.

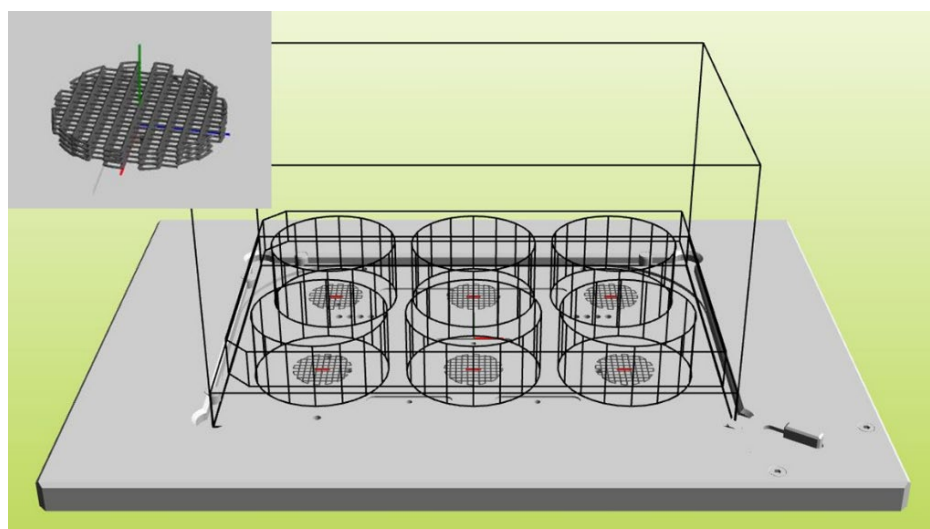


Figura 32. Ilustración de los constructos 3D diseñados en BioCAD™ y ubicados en una placa de cultivo de 6 pocillos. El detalle de la estructura dibujada se muestra en la parte superior izquierda.

de las hADMSCs. Las células exhiben la típica morfología fibroblastoide de las hADMSCs aisladas desde tejido graso, adheridas a una placa de cultivo de poliestireno.¹⁰² La determinación del inmunofenotipo de las células aisladas se realizó mediante citometría de flujo (Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, Universidad de los Andes, Santiago, Chile). Los resultados obtenidos muestran consistencia con el clásico perfil fenotípico de hMSCs (Figura 35). Las células aisladas (pasaje 3) expresaron los marcadores mesenquimales (CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105), con una menor expresión del marcador de superficie CD44 (54 %), lo cual podría indicar la existencia una población de MSCs primarias (nativas). Por otro lado, los marcadores hematopoyéticos (CD11b, CD19,

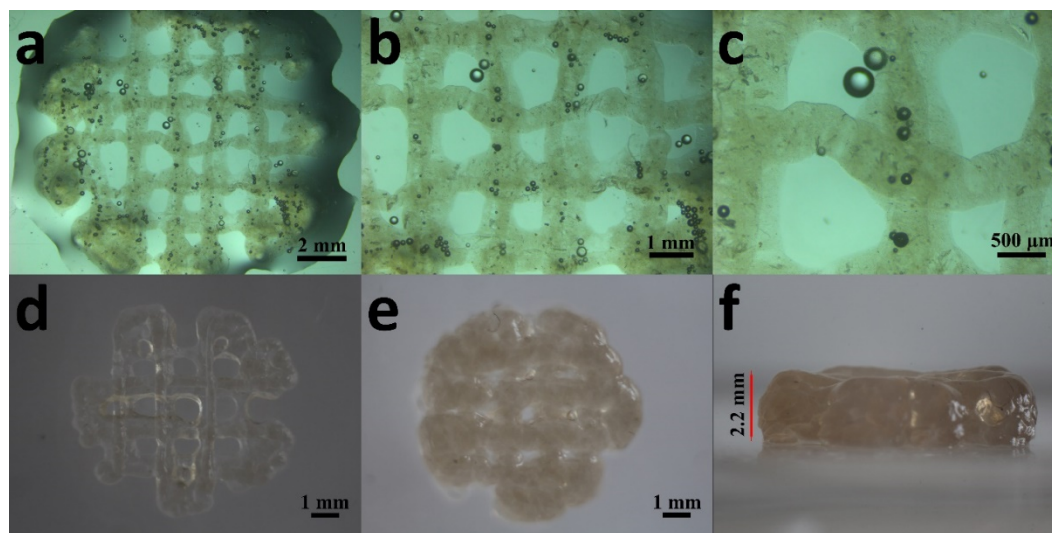


Figura 33. Constructo cilíndrico 3D bioimpreso (15 mm de diámetro, 0.5 mm de alto y espaciado entre hebras de 2 mm) y aún sumergido en la solución de entrecruzante ionotrópico, observado mediante microscopía óptica a distintas magnificaciones (**a-c**). Constructos cilíndricos (10 mm de diámetro y espaciado entre hebras de 2 mm) 3D bioimpresos con 4 capas (**d**) y 12 capas (**e** y **f**).



Figura 34. Obtención de *pellets* de la fracción vascular estromal que contiene las hADMSCs, mediante digestión enzimática y posterior centrifugación de tejido adiposo lipoaspirado (izquierda). Microfotografía de contraste de fase de hADMSCs del pasaje 3, aisladas de la fracción vascular estromal (derecha).

CD34, CD45 y HLA-DR) y el marcador de células endoteliales (CD34) tuvieron expresión negativa. Los resultados de este análisis indica que estas células cumplen con los criterios mínimos para definir las como MSCs, basado en la adherencia en placas de plástico, morfología observada y el perfil de su inmunofenotipo.^{3,102}

4.6.2. Viabilidad de hADMSCs en los andamios

Para tener un primer indicio del posible efecto citotóxico de los andamios y sus componentes, se realizó un ensayo MTT que permite analizar la actividad metabólica de las células (vitalidad celular). La Figura 36 muestra los resultados de este ensayo, donde se

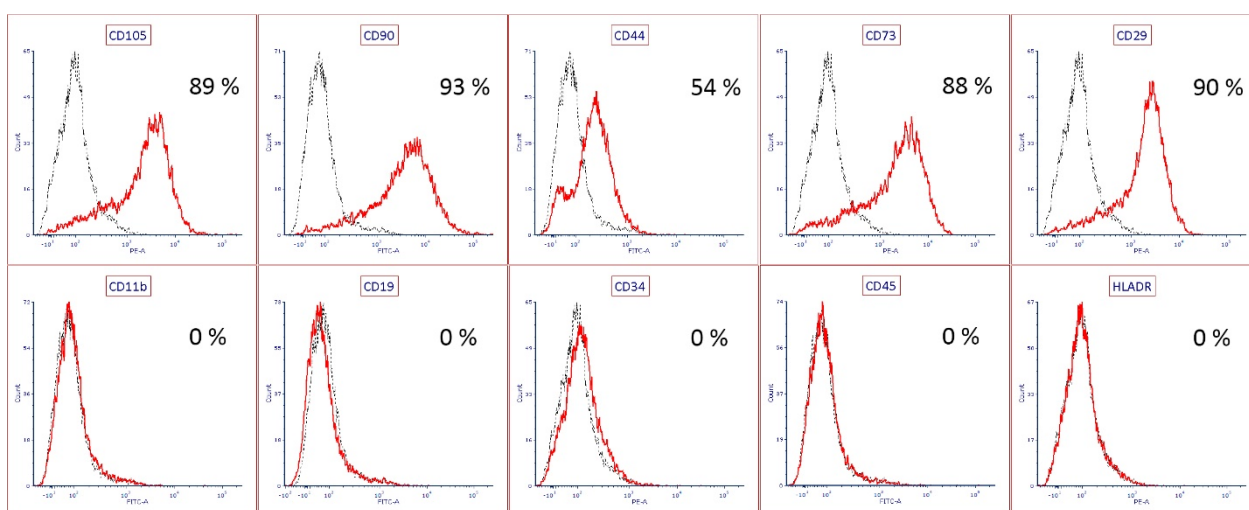


Figura 35. Caracterización inmunofenotípica de las hADMSCs (pasaje 3) aisladas. La fila superior muestra los marcadores con expresión positiva y la fila inferior los marcadores que no mostraron expresión, utilizando como controles de isotipo los anticuerpos monoclonales inmunoglobulina G (IgG1)-FITC e IgG1-PI (curvas negras)

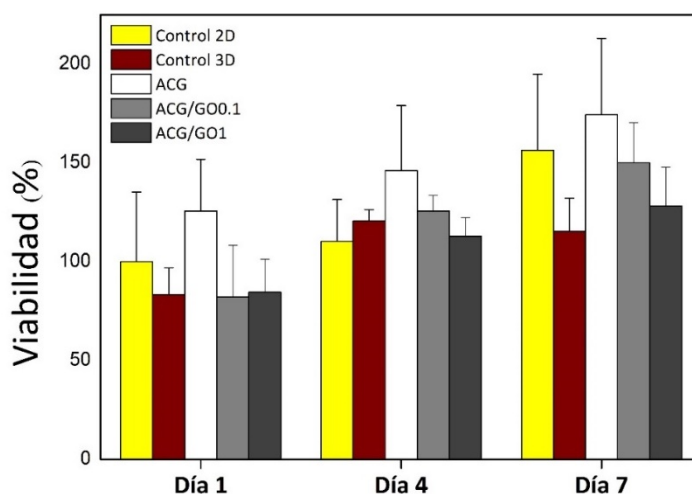


Figura 36. Ensayo MTT efectuado hasta el día 7. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad de hADMSCs (pasaje 4) relativo al control 2D en placa de poliestireno en el día 1.

sembraron las hADMSCs aisladas (pasaje 4) en los andamios 3D impresos y utilizando un andamio de ALG puro como control 3D además del control 2D de células cultivadas en una placa de poliestireno. La viabilidad en los andamios (relativa al control 2D al día 1) se midió hasta el día 7. La viabilidad celular promedio en cada andamio no difieren significativamente de ambos controles ($p < 0.05$), estos resultados sugieren que, preliminarmente, la composición química de las formulaciones de tinta utilizadas para la fabricación de andamios son citocompatibles con hADMSCs.

Adicionalmente, se cuantificó la proliferación de hADMSCs sobre andamios 3D impresos mediante un ensayo con *AlamarBlue*TM. Para este ensayo se sembró hADMSCs (pasaje 9) sobre los andamios impresos con las tres formulaciones de tinta, utilizando andamios de ALG puro como control. La Figura 37a muestra la evolución de la proliferación celular (mostrada como intensidad de fluorescencia promedio) en cada tipo de andamio durante 14 días. La proliferación celular promedio en cada andamio no es significativamente diferente del control (al nivel $p < 0.05$) durante los primeros 3 días, sugiriendo que en etapas tempranas los andamios son biocompatibles, independiente de la bioconjugación y presencia de GO (en concordancia con el ensayo MTT). Sin embargo, después de una semana la proliferación de hADMSCs en los andamios bioconjugados fue significativamente superior comparado con el andamio control de ALG, donde la cantidad de células (proporcional a la intensidad de fluorescencia medida) decrece considerablemente. Notablemente, los andamios ACG/GO0.1 presentaron mayor proliferación celular que los andamios ACG y ACG/GO1. Después de 14 días de cultivo, se alcanza una proliferación de hADMSCs similar entre los andamios bioconjugados (con y sin GO), exhibiendo una intensidad de fluorescencia promedio hasta 3.6 veces superior comparado con el control. La baja viabilidad celular en los andamios de ALG se puede explicar por la formación de agregados celulares tal como se muestra en la Figura 37b, lo que significa que en esos andamios las hADMSCs prefieren las interacciones tipo célula-célula en lugar de formar uniones célula-material.²⁶ Estos agregados celulares se pueden desprender del andamio ya sea por los sucesivos cambios de medio de cultivo como también

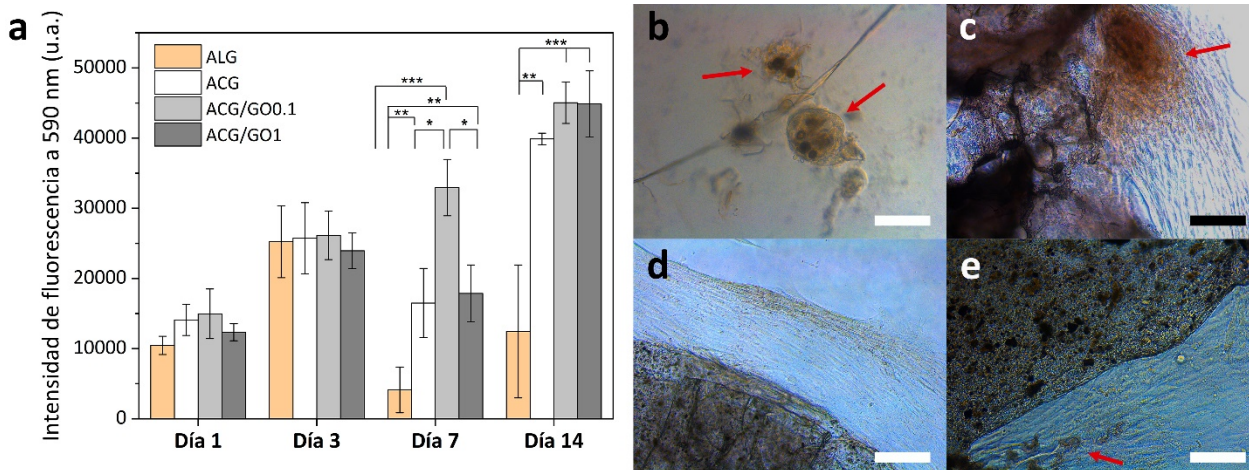


Figura 37. Proliferación de hADMSCs sobre andamios 3D impresos. Cuantificación de la proliferación celular mediante ensayo alamarBlue™ (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$) (a). Microfotografías de contraste de fase de los andamios sembrados con hADMSCs al día 7: ALG (b), ACG (c), ACG/GO0.1 (d) y ACG/GO1 (e). Agregados celulares son indicados con flechas rojas (barra de escala = 100 μm).

por el procedimiento de aspiración y lavado durante el ensayo, lo cual disminuye dramáticamente el número de células. La proliferación en los andamios aumenta significativamente cuando ALG es bioconjugado con SC y GEL. Este incremento de la proliferación indica que las hADMSCs prefieren adherirse a la superficie de los andamios que a otras células. Las células sembradas en los andamios ACG/GO0.1 proliferan de manera extraordinariamente homogénea sobre la superficie y alrededor de las hebras impresas, sin la formación de agregados celulares (Figura 37d). Al incorporar más GO a la composición de los andamios, no solo se produce una alta proliferación de células distribuidas en la superficie de los andamios, sino que también se forman algunos agregados celulares pequeños (Figura 37e).

La vitalidad de las hADMSCs adheridas en los andamios 3D impresos y los constructos 3D bioimpresos fue analizada mediante ensayos *Live/Dead* utilizando una tinción con calceína-AM/yoduro de propidio y microscopía de fluorescencia. La Figura 38 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de los tres tipos de andamios 3D impresos, sembrados con hADMSCs (pasaje 6) y observados en el día 7 de cultivo. Los resultados muestran la total sobrevivencia (células verdes) de la hADMSCs adheridas a los diferentes andamios independiente de la formulación de las tintas utilizadas para imprimirlos. Esto sugiere que la disminución de intensidad de fluorescencia en el ensayo alamarBlue™ en los andamios ACG y ACG/GO1 al día 7 (Figura 37a), podría deberse a la agregación celular y posterior desprendimiento de células o a la inhibición del metabolismo celular, más que a la muerte celular debido a un efecto citotóxico del material. La presencia de GO no produjo un efecto citotóxico sobre la hADMSCs durante el tiempo estudiado. Se ha encontrado que el nivel citotóxico de GO puro sobre hMSCs se ubica en el rango de concentraciones de entre 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.¹³² Sin embargo, los resultados de este trabajo están en concordancia con reportes previos de nanocompuestos citocompatibles que contienen GO en mayores concentraciones y que han exhibido mejor adhesión, proliferación y diferenciación de hMSCs para aplicaciones en ITMR.¹³³ Este fenómeno

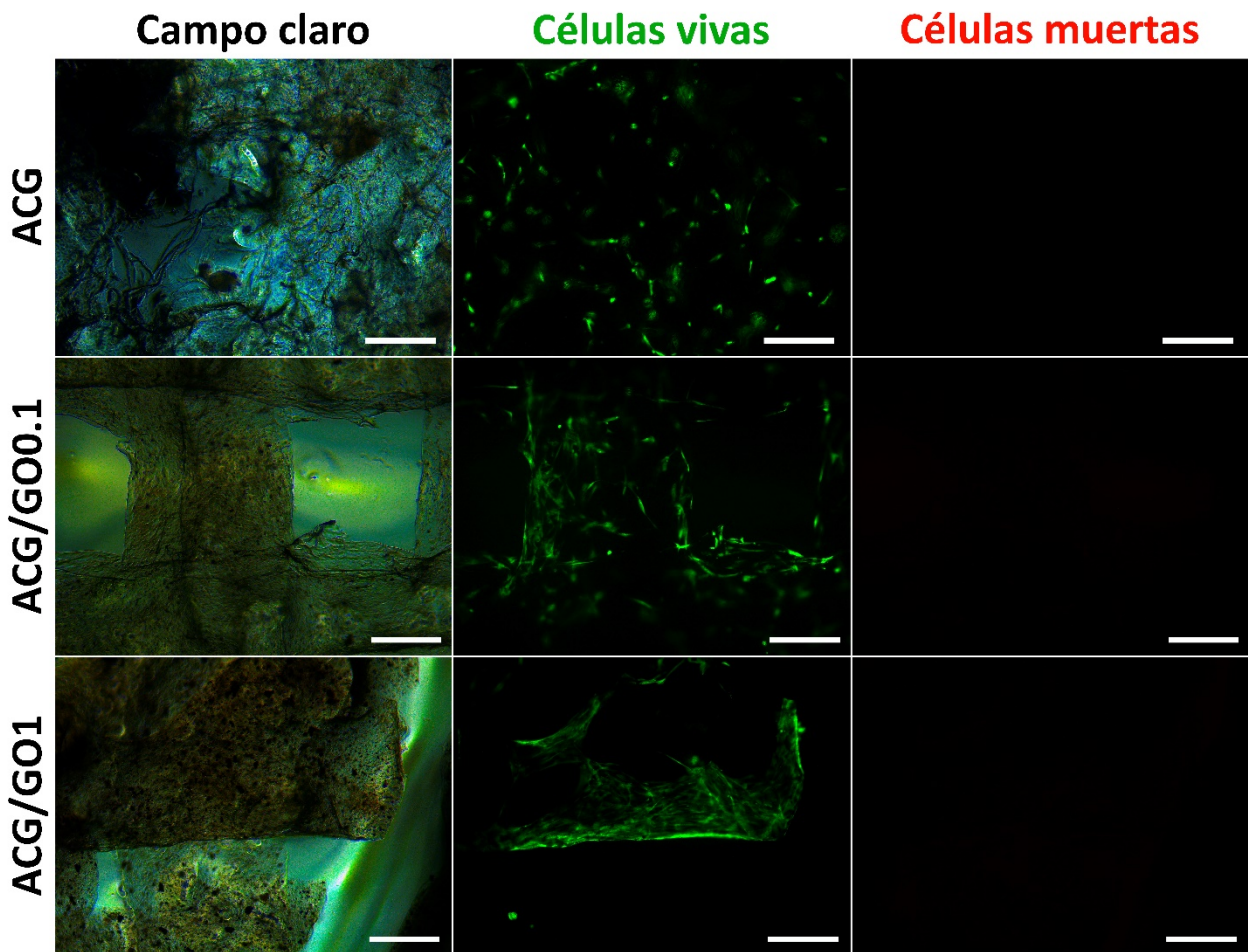


Figura 38. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo *Live/Dead* de los andamios sembrados con hADMSCs observados el día 7 de cultivo (barra de escala = 200 μ m).

puede ser explicado por la interacción del GO con la red polimérica mediante enlaces de hidrógeno, permitiendo una lenta y baja liberación de GO al medio, lo que reduce su citotoxicidad.¹³⁴ Además, el GO tiene la capacidad de adsorber proteínas y otras biomoléculas del medio biológico circundante a través de interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas e interacciones π - π , lo cual mejora la nutrición, migración, distribución y adhesión celular en los andamios.¹³⁵

La Figura 39 muestra la liberación acumulada de GO desde los andamios durante 28 días. Pasado todo este período de tiempo, la liberación de GO desde los andamios ACG/GO01 y ACG/GO1 no difieren sustancialmente y exhiben valores promedios de liberación acumulada de entre 6-10 μ g/mL de GO. Esta baja tasa de liberación no considera los cambios de medio de cultivo, lo que disminuiría la concentración de GO libre efectiva a la que se exponen las células a niveles seguros en términos de citotoxicidad.

4.6.3. Viabilidad de hADMSCs en constructos

En el caso de los constructos 3D bioimpresos, se estudió preliminarmente la sobrevivencia celular en el proceso de bioimpresión utilizando la biotinta basada en la formulación

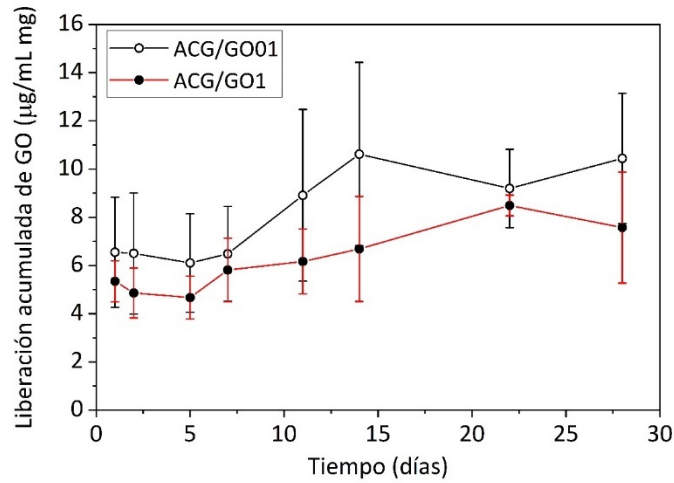


Figura 39. Perfil de liberación de GO desde los andamios nanocompuestos hidrogeles.

ACG/GO01 en las condiciones iniciales y que no permitió obtener constructos bien definidos. La Figura 40 muestra las imágenes de microscopía de fluorescencia de un ensayo *Live/Dead* de las células embebidas en esta biotinta, donde las hADMSCs exhibieron una excelente sobrevivencia al proceso de bioimpresión y una mortalidad despreciable hasta el día 14 de estudio. No obstante, la carencia de macroporos que permitan un flujo eficiente de nutrientes y desechos celulares en el constructo, indujo la migración celular hacia los bordes. Con este resultado, queda de manifiesto la necesidad de un diseño con macroporos en los andamios para promover una distribución celular homogénea en la totalidad del andamio.

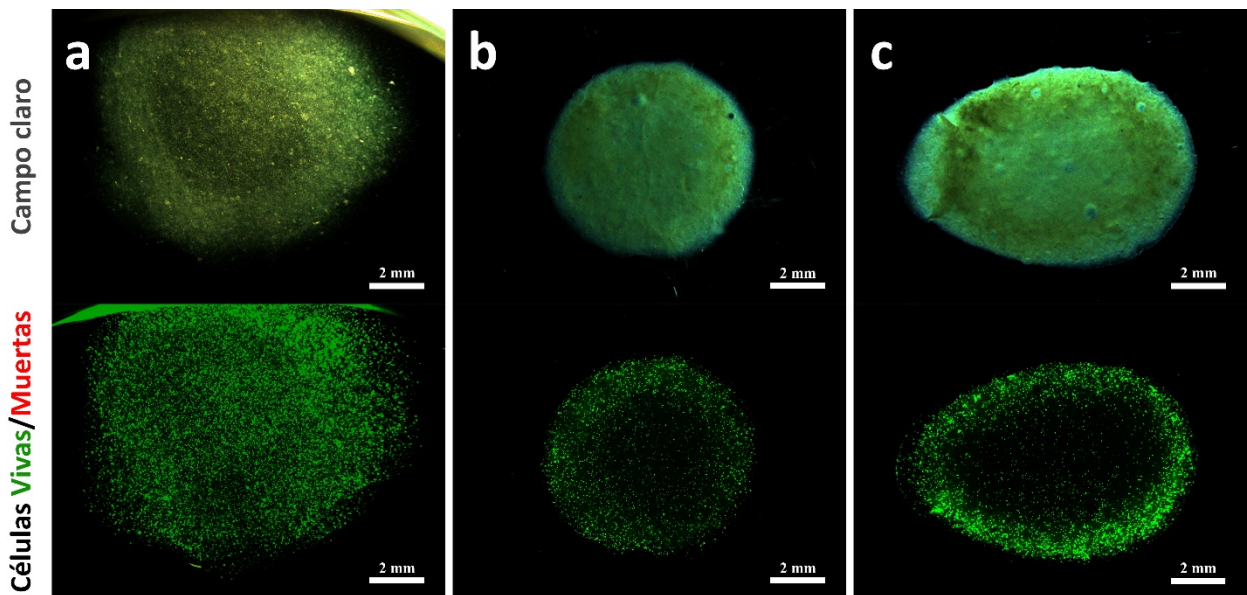


Figura 40. Microfotografías de fluorescencia de ensayo *Live/Dead* realizado preliminarmente a constructos no porosos 3D bioimpresos con biotinta basada en ACG/GO01. Las imágenes corresponden a los días 1 (a), 7 (b) y 14 (c) de cultivo.

Por otro lado, los ensayos *Live/Dead* realizados a los constructos 3D bioimpresos con la biotinta reformulada mostraron una elevada viabilidad celular hasta el día 21 de cultivo y una distribución celular homogénea, tal como se muestra en la Figura 41. Una de las técnicas más utilizada para bioimpresión 3D es mediante extrusión de la biotinta a través de una punta micrométrica, sin embargo, las principales desventajas de esta técnica son la moderada tasa de viabilidad celular (40-80 %) y la relativamente baja velocidad de impresión.¹³⁶ En este sentido, los resultados de bioimpresión 3D de este trabajo son sobresaliente ya que los constructos pueden imprimirse con un amplio rango de densidad celular ($8.4 \cdot 10^5$ a $3 \cdot 10^6$ hMSCs/mL) y a una velocidad de hasta 35 mm/s (límite del equipo utilizado), manteniendo una viabilidad celular cercana al 100 % durante varias semanas de cultivo *in vitro*. Transcurrido 21 días de cultivo de los constructos, se puede apreciar claramente un progresivo engrosamiento de las hebras del constructo (Figura 41), por lo que se podría inferir la producción de ECM por parte de las hADMSCs sumado a un posible hinchamiento del hidrogel.

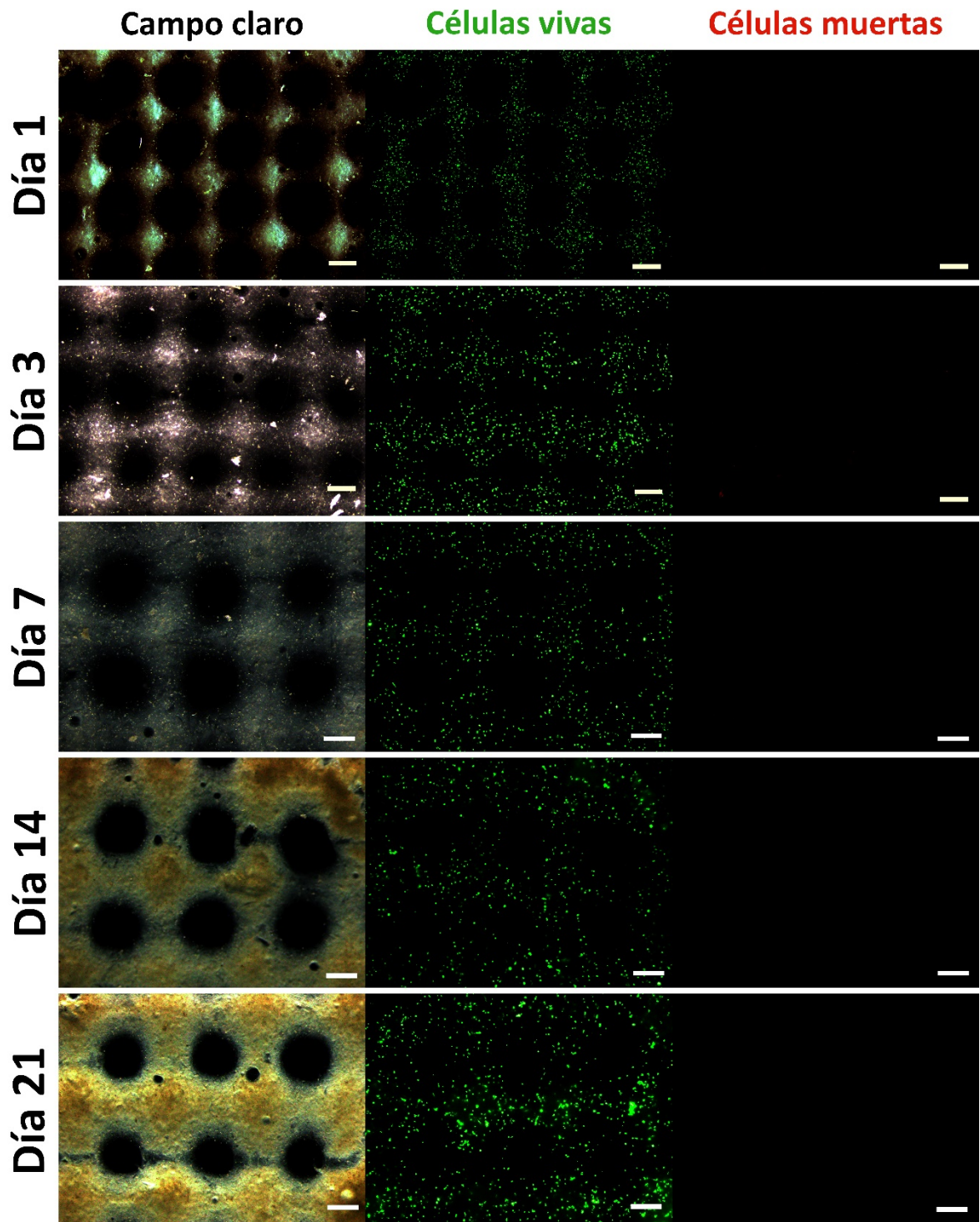


Figura 41. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo *Live/Dead* de los constructos 3D bioimpresos con la biotinta ACG/GO0.1 + hADMSCs observados a diferentes tiempos de cultivo (barra de escala = 600 μm).

4.6.4. Morfología y distribución celular en andamios

Para analizar la morfología y distribución de las hADMSCs en los andamios y constructos, se realizó una tinción fluorescente de los núcleos celulares con DAPI (azul en microfotografías de fluorescencia) y de los filamentos de actina que componen el citoesqueleto de las células utilizando faloidina (verde y rojo en microfotografías de fluorescencia). La Figura 42 muestra imágenes representativas de hADMSCs (pasaje 4) adheridas a andamios 3D impresos con ACG (Figura 42a-b), ACG/GO0.1 (Figura 42c-d) y ACG/GO1 (e y f).

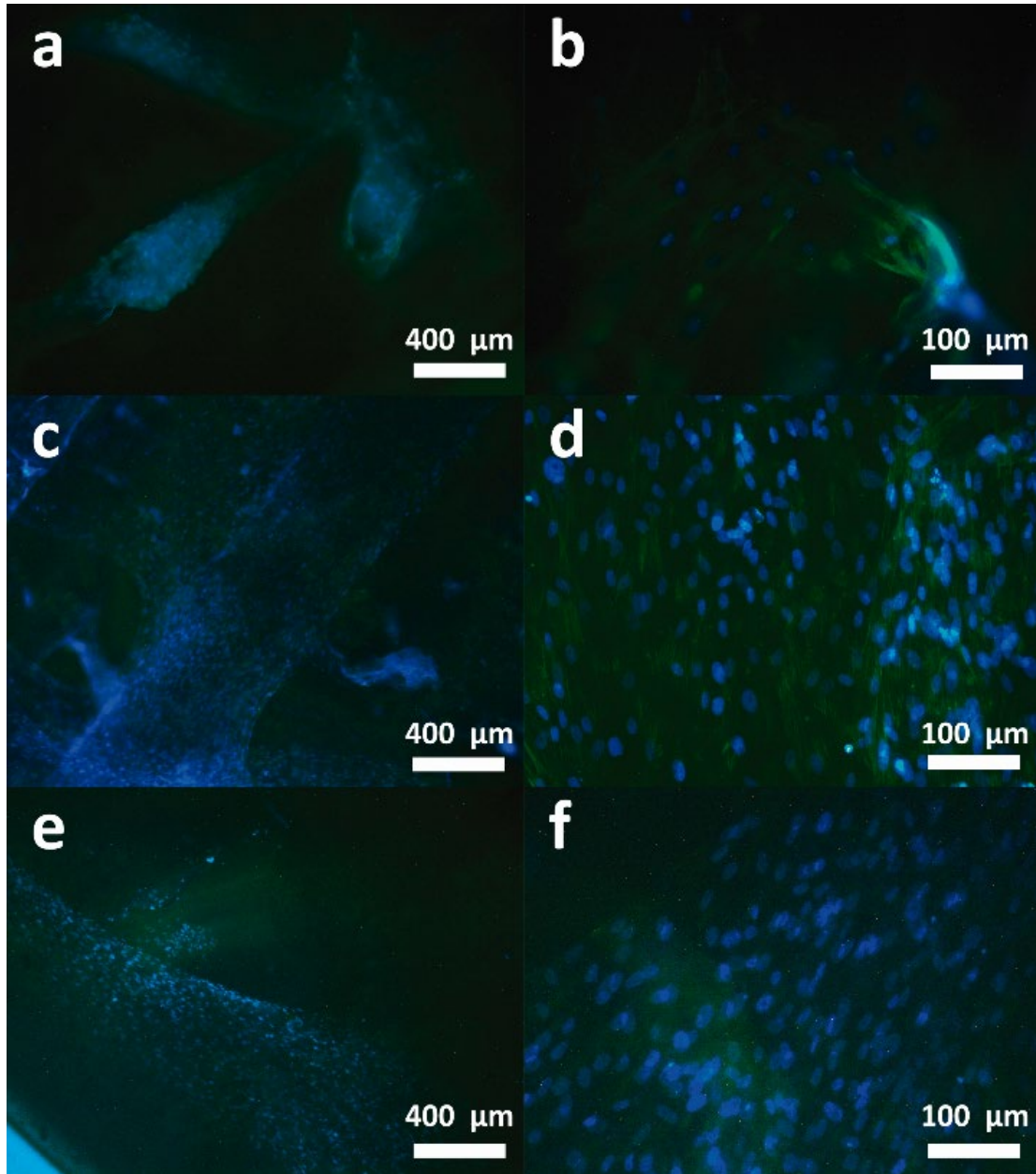


Figura 42. Microfotografías de fluorescencia de hADMSCs sembradas en los andamios 3D impresos, observados en el día 7 de cultivo. La actina F del citoesqueleto (verde) y núcleos (azul) de las hADMSCs se muestran en andamios de ACG (a y b), ACG/GO0.1 (c y d) y ACG/GO1 (e y f).

ACG/GO1 (Figura 42e-f), al día 7 de cultivo. Estos resultados ratifican lo observado mediante microscopía de contraste de fase (Figura 37), donde las hADMSCs en los andamios ACG tienden a formar agregados celulares de alta densidad y una distribución heterogénea sobre el andamio (Figura 42a), mientras que las hADMSCs sembradas en los andamios que contienen GO mostraron una mayor proliferación celular con una distribución más homogénea.

En particular, los andamios ACG/GO0.1 mostraron hADMSCs distribuidas uniformemente y con alta densidad celular a lo largo de las hebras impresas. El patrón bien definido de las hebras en forma de malla en los andamios 3D impresos con las tintas que contienen GO podría ayudar en la obtención de una distribución celular más ordenada, además se puede observar que los andamios de nanocompuestos las células exhiben una tendencia a alinearse a lo largo de las hebras de los andamios (Figura 42 d y f). Motivado por el orden molecular anisotrópico a lo largo del eje mayor de las hebras (Figura 22 y 23f), se estudió la direccionalidad de los filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto de las células adheridas a los andamios 3D impresos, mediante análisis de las microfotografías de las tinciones con TRITC-faloidina (utilizando el *plugin* Fiji¹³⁷ en el *software* ImageJ¹³⁸). La Figura 43 muestra las microfotografías de fluorescencia de cada andamio (arriba) y sus respectivos histogramas ángulo-frecuencia de alineamiento celular (abajo), donde el ángulo de 0 ° corresponde al eje longitudinal de la hebra en los andamios. Las imágenes fueron adquiridas el día 28 de cultivo en los andamios. En el andamio ACG las células están orientadas sin una dirección angular de preferencia y forman grandes cúmulos o agregados celulares (Figura 43a). La adición de GO incrementa considerablemente la direccionalidad en la proliferación celular, probablemente, debido a la estructura anisotrópica de las hebras 3D impresas (Figura 43b-c), siendo los andamios de composición ACG/GO01 los que

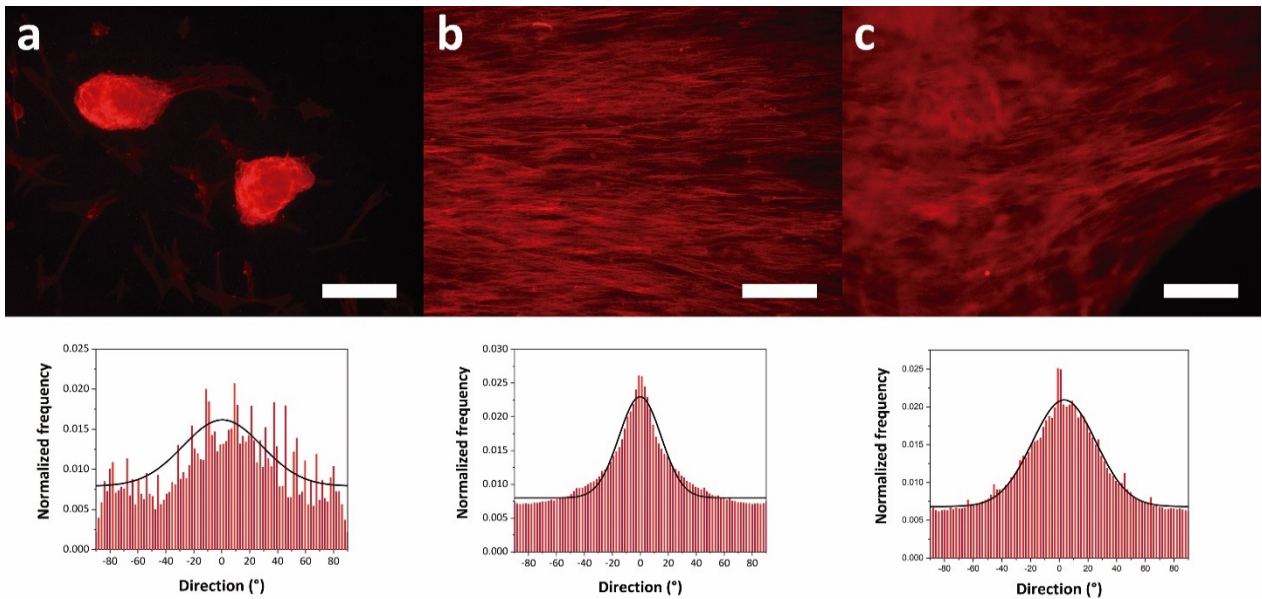


Figura 43. Análisis de direccionalidad celular en andamios ACG (a), ACG/GO01 (b) y ACG/GO1 (c). En la parte superior de la figura se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia de los filamentos de actina que estructuran el citoesqueleto de las células después de 28 días de cultivo en los andamios. En la parte inferior de la figura se muestran los histogramas de direccionalidad celular, contruidos a partir del análisis de las respectivas imágenes (barra de escala = 600 μ m).

exhibieron mayor alineamiento celular. Este resultado ofrece una nueva plataforma para una organización celular guiada por el biomaterial, donde se requiera estructuras anisotrópicas tal como en el tejido osteocondral, tendones y fibras musculares.

4.6.5. Morfología y distribución celular en constructos

Cuando las hADMSCs están embebidas en la biotinta, las células adoptan una morfología esférica como la observada en condrocitos en su nicho natural.¹³⁹ La Figura 44 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de hADMSCs (pasaje 14) en los constructos 3D bioimpresos en el día 3 de cultivo en MCA. Las microfotografías con baja magnificación (Figura 44a) develan una distribución homogénea de las células dentro del constructo bioimpreso. La Figura 44b muestra en detalle la estructura celular esferoide, donde se distingue claramente el núcleo (azul) rodeado del citoesqueleto (rojo). La Figura 45 es una imagen FE-SEM que muestra con mayor detalle la interacción de una hADMSC con la matriz biopolimérica en la biotinta, se puede apreciar la adhesión de la célula a la matriz mediante múltiples nanofibras y además se observan agregados esféricos alrededor de la célula que podrían ser proteínas secretadas por la misma célula o procedentes del suero fetal bovino utilizado como suplemento en la formulación de la biotinta y en el medio de cultivo.

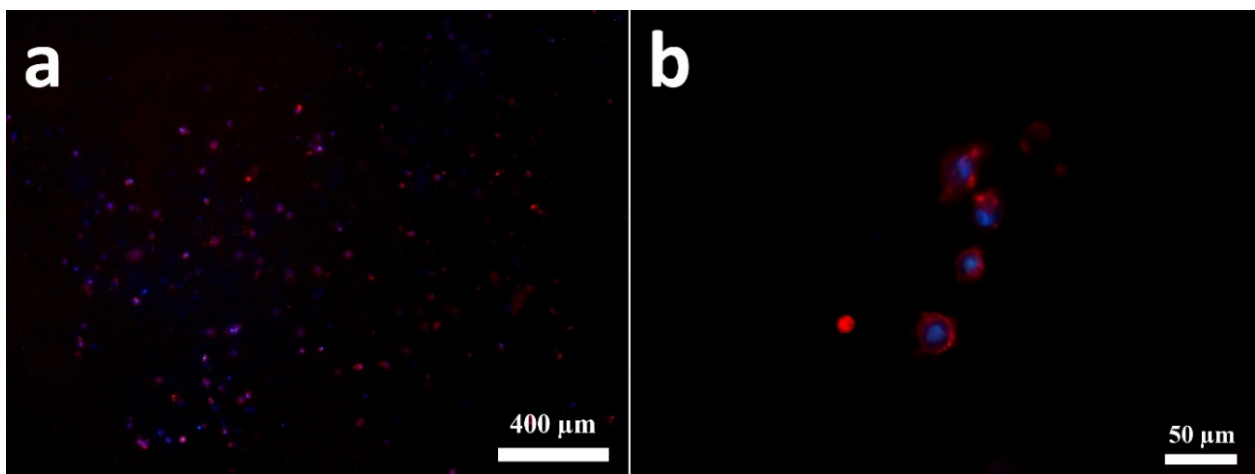


Figura 44. Microfotografías de fluorescencia de hADMSCs contenidas en los constructos 3D bioimpresos, observados en el día 3 de cultivo. La actina F del citoesqueleto de las hADMSCs se muestra en color rojo y los núcleos en azul. Las hADMSCs muestran una distribución homogénea en los constructos (a) adquiriendo una morfología esferoidal (b).

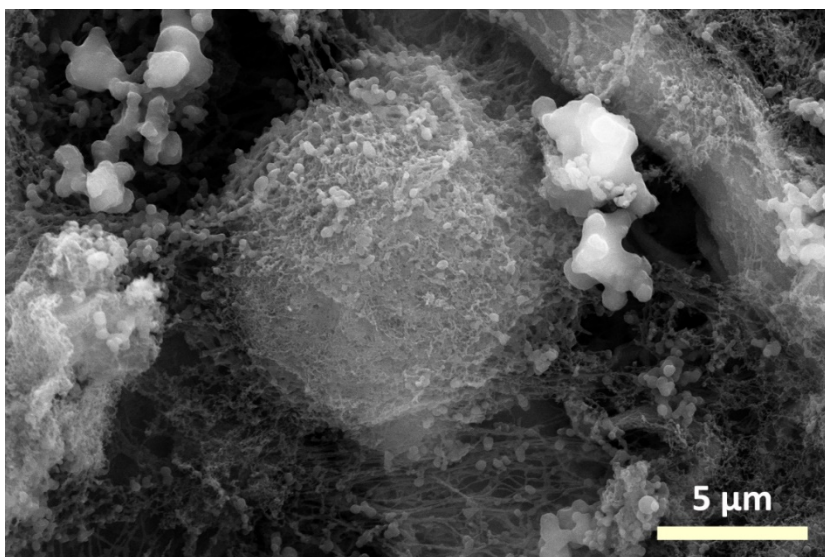


Figura 45. Microfotografía FE-SEM de una hADMSC en el seno de la biotinta de impresión.

4.6.6. Condrogénesis

El efecto del biomaterial en la diferenciación condrogénica de hADMSCs en los andamios y constructos fue estudiado mediante tinción de inmunofluorescencia de los marcadores condrogénicos colágeno tipo II (COLL II, matriz extracelular producida por condrocitos), agregano (ACAN, matriz extracelular producida por condrocitos) y SOX 9 (factor de transcripción durante la diferenciación de condrocitos).¹⁴⁰ En la Figura 46 se muestra imágenes estereomicroscópicas y microscópicas de fluorescencia de los tres tipos de andamios sembrados con hADMSCs y observados después de 28 días de cultivo en MCA (sin suplementos condrogénicos). Cabe destacar que la estrategia que usualmente se emplea para inducir la diferenciación condrogénica consiste en el uso de un medio de cultivo suplementado con un cóctel bioquímico (TGF- β , dexametasona, ácido L-ascórbico, prolina, piruvato de sodio, entre otros suplementos).^{127,141,142} La tinción de inmunofluorescencia se muestra en verde para todos los marcadores condrogénicos, como contra-tinción se utilizó faloidina y/o DAPI para indicar la ubicación de la actina F del citoesqueleto y los núcleos de las células (rojo y azul respectivamente). Se encontró expresión positiva de COLL II, ACAN y SOX 9 en los tres andamios de diferente composición (ACG, ACG/GO0.1 y ACG/GO1), develando la naturaleza condroinductiva de la matriz biopolimérica, basada en alginato bioconjugado con gelatina y sulfato de condroitina, la que provoca la diferenciación de hADMSCs al fenotipo de condrocitos. Se observó además agregados de alta densidad celular en los andamios sin GO y con alta concentración de GO (ACG y ACG/GO1 respectivamente, Figura 46 arriba y abajo). Comparado con las imágenes después de 7 días (Figura 42e-f), las células en ACG/GO1 tienden a formar agregados después de 28 días en cultivo. En contraste, la presencia de GO a bajas concentraciones (ACG/GO0.1) mejora notablemente la distribución celular y la deposición de ECM en los andamios 3D impresos, exhibiendo una proliferación celular homogénea y alineada sobre las hebras de los andamios, macroporos y alrededor de los bordes de los andamios (Figura 46 al centro). La Figura 47 muestra una microfotografía representativa de las células diferenciadas donde se aprecia la formación de neocartílago estructurado anisotrópicamente en los andamios ACG/GO01.

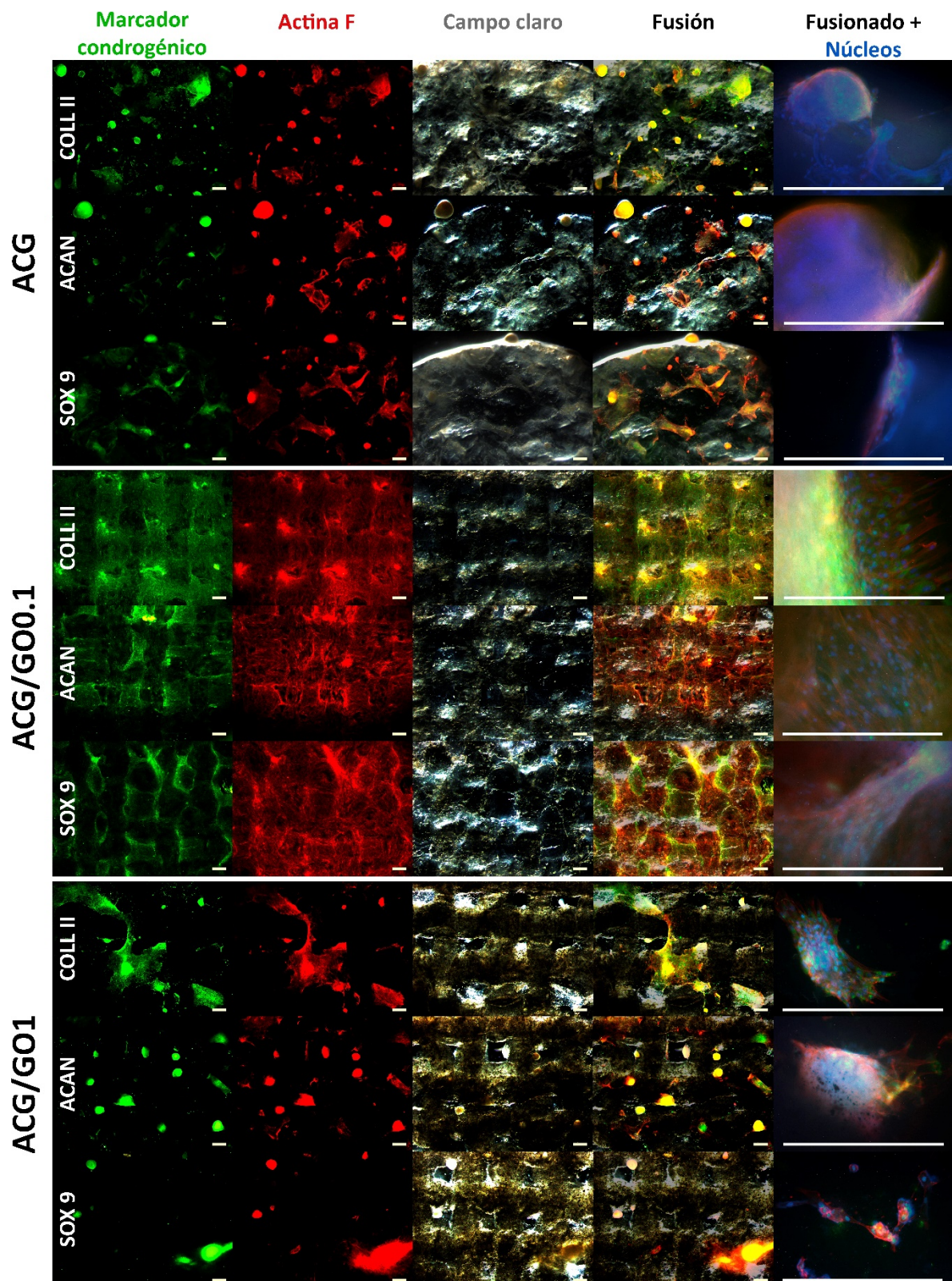


Figura 46. Imágenes de inmunotinción fluorescente para los marcadores condrogénicos (verde) colágeno tipo II (COLL II), agregcano (ACAN) y SOX 9 en los andamios 3D impresos: ACG (arriba), ACG/GO0.1 (al medio) and ACG/GO1 (abajo), después de 28 días de cultivo en MCA. La actina F del citoesqueleto (rojo) y los núcleos (azul) de las hADMSCs se muestran como contra-tinción (barra de escala = 500 μ m).

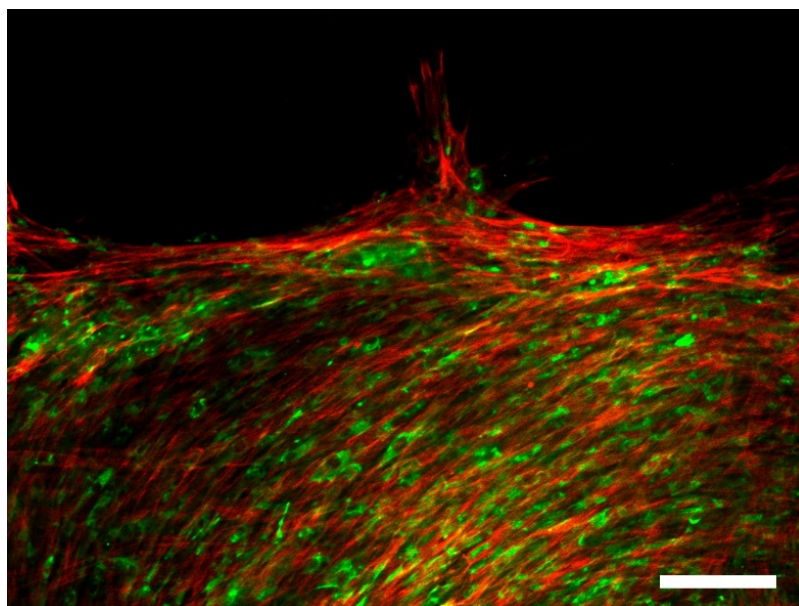


Figura 47. Imagen de inmunotinción fluorescente para colágeno tipo II (verde) en el borde de un andamio 3D impresos con tinta ACG/GO0.1, después de 28 días de cultivo en MCA. La actina F del citoesqueleto de las hADMSCs se muestra en rojo, exhibiendo un claro alineamiento celular guiado por las hebras del andamio (barra de escala = 200 μm).

Por otra parte, el estudio mediante inmunofluorescencia realizado a los constructos bioimpresos también muestran la secreción de los marcadores condrogénicos analizados (Figura 48). Las imágenes muestran una menor cantidad de analito comparado con los andamios, esto se debe probablemente a la menor densidad celular sumado a la limitada movilidad dentro de las hebras bioimpresas. No obstante, después de 35 días de cultivo en MCA se observó la producción de COLL II, ACAN y SOX 9 en el medio extra- e intracelular. De esta manera, el proceso de preparación de la biotinta y posterior extrusión durante la bioimpresión no afecta las características condroinductivas del biomaterial.

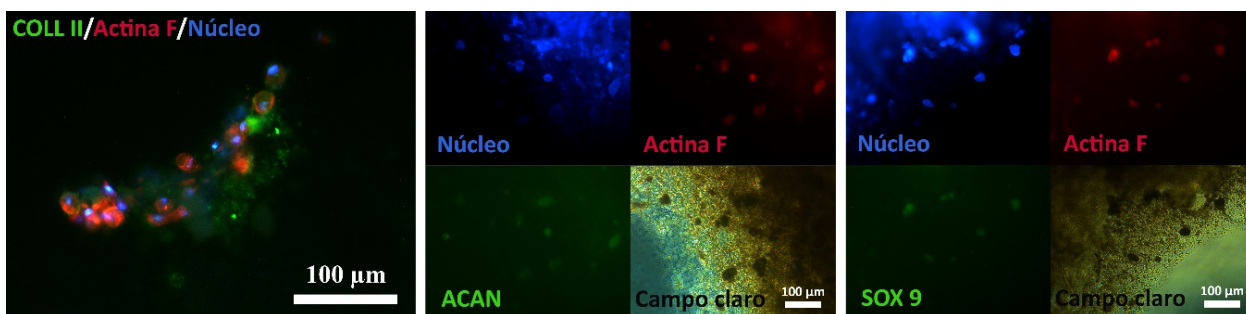


Figura 48. Imágenes de inmunotinción fluorescente para marcadores condrogénicos en constructos 3D bioimpresos, después de 35 días de cultivo en MCA. En las imágenes para ACAN y SOX se muestran en los distintos canales de color para una mejor visualización.

Para cuantificar y comparar el efecto del GO y la bioimpresión en las propiedades condroinductivas de los biomateriales desarrollados, se estudió la expresión génica de marcadores condrogénicos mediante RT-qPCR en las células cultivadas en los andamios y constructos utilizando medio no-condrogénico (MCA). La Figura 49 muestra el cambio en la proporción (*fold-change*) de la expresión genética de los marcadores asociado a la secreción de colágeno tipo I (COLL I), colágeno tipo II (COLL II), agregano (ACAN) y SOX 9. Se utilizó como referencia hADMSCs cultivadas en una placa de poliestireno (cultivo 2D), estudiando el efecto de la composición de los andamios (Figura 49a) y el efecto de la bioimpresión a distintos tiempos de cultivo en MCA (Figura 49b). El efecto de la composición química de los andamios se analizó luego de 28 días de cultivo, en este punto la expresión del marcador de transcripción condrogénica SOX 9 fue significativamente superior en los andamios ACG, comparado con los andamios que sólo contenían alginato y gelatina (AG). Este resultado indica que la incorporación de SC en los andamios promueve la diferenciación condrogénica, puesto que este tipo de GAG es capaz de modular la actividad de factores de crecimientos secretados por las células durante la condrogénesis.¹⁴³ En tanto la expresión génica positiva de COLL II y ACAN en andamios AG fue menor que en ACG, pero no mostraron diferencias estadísticas significativas (Figura 49a). Esto indica que el ALG bioconjugado solamente con GEL es capaz, al menos, de estimular la secreción de ECM de cartílago.

La expresión génica de COLL II y SOX 9 fue considerablemente superior en los andamios ACG/GO1, evidenciando un efecto coadyuvante del GO en el proceso de diferenciación celular mediante la activación de transcriptor SOX 9 así como en la producción de ECM. La expresión génica de ACAN fue significativamente inferior en ACG/GO1 que, en el resto de los andamios analizados, lo que indicaría un efecto inhibitorio del GO en altas concentraciones en la secreción de ACAN en etapas tardías (28 días), o bien, que el máximo de expresión génica de ACAN se haya alcanzado en un tiempo previo o posterior al análisis. Un reciente trabajo pionero en estudiar el efecto del GO en la diferenciación condrogénica de MSCs en nanocompósitos hidrogeles basados en ácido poli(D-L-láctico)/poli(etilenglicol), demostró la capacidad condroinductiva del GO en ausencia de factores de crecimiento condroinductivos.⁷² Este estudio sugiere que el efecto

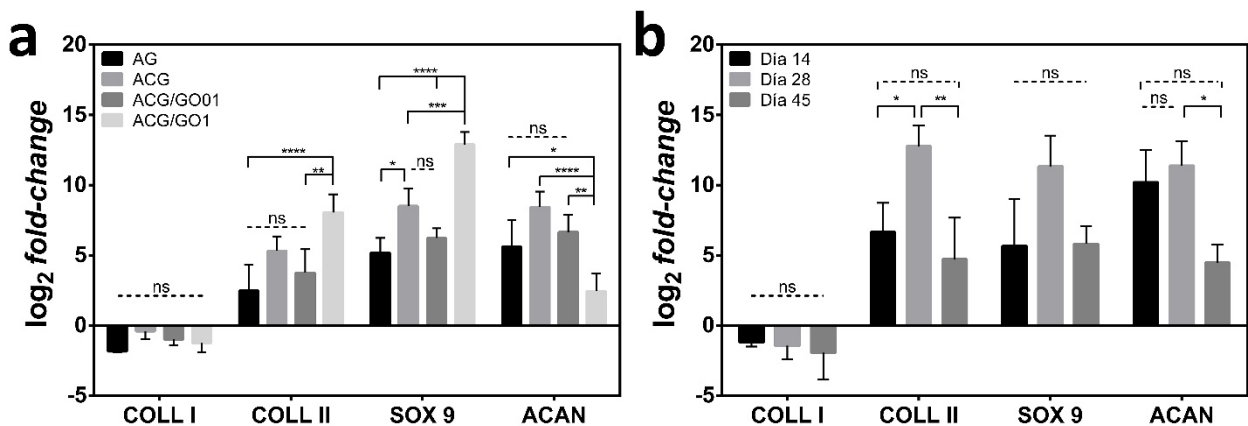


Figura 49. Expresión génica de marcadores condrogénicos analizados mediante RT-qPCR. Efecto de la composición química de los andamios 3D impresos (AG: control de alginato y gelatina) en el día 28 de cultivo (a). Efecto del tiempo de cultivo de constructos 3D bioimpresos (b). (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ y ****: $p < 0.0001$).

condroinductivo del GO se puede deber a la capacidad secuestrante de señalizadores condrogénico, que incrementa la concentración local de estímulos pro-condrogénesis. Por otro lado, el aumento de cargas negativas debido a los grupos carboxilatos del GO podría incrementar la osmolaridad (hiperosmolaridad) y en consecuencia favorecería la condrogénesis.⁴⁷ Los estudios de inmunofluorescencia ya daban indicios que el proceso de bioimpresión no afectaba la capacidad condroinductiva del biomaterial, esto se corrobora con el análisis mediante RT-qPCR donde se cuantificó los niveles de expresión génica de marcadores condrogénicos al día 14, 28 y 45 *post* bioimpresión. La Figura 49b muestra que pasado 14 días de cultivo de los constructos bioimpresos en MCA, ya se expresaron positivamente los tres marcadores condrogénicos y se tuvo un máximo de expresión relativa en el día 28. Estos resultados replican el periodo que usualmente tarda el proceso de diferenciación condrogénica cuando se utilizan medios de cultivos con suplementos bioquímicos condrogénicos, lo que convierte este nuevo biomaterial en un medio intrínsecamente condroinductivo para potenciales aplicaciones en terapias regenerativas de tejido cartilaginoso. En la Figura 50 se muestra un esquema del proceso condrogénico de las hADMSCs, donde se indica los dos mecanismos posibles para explicar el efecto condroinductivo del biomaterial desarrollado. Por un lado, el SC regula la acción de TGFβ que desencadena el proceso de transcripción génica (evidenciada por la expresión de SOX 9) que origina la condrogénesis y, por otro lado, el microambiente hiperosmótico que estimula receptores osmosensibles que inducen la condrogénesis. En consecuencia, la diferenciación condrogénica estimula la secreción de ECM propia del cartílago para así generar tejido nuevo.

Adicionalmente a los marcadores condrogénicos, se analizó la expresión del gen asociado a la producción de COLL I, independiente de la composición química de los biomateriales testeados la expresión génica de COLL I fue negativa relativo a las hADMSCs del control de cultivo 2D. La supresión en la expresión génica de COLL I indica que el proceso de diferenciación condrogénica ocurre sin desdiferenciación y no sigue una ruta de formación de tejido fibrilar (fibrocartílago).¹⁴⁴

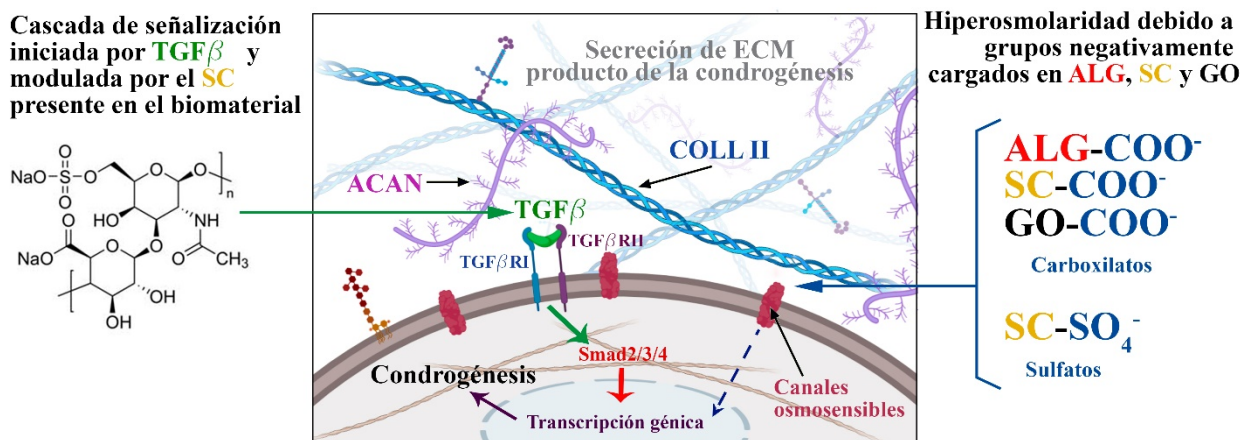


Figura 50. Mecanismo de diferenciación condrogénica en hADMSCs. En el esquema se muestran dos posibles vías de condroinducción debido a los nanocompuestos: cascada de señalización iniciada por TGFβ que es modulada por el SC (izquierda) y respuesta al medio extracelular hiperosmótico (derecha).

En resumen, el estudio de las propiedades condroinductivas de los biomateriales desarrollados muestra que la composición química del hidrogel (biopolímeros) cumple un rol clave en la bioactividad del material, ya que imita el medio ambiente de las células en el cartílago. Si bien el hidrogel bioconjugado, ACG, mostró biocompatibilidad y características intrínsecamente condrogénicas, la procesabilidad como tinta para impresión 3D es limitada al compararse con los nanocompuestos debido a las diferencias en sus propiedades reológicas. Además, la presencia de GO en bajas concentraciones evitó la formación de grandes agregados celulares, como los que se observaron en la formulación ACG desde etapas tempranas de cultivo. La incorporación de GO en los andamios mejoró la adhesión y distribución celular en etapas tempranas de cultivo e incrementó la capacidad condrogénica del biomaterial. Además, el desempeño del GO depende de su concentración dado que si bien los andamios ACG/GO1 exhibieron un mejor desempeño condrogénico, la formación de agregados celulares en etapas tardías de cultivo convierten la formulación ACG/GO01 en una mejor opción en la fabricación de andamios. La bioactividad del GO en estos nanocompuestos como coadyuvante en el proceso de proliferación y condrogénesis puede deberse tanto a la capacidad de adsorción de factores de crecimiento, proteínas y nutrientes de forma localizada, como también al incremento de la densidad de cargas negativas que aumenta la osmolaridad. La formulación de la tinta ACG/GO01 y la biotinta de composición homóloga (misma proporción ALG:SC:GEL mas 0.1 mg mL^{-1} de GO), presentan un equilibrio óptimo entre procesabilidad para la obtención de andamios y constructos, así como bioactividad y distribución celular. Adicionalmente, estos nanocompuestos hidrogeles permiten obtener hebras anisotrópicas debido al ordenamiento líquido cristalino del GO, las cuales guiaron la proliferación celular. La Figura 51 muestra un esquema que resume el presente trabajo de tesis, destacando los resultados más relevantes.

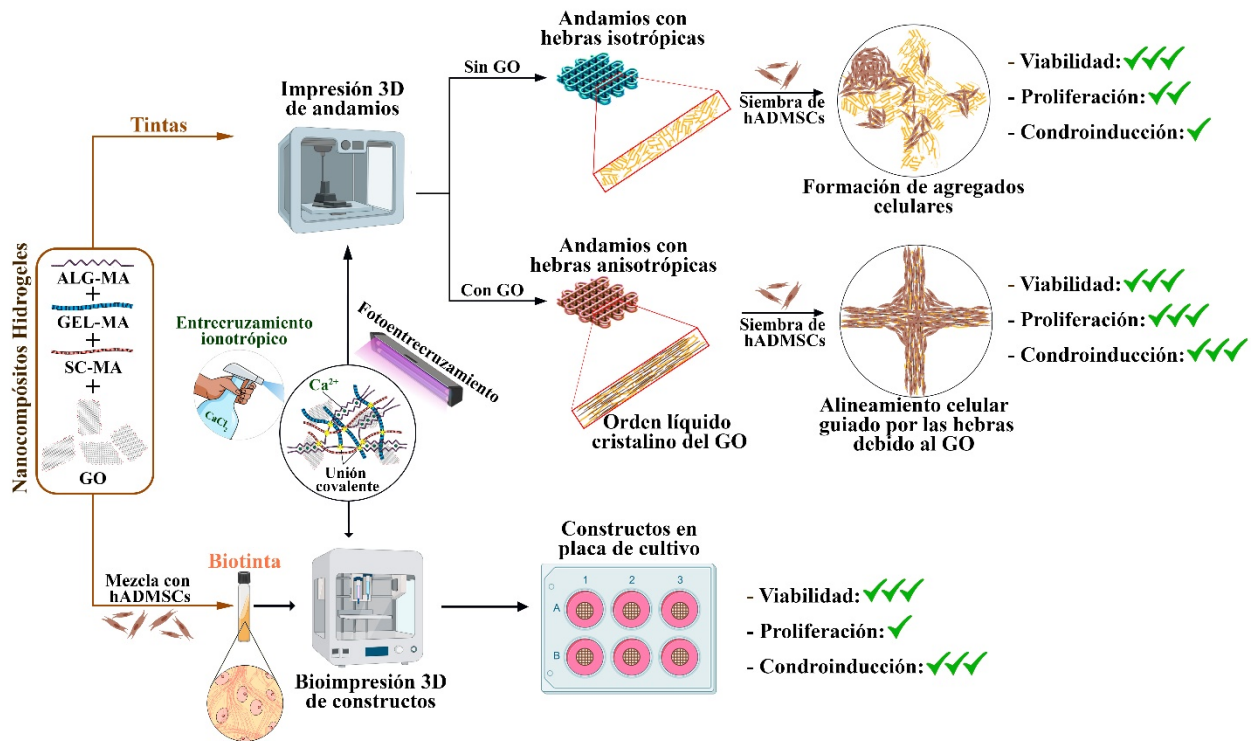


Figura 51. Resumen gráfico esquemático de trabajo de tesis. De izquierda a derecha se muestra los componentes base de las tintas de impresión 3D de andamios y de la biotinta para la fabricación de constructos mediante bioimpresión 3D. Los distintos resultados en términos de la viabilidad, proliferación y condroiducción celular se representa comparativamente.

5. Conclusiones

En este trabajo de tesis doctoral se presenta un nuevo tipo de hidrogel nanocompósito para ser utilizado en tintas de impresión y bioimpresión 3D de andamios y constructos condroinductivos. El material está basado en alginato bioconjugado mediante entrecruzamiento covalente con gelatina y sulfato de condroitina, utilizando óxido de grafeno como relleno en la formulación de tintas de impresión y bioimpresión 3D de andamios y constructos, respectivamente.

La metacrilación de los polímeros naturales utilizados es una estrategia sencilla de modificación química que permite la bioconjugación de alginato con biopolímeros bioactivos mediante foto-entrecruzamiento, lo cual fue implementado en el proceso de impresión y bioimpresión 3D después de un entrecruzamiento primario de tipo termo- ionotrópico.

La incorporación de óxido de grafeno en la tinta de impresión mejora su procesabilidad en la etapa de impresión/bioimpresión, obteniendo estructuras con mayor fidelidad de forma y resolución comparado con la formulación sin GO. La calidad de impresión superior en los andamios con GO se debe a las mejores propiedades tixotrópicas de las tintas, que permiten imprimir hebras más delgadas y evitar así la fusión con hebras vecinas. Las hebras impresas con los nanocompósitos hidrogeles exhiben anisotropía estructural, probablemente inducidas por el comportamiento líquido cristalino del GO, con interesantes proyecciones para aplicaciones en ingeniería de tejido donde se requiera de alineamiento celular.

Los andamios bioconjugados fabricados muestran citocompatibilidad con hADMSCs en ensayos *in vitro* y las muestras con GO presentan sobresaliente proliferación, alineamiento y distribución celular en los andamios. El crecimiento anisotrópico de las células, guiado por las hebras anisotrópicamente impresas debido al estado líquido cristalino del GO, es un resultado sin precedentes y ofrece una atractiva arista en aplicaciones biomédicas del GO. La formulación con 0.1 mg mL^{-1} de GO se utilizó como base en combinación con hADMSCs para efectuar la bioimpresión 3D de constructos, exhibiendo extraordinaria viabilidad celular a largo plazo y alta calidad de impresión.

El análisis mediante inmunofluorescencia y el estudio de expresión génica indican que la matriz polimérica de alginato bioconjugado es intrínsecamente condroinductivo en la diferenciación de hADMSCs sin la necesidad de utilizar medio de cultivo con agentes y factores pro-condrogénesis. La adición de GO potencia la diferenciación condrogénica, promoviendo así la formación de neocartílago. Estos resultados son muy relevantes, puesto que el desarrollo de biomateriales intrínsecamente condroinductivos ha sido muy poco reportado.

La biocompatibilidad y bioactividad superior entre los nanocompósitos hidrogeles formulados y las hADMSCs, sumado a la gran procesabilidad en las técnicas de impresión y bioimpresión 3D empleadas, posiciona este nuevo biomaterial como candidato para su uso en la reparación de tejido cartilaginoso.

6. Bibliografia

1. Huebsch N, Mooney DJ. 2009. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* 462(7272):426-432.
2. Shafiee A, Atala A. 2016. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annual Review of Medicine* 68(1):29-40.
3. Parekkadan B, Milwid JM. 2010. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering* 12(1):87-117.
4. Xia H, Li X, Gao W, Fu X, Fang RH, Zhang L, Zhang K. 2018. Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells. *Nature Reviews Materials* 3(7):174-193.
5. Calikoglu Koyuncu AC, Gurel Pekozer G, Ramazanoglu M, Torun Kose G, Hasirci V. 2017. Cartilage tissue engineering on macroporous scaffolds using human tooth germ stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11(3):765-777.
6. Vinatier C, Guicheux J. 2016. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 59(3):139-144.
7. Adam I. Biener; Sandra L. Decker; Fredrick Rohde. 2019. Source of Increased Health Care Spending in the United States. *JAMA* 321(12):1147.
8. Hawker GA. 2019. Osteoarthritis is a serious disease. *Clinical and experimental rheumatology* 37(5):3-6.
9. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>.
10. Hoffman T, Khademhosseini A, Langer R. 2019. Chasing the Paradigm: Clinical Translation of 25 Years of Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part A* 25(9-10):679-687.
11. Naahidi S, Jafari M, Logan M, Wang Y, Yuan Y, Bae H, Dixon B, Chen P. 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 35(5):530-544.
12. Feksa LR, Troian EA, Muller CD, Viegas F, Machado AB, Rech VC. 2018. Hydrogels for biomedical applications. *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications* 64:403-438.
13. Du X, Zhou J, Shi J, Xu B. 2015. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chemical Reviews* 115(24):acs.chemrev.5b00299.
14. Hu W, Wang Z, Xiao Y, Zhang S, Wang J. 2019. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials Science* 7(3):843-855. doi:10.1039/c8bm01246f
15. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. 2013. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today* 16(12):496-504.
16. Stoppel WL, Ghezzi CE, McNamara SL, III LDB, Kaplan DL. 2015. Clinical Applications of Naturally Derived Biopolymer-Based Scaffolds for Regenerative Medicine. *Annals of*

Biomedical Engineering 43(3):657-680.

17. Caló E, Khutoryanskiy V V. 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* 65:252-267.
18. Dhahri W, Romagnuolo R, Laflamme MA. 2018. Training heart tissue to mature. *Nature Biomedical Engineering* 2(6):351-352.
19. Lee JH, Kim HW. 2018. Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering* 9:0-3.
20. Balakrishnan B, Banerjee R. 2011. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chemical reviews* 111(8):4453-4474.
21. Kalia J, Raines RT. 2012. Advances in Bioconjugation. *Curr Org Chem* 29(2):997-1003.
22. Choi JR, Yong KW, Choi JY, Cowie AC. 2019. Recent advances in photo-crosslinkable hydrogels for biomedical applications. *BioTechniques* 66(1):40-53.
23. Klotz BJ, Gawlitta D, Rosenberg AJWP, Malda J, Melchels FPW. 2016. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology* 34(5):394-407.
24. Lee KY, Mooney DJ. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 37(1):106-126.
25. Uthaman N, Majeed A, Pandurangan. 2006. Alginate gelling process: Use of bivalent ions rich microspheres. *E-Polymers* 2006:1-9.
26. Sarker B, Singh R, Silva R, Roether JA, Kaschta J, Detsch R, Schubert DW, Cicha I, Boccaccini AR. 2014. Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel. *PLoS ONE* 9(9):1-12.
27. Ruvinov E, Tavor Re'em T, Witte F, Cohen S. 2019. Articular cartilage regeneration using acellular bioactive affinity-binding alginate hydrogel: A 6-month study in a mini-pig model of osteochondral defects. *Journal of Orthopaedic Translation* 16(September):40-52.
28. Utech S, Boccaccini AR. 2016. *A Review of Hydrogel-Based Composites for Biomedical Applications: Enhancement of Hydrogel Properties by Addition of Rigid Inorganic Fillers*. Vol 51. Springer US; 2016. doi:10.1007/s10853-015-9382-5
29. Dong Y, Sigen A, Rodrigues M, Li X, Kwon SH, Kosaric N, Khong S, Gao Y, Wang W, Gurtner GC. 2017. Injectable and Tunable Gelatin Hydrogels Enhance Stem Cell Retention and Improve Cutaneous Wound Healing. *Advanced Functional Materials* 27(24):1-12.
30. Jang J, Park JY, Gao G, Cho DW. 2018. Biomaterials-based 3D cell printing for next-generation therapeutics and diagnostics. *Biomaterials* 156:88-106.
31. Yao R, Zhang R, Luan J, Lin F. 2012. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation. *Biofabrication* 4(2).

32. Giol ED, Van Vlierberghe S, Unger RE, Kersemans K, De Vos F, Kirkpatrick CJ, Dubruel P. 2019. Biomimetic strategy towards gelatin coatings on PET. Effect of protocol on coating stability and cell-interactive properties. *Journal of Materials Chemistry B* 7(8):1258-1269.
33. Abedin MJ, Gamot TD, Martin ST, Ali M, Hassan KI, Mirshekarloo MS, Tabor RF, Green MJ, Majumder M. 2019. Graphene Oxide Liquid Crystal Domains: Quantification and Role in Tailoring Viscoelastic Behavior. *ACS Nano* 13(8):8957-8969.
34. Muzzarelli RAA, Greco F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A. 2012. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymers* 89(3):723-739.
35. Choe G, Park J, Jo H, Kim YS, Ahn Y, Lee JY. 2019. Studies on the effects of microencapsulated human mesenchymal stem cells in RGD-modified alginate on cardiomyocytes under oxidative stress conditions using in vitro biomimetic co-culture system. *International Journal of Biological Macromolecules* 123:512-520.
36. Costantini M, Idaszek J, Szöke K, Jaroszewicz J, Dentini M, Barbetta A, Brinckmann JE, Świąszkowski W. 2016. 3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation. *Biofabrication* 8(3).
37. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. 2009. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* 1(6):461-468.
38. Gentili C, Cancedda R. 2009. Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Current Pharmaceutical Design* 15:1334-1348.
39. Rnjak-Kovacina J, Tang F, Whitelock JM, Lord MS. 2018. Glycosaminoglycan and Proteoglycan-Based Biomaterials: Current Trends and Future Perspectives. *Advanced Healthcare Materials* 7(6):1-15.
40. Freudenberg U, Liang Y, Kiick KL, Werner C. 2016. Glycosaminoglycan-Based Biohybrid Hydrogels: A Sweet and Smart Choice for Multifunctional Biomaterials. *Advanced Materials* 28(40):8861-8891.
41. Teong B, Wu SC, Chang CM, Chen JW, Chen HT, Chen CH, Chang JK, Ho ML. 2018. The stiffness of a crosslinked hyaluronan hydrogel affects its chondro-induction activity on hADSCs. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 106(2):808-816.
42. Wang T, Lai JH, Yang F. 2016. Effects of Hydrogel Stiffness and Extracellular Compositions on Modulating Cartilage Regeneration by Mixed Populations of Stem Cells and Chondrocytes *In Vivo*. *Tissue Engineering Part A* 22(23-24):1348-1356.
43. Wang T, Yang F. 2017. A comparative study of chondroitin sulfate and heparan sulfate for directing three-dimensional chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* 8(1):1-12.
44. Chen W-C, Wei Y-H, Chu I-M, Yao C-L. 2013. Effect of chondroitin sulphate C on the *in vitro* and *in vivo* chondrogenesis of mesenchymal stem cells in crosslinked type II collagen

- scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 7(8):665-672.
45. Goude MC, McDevitt TC, Temenoff JS. 2014. Chondroitin sulfate microparticles modulate transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cell spheroids. *Cells Tissues Organs* 199:117-130.
 46. Klüppel M, Wight TN, Chan C, Hinek A, Wrana JL. 2005. Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis. *Development* 132(17):3989-4003.
 47. Alliston T. 2010. Chondroitin sulfate and growth factor signaling in the skeleton: Possible links to MPS VI. *Journal of Pediatric Rehabilitation Medicine* 3(2):129-138.
 48. Sawatjui N, Limpai boon T, Schrobback K, Klein T. 2018. Biomimetic scaffolds and dynamic compression enhance the properties of chondrocyte- and MSC-based tissue-engineered cartilage. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(5):1220-1229.
 49. Kim HD, Lee EA, An YH, Kim SL, Lee SS, Yu SJ, Jang HL, Nam KT, Im SG, Hwang NS. 2017. Chondroitin Sulfate-Based Biomineralizing Surface Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials and Interfaces* 9(26):21639-21650.
 50. Li T, Song X, Weng C, Wang X, Sun L, Gong X, Yang L, Chen C. 2018. Self-crosslinking and injectable chondroitin sulfate/pullulan hydrogel for cartilage tissue engineering. *Applied Materials Today* 10:173-183.
 51. Meghdadi M, Pezeshki-Modaress M, Irani S, Atyabi SM, Zandi M. 2019. Chondroitin sulfate immobilized PCL nanofibers enhance chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 136:616-624.
 52. Chen F, Yu S, Liu B, Ni Y, Yu C, Su Y, Zhu X, Yu X, Zhou Y, Yan D. 2016. An Injectable Enzymatically Crosslinked Carboxymethylated Pullulan/Chondroitin Sulfate Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering. *Scientific Reports* 6(January):1-12.
 53. Schminke B, Miosge N. 2014. Cartilage Repair In Vivo: The Role of Migratory Progenitor Cells. *Current Rheumatology Reports* 16(11):1-8.
 54. Conrad B, Han L-H, Yang F. 2018. Gelatin-based microribbon hydrogels accelerate cartilage formation by mesenchymal stem cells in 3D. *Tissue Engineering Part A* (650):ten.TEA.2018.0011.
 55. Honarpardaz A, Irani S, Pezeshki-Modaress M, Zandi M, Sadeghi A. 2019. Enhanced chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on gelatin/glycosaminoglycan electrospun nanofibers with different amount of glycosaminoglycan. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 107(1):38-48.
 56. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. 2012. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* 33(26):6020-6041.

57. Kamoun EA, Abu-Saied MA, Doma AS, Menzel H, Chen X. 2018. Influence of degree of substitution and folic acid coinitiator on pullulan-HEMA hydrogel properties crosslinked under visible-light initiating system. *International Journal of Biological Macromolecules* 116(2017):1175-1185.
58. Stagnaro P, Schizzi I, Utzeri R, Marsano E, Castellano M. 2018. Alginate-polymethacrylate hybrid hydrogels for potential osteochondral tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* 185:56-62.
59. Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martínez Ávila H, Hägg D, Gatenholm P. 2015. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 16(5):1489-1496.
60. Naumenko EA, Guryanov ID, Yendluri R, Lvov YM, Fakhrullin RF. 2016. Clay nanotube-biopolymer composite scaffolds for tissue engineering. *Nanoscale* 8(13):7257-7271.
61. Motealleh A, Kehr NS. 2017. Nanocomposite Hydrogels and Their Applications in Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* 6(1).
62. Mehrali M, Thakur A, Pennisi CP, Talebian S, Arpanaei A, Nikkhah M, Dolatshahi-Pirouz A. 2017. Nanoreinforced Hydrogels for Tissue Engineering: Biomaterials that are Compatible with Load-Bearing and Electroactive Tissues. *Advanced Materials* 29(8).
63. Dreyer DR, Todd AD, Bielawski CW. 2014. Harnessing the chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* 43(15):5288-5301.
64. Dasari Shareena TP, McShan D, Dasmahapatra AK, Tchounwou PB. 2018. A Review on Graphene-Based Nanomaterials in Biomedical Applications and Risks in Environment and Health. *Nano-Micro Letters* 10(3).
65. Pan C, Liu L, Gai G. 2017. Recent Progress of Graphene-Containing Polymer Hydrogels: Preparations, Properties, and Applications. *Macromolecular Materials and Engineering* 302(10):1-14.
66. Hu Y, Han W, Huang G, Zhou W, Yang Z, Wang C. 2016. Highly Stretchable, Mechanically Strong, Tough, and Self-Recoverable Nanocomposite Hydrogels by Introducing Strong Ionic Coordination Interactions. *Macromolecular Chemistry and Physics* 217(24):2717-2725.
67. Rojas-Andrade MD, Chata G, Rouholiman D, Liu J, Saltikov C, Chen S. 2017. Antibacterial mechanisms of graphene-based composite nanomaterials. *Nanoscale* 9(3):994-1006.
68. Mohammadrezaei D, Golzar H, Rezai Rad M, Omidi M, Rashedi H, Yazdian F, Khojasteh A, Tayebi L. 2018. In vitro effect of graphene structures as an osteoinductive factor in bone tissue engineering: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 106(8):2284-2343.
69. Kim J, Yang K, Lee JS, Hwang YH, Park HJ, Park KI, Lee DY, Cho SW. 2017. Enhanced Self-Renewal and Accelerated Differentiation of Human Fetal Neural Stem Cells Using Graphene Oxide Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience* 17(8):1-10.

70. Patel M, Moon HJ, Ko DY, Jeong B. 2016. Composite System of Graphene Oxide and Polypeptide Thermogel As an Injectable 3D Scaffold for Adipogenic Differentiation of Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* 8(8):5160-5169.
71. Lee WC, Lim CH, Su KC, Loh KP, Lim CT. 2015. Cell-assembled Graphene biocomposite for enhanced chondrogenic differentiation. *Small* 11(8):963-969.
72. Shen H, Lin H, Sun AX, Song S, Zhang Z, Dai J, Tuan RS. 2018. Chondroinductive factor-free chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in graphene oxide-incorporated hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B* 6(6):908-917.
73. Yoon HH, Bhang SH, Kim T, Yu T, Hyeon T, Kim B-S. 2014. Dual Roles of Graphene Oxide in Chondrogenic Differentiation of Adult Stem Cells: Cell-Adhesion Substrate and Growth Factor-Delivery Carrier. *Advanced Functional Materials* 24(41):6455-6464.
74. Enochson L, Brittberg M, Lindahl A. 2012. Optimization of a chondrogenic medium through the use of factorial design of experiments. *BioResearch Open Access* 1(6):306-313.
75. Van Der Kraan PM. 2017. The changing role of TGF β in healthy, ageing and osteoarthritic joints. *Nature Reviews Rheumatology* 13(3):155-163.
76. Zhou X, Nowicki M, Cui H, Zhu W, Fang X, Miao S, Lee S-J, Keidar M, Zhang LG. 2017. 3D bioprinted graphene oxide-incorporated matrix for promoting chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Carbon* 116:615-624.
77. Janssen JN, Batschkus S, Schimmel S, Bode C, Schminke B, Miosge N. 2019. The Influence of TGF- β 3, EGF, and BGN on SOX9 and RUNX2 Expression in Human Chondrogenic Progenitor Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 67(2):117-127.
78. Drabsch Y, Ten Dijke P. 2012. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 31(3-4):553-568.
79. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 2016. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 40:103-112.
80. Tabriz AG, Hermida MA, Leslie NR, Shu W. 2015. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication* 7(4):45012.
81. Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 2013. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 101 A(5):1255-1264.
82. Armstrong JPK, Burke M, Carter BM, Davis SA, Perriman AW. 2016. 3D Bioprinting Using a Templated Porous Bioink. *Advanced Healthcare Materials* 5(14):1724-1730.
83. Kirchmayer DM, Gorkin R, In Het Panhuis M. 2015. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing. *Journal of Materials Chemistry B* 3(20):4105-4117.
84. Lin Z, Wu M, He H, Liang Q, Hu C, Zeng Z, Cheng D, Wang G, Chen D, Pan H, Ruan C.

2019. 3D Printing of Mechanically Stable Calcium-Free Alginate-Based Scaffolds with Tunable Surface Charge to Enable Cell Adhesion and Facile Biofunctionalization. *Advanced Functional Materials* 29(9). doi:10.1002/adfm.201808439
85. Wang Q, Sun J, Yao Q, Ji C, Liu J, Zhu Q. 2018. 3D printing with cellulose materials. *Cellulose* 25(8):4275-4301.
 86. Afewerki S, Magalhães LSSM, Silva ADR, Stocco TD, Silva Filho EC, Marciano FR, Lobo AO. 2019. Bioprinting a Synthetic Smectic Clay for Orthopedic Applications. *Advanced Healthcare Materials* 8(13):1-14.
 87. Chiappone A, Fantino E, Roppolo I, Lorusso M, Manfredi D, Fino P, Pirri CF, Calignano F. 2016. 3D Printed PEG-Based Hybrid Nanocomposites Obtained by Sol-Gel Technique. *ACS Applied Materials and Interfaces* 8(8):5627-5633.
 88. Ahadian S, Ramón-Azcón J, Estili M, Liang X, Ostrovidov S, Shiku H, Ramalingam M, Nakajima K, Sakka Y, Bae H, Matsue T, Khademhosseini A. 2014. Hybrid hydrogels containing vertically aligned carbon nanotubes with anisotropic electrical conductivity for muscle myofiber fabrication. *Scientific Reports* 4:1-11.
 89. Li H, Liu S, Lin L. 2016. Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide. *International Journal of Bioprinting* 2(2).
 90. Hong N, Yang GH, Lee JH, Kim GH. 2018. 3D bioprinting and its in vivo applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 106(1):444-459.
 91. Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. 2018. Bioinks for 3D bioprinting: An overview. *Biomaterials Science* 6(5):915-946.
 92. Murphy S V., Atala A. 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* 32(8):773-785.
 93. Cui H, Nowicki M, Fisher JP, Zhang LG. 2017. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* 6(1).
 94. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 2016. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances* 34(4):422-434.
 95. Roseti L, Cavallo C, Desando G, Parisi V, Petretta M, Bartolotti I, Grigolo B. 2018. Three-dimensional bioprinting of cartilage by the use of stem cells: A strategy to improve regeneration. *Materials* 11(9).
 96. Datta P, Barui A, Wu Y, Ozbolat V, Moncal KK, Ozbolat IT. 2018. Essential steps in bioprinting: From pre- to post-bioprinting. *Biotechnology Advances* 36(5):1481-1504.
 97. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, Park JH, Grodzicki MS, Shue HJ, Ramadan MH, Hudson AR, Feinberg AW. 2015. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Science Advances* 1(9).
 98. Panwar A, Tan LP. 2016. Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D

bioprinting. *Molecules* 21(6).

99. Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 2019. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science* 1900344.
100. García-Lizarribar A, Fernández-Garibay X, Velasco-Mallorquí F, Castaño AG, Samitier J, Ramon-Azcon J. 2018. Composite Biomaterials as Long-Lasting Scaffolds for 3D Bioprinting of Highly Aligned Muscle Tissue. *Macromolecular Bioscience* 1800167:1-13.
101. Xin G, Yao T, Sun H, Scott SM, Shao D, Wang G, Lian J. 2015. Highly thermally conductive and mechanically strong graphene fibers. *Science (New York, NY)* 349(6252):1083-1087.
102. Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. 2013. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, and Characterization. In: *Cellular Cardiomyoplasty. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa, NJ; 2013:47-61. doi:10.1007/978-1-62703-511-8_4
103. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4):402-408.
104. Zheng J, Zhu M, Ferracci G, Cho NJ, Lee BH. 2018. Hydrolytic Stability of Methacrylamide and Methacrylate in Gelatin Methacryloyl and Decoupling of Gelatin Methacrylamide from Gelatin Methacryloyl through Hydrolysis. *Macromolecular Chemistry and Physics* 219(18):1-9.
105. Pomin VH. 2014. NMR chemical shifts in structural biology of glycosaminoglycans. *Analytical Chemistry* 86(1):65-94.
106. Kinh CD, Thien TV, Hoa TT, Khieu DQ. 2007. Interpretation of 1H-NMR spectrum of alginate by 1H-1H TOCSY and COSY spectrum. *Journal of Chemistry* 45(6):772-775.
107. Wang L, Shen S, Lu S. 2003. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate hydrogels. 52:389-396.
108. Wang Z, Tian Z, Menard F, Kim K. 2017. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication* 9(4).
109. Jeon O, Bouhadir KH, Mansour JM, Alsberg E. 2009. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials* 30(14):2724-2734.
110. Van Der Asdonk P, Kouwer PHJ. 2017. Liquid crystal templating as an approach to spatially and temporally organise soft matter. *Chemical Society Reviews* 46(19):5935-5949.
111. Xu Z, Gao C. 2011. Aqueous Liquid Crystals of Graphene Oxide SI. *ACS nano* 5(4):1-8.
112. Liu Y, Xu Z, Gao W, Cheng Z, Gao C. 2017. Graphene and Other 2D Colloids: Liquid Crystals and Macroscopic Fibers. *Advanced Materials* 29(14).
113. Sarker B, Zehnder T, Rath SN, Horch RE, Kneser U, Detsch R, Boccaccini AR. 2017. Oxidized Alginate-Gelatin Hydrogel: A Favorable Matrix for Growth and Osteogenic

- Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells in 3D. *ACS Biomaterials Science and Engineering* 3(8):1730-1737.
114. Li T, Song X, Weng C, Wang X, Sun L, Gong X, Yang L, Chen C. 2018. Self-crosslinking and injectable chondroitin sulfate/pullulan hydrogel for cartilage tissue engineering. *Applied Materials Today* 10:173-183.
 115. Somo SI, Langert K, Yang CY, Vaicik MK, Ibarra V, Appel AA, Akar B, Cheng MH, Brey EM. 2018. Synthesis and evaluation of dual crosslinked alginate microbeads. *Acta Biomaterialia* 65:53-65.
 116. Olate FA, Ulloa JA, Vergara JM, Sánchez SA, Barberá J, Parra ML. 2016. Columnar liquid crystalline tris-(ether)triazines with pendant 1,3,4-thiadiazole groups: synthesis, mesomorphic, luminescence, solvatochromic and electrochemical properties. *Liquid Crystals* 43(6):811-827.
 117. Buyuktanir EA, Frey MW, West JL. 2010. Self-assembled, optically responsive nematic liquid crystal/polymer core-shell fibers: Formation and characterization. *Polymer* 51(21):4823-4830.
 118. Hong SH, Shen TZ, Song JK. 2015. Flow-induced ordering of particles and flow velocity profile transition in a tube flow of graphene oxide dispersions. *Liquid Crystals* 42(2):261-269.
 119. Huang X, He J, Sun K, Chen Y, Zha Z, Zhou C. 2018. Liquid crystal behavior and cytocompatibility of graphene oxide dispersed in sodium alginate solutions. *Carbon* 129:258-269.
 120. Tan Y, Wang L, Xiao J, Zhang X, Wang Y, Liu C, Zhang H, Liu C, Xia Y, Sui K. 2019. Synchronous enhancement and stabilization of graphene oxide liquid crystals: Inductive effect of sodium alginates in different concentration zones. *Polymer* 160(September 2018):107-114.
 121. Kim WJ, Kim M, Kim GH. 2018. 3D-Printed Biomimetic Scaffold Simulating Microfibril Muscle Structure. *Advanced Functional Materials* 28(26):1-12.
 122. Canadas RF, Ren T, Tocchio A, Marques AP, Oliveira JM, Reis RL, Demirci U. 2018. Tunable anisotropic networks for 3-D oriented neural tissue models. *Biomaterials* 181:402-414.
 123. Wu Y, Han Y, Wong YS, Fuh JYH. 2018. Fibre-based scaffolding techniques for tendon tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(7):1798-1821.
 124. Gao Y, Mori T, Manning S, Zhao Y, Nielsen AD, Neshat A, Sharma A, Mahnen CJ, Everson HR, Crotty S, Clements RJ, Malcuit C, Hegmann E. 2016. Biocompatible 3D Liquid Crystal Elastomer Cell Scaffolds and Foams with Primary and Secondary Porous Architecture. *ACS Macro Letters* 5(1):4-9.
 125. Mackay ME, Dao TT, Tuteja A, Ho DL, Van Horn B, Kim H-C, Hawker CJ. 2003.

- Nanoscale effects leading to non-Einstein-like decrease in viscosity. *Nature Materials* 2(11):762-766.
126. Jain S, Goossens JGP, Peters GWM, van Duin M, Lemstra PJ. 2008. Strong decrease in viscosity of nanoparticle-filled polymer melts through selective adsorption. *Soft Matter* 4(9):1848.
 127. Rathan S, Dejob L, Schipani R, Haffner B, Möbius ME, Kelly DJ. 2019. Fiber Reinforced Cartilage ECM Functionalized Bioinks for Functional Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* 2019:1801501.
 128. Chen Y, Wang Y, Yang Q, Liao Y, Zhu B, Zhao G, Shen R, Lu X, Qu S. 2018. A novel thixotropic magnesium phosphate-based bioink with excellent printability for application in 3D printing. *Journal of Materials Chemistry B* 6(27):4502-4513.
 129. Yang K, Chen B, Zhu X, Xing B. 2016. Aggregation, Adsorption, and Morphological Transformation of Graphene Oxide in Aqueous Solutions Containing Different Metal Cations. *Environmental Science and Technology* 50(20):11066-11075.
 130. Tarashi S, Nazockdast H, Sodeifian G. 2019. Reinforcing effect of graphene oxide on mechanical properties, self-healing performance and recoverability of double network hydrogel based on κ -carrageenan and polyacrylamide. *Polymer* 2019:121837.
 131. Muraki K, Hirose M, Kotobuki N, Kato Y, Machida H, Takakura Y, Ohgushi H. 2006. Assessment of Viability and Osteogenic Ability of Human Mesenchymal Stem Cells After Being Stored in Suspension for Clinical Transplantation. *Tissue Engineering* 0(0):060706073730041.
 132. Kenry, Lim CT. 2017. Biocompatibility and Nanotoxicity of Layered Two-Dimensional Nanomaterials. *ChemNanoMat* 3(1):5-16.
 133. Goenka S, Sant V, Sant S. 2014. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 173(1):75-88.
 134. Nair M, Nancy D, Krishnan AG, Anjusree GS, Vadukumpully S, Nair S V. 2015. Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin-hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanotechnology* 26(16):161001.
 135. Saravanan S, Vimalraj S, Anuradha D. 2018. Chitosan based thermoresponsive hydrogel containing graphene oxide for bone tissue repair. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 107:908-917.
 136. Heinrich MA, Liu W, Jimenez A, Yang J, Akpek A, Liu X, Pi Q, Mu X, Hu N, Schiffelers RM, Prakash J, Xie J, Zhang YS. 2019. 3D Bioprinting: from Benches to Translational Applications. *Small* 1805510:1805510.
 137. Schindelin J et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9(7):676-682.
 138. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW.

2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18(1):1-26.
139. Karim A, Amin AK, Hall AC. 2018. The clustering and morphology of chondrocytes in normal and mildly degenerate human femoral head cartilage studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Anatomy* 232(4):686-698.
 140. Han S, Li Y, Chan BP. 2016. Extracellular protease inhibition alters the phenotype of chondrogenically differentiating human mesenchymal stem cells (MSCs) in 3D collagen microspheres. *PLoS ONE* 11(1):1-14.
 141. Zhu W, Cui H, Boualam B, Masood F, Flynn E, Rao RD, Zhang Z-Y, Zhang LG. 2018. 3D bioprinting mesenchymal stem cell-laden construct with core-shell nanospheres for cartilage tissue engineering. *Nanotechnology* 29(18):185101.
 142. Zhu D, Tong X, Trinh P, Yang F. 2017. Mimicking Cartilage Tissue Zonal Organization by Engineering Tissue-Scale Gradient Hydrogels as 3D Cell Niche. *Tissue Engineering Part A* 24(1-2):1-10.
 143. Knudson CB. 2003. Hyaluronan and CD44: Strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 69(2):174-196.
 144. Li X, Teng Y, Liu J, Lin H, Fan Y, Zhang X. 2017. Chondrogenic differentiation of BMSCs encapsulated in chondroinductive polysaccharide/collagen hybrid hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B* 5(26):5109-5119.

Apéndice

Productividad científica, participación en congresos y pasantías durante el desarrollo del programa de doctorado

Publicaciones:

- 1) **Olate-Moya F**, Arens L, Wilhelm M, Mateos-Timoneda MA, Engel E, Palza H. 2020. Chondroinductive Alginate-Based Hydrogels Having Graphene Oxide for 3D Printed Scaffold Fabrication. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12(4):4343-4357. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b22062>
- 2) Silva-Leyton R, Quijada R, Bastías R, Zamora N, **Olate-Moya F**, Palza H. 2019. Polyethylene/graphene oxide composites toward multifunctional active packaging films. *Composites Science and Technology* 184:107888. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.107888>
- 3) Gutierrez E, Burdiles PA, Quero F, Palma P, **Olate-Moya F**, Palza H. 3D Printing of Antimicrobial Alginate/Bacterial-Cellulose Composite Hydrogels by Incorporating Copper Nanostructures. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5(11):6290-6299. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01048>

Pasantías y Congresos:

- 1) Humberto Palza, Laritza Medi, Gonzalo Fuentes, Maria Alejandra Tamayo, Carolina Angulo, **Felipe Olate**. Designing polymer/graphene smart materials: from antimicrobial to tissue engineering applications. *15th Brazilian Polymer Conference*, Bento Gonçalves, Brasil, 27-31 de octubre de 2019.
- 2) **01/2019**. Visiting Researcher, Polymeric Materials group, Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Alemania.
- 3) **2018**. Visiting Researcher, Biomaterials for regenerative therapies group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, España.
- 4) **2018**. Estancia de Prácticas, Departamento de Ciencia de Materiales y Metalurgia, EEBE, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Barcelona, España.
- 5) **Felipe Olate-Moya**, Humberto Palza. Poly(pseudorotaxane) / Graphene Oxide supramolecular hydrogels for controlled drug release. *NanoBio&Med2018 International Conference*, Barcelona, España, 20-22 de noviembre de 2018.
- 6) **Felipe Olate-Moya**, Esteban González, Pablo Caviedes and Humberto Palza. 3D printed hydrogel scaffolds based on bioconjugated alginate and graphene oxide nanoparticles. *29th Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, Maastricht, Países Bajos, 9-13 de septiembre de 2018.

- 7) **F. Olate-Moya**, F. Pizarro, M. L. Cordero, H. Palza. Microesferas de tamaño controlado de hidrogeles supramoleculares de Polietilenglicol/ α -ciclodextrina en compósitos con Óxido de Grafeno, *IV Congreso Nacional de Nanotecnología*, Olmué, Chile 2016.

Videos



Video A1. Naturaleza líquido cristalina de una suspensión acuosa de GO observada mediante POM. En el video se alterna entre una configuración de filtros polarizador/analizador paralelos (||) y cruzados (+). URL: <https://1drv.ms/v/s!AnurWybzfKasgYsLAYC-rsGGxMsJeA?e=5TsNc6>



Video A2. Proceso de impresión 3D de andamios (ACG/GO01). URL:
<https://1drv.ms/v/s!AnurWybzfKasgYsKQSi3KCTX02sVTQ?e=2mtgGc>



Video A3. Proceso de bioimpresión 3D de constructos. URL:
<https://1drv.ms/v/s!AnurWybzfKasgYsMkA1WFOziF2sn8w?e=9dw0OU>

RNeasy[®] Plus Mini Kit

The RNeasy Plus Mini Kit (cat. nos. 74134 and 74136) can be stored at room temperature (15–25°C) for at least 9 months if not otherwise stated on label.

Further information

- *RNeasy Plus Mini Handbook*: www.qiagen.com/HB-0405
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- If purifying RNA from cell lines rich in RNases, or tissue, add either 10 µl β-mercaptoethanol (β-ME), or 20 µl 2 M dithiothreitol (DTT), to 1 ml Buffer RLT Plus before use. Buffer RLT Plus containing DTT or β-ME can be stored at room temperature for up to 1 month.
- Add 4 volumes of ethanol (96–100%) to Buffer RPE for a working solution.
- Foaming can be reduced by adding Reagent DX (cat. no. 19088) at a final concentration of 0.5% (v/v) before disruption and homogenization.*

* This option not included in handbook; handbook to be updated.

1. **Cells:** Harvest a maximum of 1×10^7 cells, either as a cell pellet, or lysed directly in the vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 1). Vortex for 30 s, or homogenize.

Tissues: Disrupt the tissue (≤ 30 mg) and homogenize the lysate in the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 1). Centrifuge the lysate for 3 min at maximum speed. Carefully remove the supernatant by pipetting and use it in step 2.

2. Transfer the homogenized lysate to a gDNA Eliminator spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied).

3. Centrifuge for 30 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the column, and save the flow-through. Add 1 volume (usually 350 μl or 600 μl) of 70% ethanol to the flow-through, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 4.
4. Transfer up to 700 μl of the sample, including any precipitate, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
5. Add 700 μl Buffer RW1 to the RNeasy Mini spin column (in a 2 ml collection tube). Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
6. Add 500 μl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
7. Add 500 μl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm).

Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge at full speed for 1 min to further dry the membrane.

8. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 μl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid, and centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ to elute the RNA.

Optional: Repeat elution with another volume of water or with RNA eluate.

Table 1. Volumes of Buffer RLT Plus for sample disruption and homogenization

Sample	Amount	Dish	Buffer RLT Plus	Disruption and homogenization
Pelleted cells	$< 5 \times 10^6$	< 6 cm	350 μl	Add Buffer RLT Plus, vortex ($\leq 1 \times 10^5$ cells); or use QIAshredder, TissueRuptor [®] , or needle and syringe
	$\leq 1 \times 10^7$	6–10 cm	600 μl	
Animal tissues	< 20 mg	–	350 μl	TissueLyser LT; TissueLyser II; TissueRuptor, or mortar and pestle followed by QIAshredder or needle and syringe
	20–30 mg	–	600 μl	

* Use 600 μl Buffer RLT Plus for tissues stabilized in RNA/later[®] Reagent, or for difficult-to-lyse tissues.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. Trademarks: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], RNeasy[®], TissueRuptor[®] (QIAGEN Group). "RNA/later[®]" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents. 1101300 03/2016 HB-0574-002 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

Protocol: cDNA Synthesis Using the RT² First Strand Kit

Use of the RT² First Strand Kit is critical for obtaining optimal results and for detection of the reverse transcription controls contained in the RT² Profiler PCR Array. If using the Fluidigm BioMark real-time PCR system, refer to page 49 for the cDNA synthesis protocol and for sample/plate preparation instructions.

Important points before starting

- Use the same amount of total RNA for reverse transcription of each sample. First-time users are recommended to start with 0.5 µg total RNA for 96-well plate formats, 0.8 µg total RNA for Rotor-Disc 100 formats, 400 ng total RNA for format E and G 384 (4 x 96) option, or 1 µg total RNA for format E and G 384 HT option. Use of less than 100 ng RNA will result in a high rate of false negatives. If ≤100 ng RNA is available, refer to the *RT² PreAMP cDNA Synthesis Handbook*. Use of more than the recommended amount of RNA may potentially overload the system.
- **Do not** use DEPC-treated water. Use high-quality, nuclease-free water.
- The RT² First Stand Kit is not compatible with the chemicals in DNA-free™ kits from Ambion. If your RNA sample has been treated with DNA-free reagents, contact QIAGEN Technical Service.

Procedure

1. Thaw the reagents of the RT² First Strand Kit. Briefly centrifuge (10–15 s) to bring the contents to the bottom of the tubes.
2. Prepare the genomic DNA elimination mix for each RNA sample according to Table 1. Mix gently by pipetting up and down and then centrifuge briefly.

Table 1. Genomic DNA elimination mix

Component	Amount
RNA*	25 ng–5 µg
Buffer GE	2 µl
RNase-free water	Variable
Total volume	10 µl

* If using the kit for the first time, use the RNA amount recommended in “Important points before starting” above.

- Incubate the genomic DNA elimination mix for 5 min at 42°C, then place immediately on ice for at least 1 minute.
- Prepare the reverse-transcription mix according to Table 2.

Table 2. Reverse-transcription mix

Component	Volume for 1 reaction	Volume for 2 reactions	Volume for 4 reactions
5x Buffer BC3	4 µl	8 µl	16 µl
Control P2	1 µl	2 µl	4 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl	4 µl	8 µl
RNase-free water	3 µl	6 µl	12 µl
Total volume	10 µl	20 µl	40 µl

- Add 10 µl reverse-transcription mix to each tube containing 10 µl genomic DNA elimination mix. Mix gently by pipetting up and down.
- Incubate at 42°C for exactly 15 minutes. Then immediately stop the reaction by incubating at 95°C for 5 min.
- Add 91 µl RNase-free water to each reaction. Mix by pipetting up and down several times.
- Place the reactions on ice and proceed with the real-time PCR protocol.
If you wish to store the reactions prior to real-time PCR, transfer them to a –15 to –30°C freezer.

Protocol: Real-Time PCR for RT² Profiler PCR Arrays Formats A, C, D, E, F, G

This protocol describes real-time PCR using RT² Profiler PCR Arrays in combination with RT² SYBR Green Mastermixes. The use of RT² SYBR Green Mastermixes is critical to obtain accurate results from the RT² Profiler PCR Array. If unsure of the RNA quality or purification technique, examine the RNA quality before performing this protocol using species- and cyler-specific RT² RNA QC PCR Arrays.

For RT² Profiler PCR Array Format H, refer to the protocol on page 49.

Important points before starting

- Ensure that the RT² SYBR Green Mastermix and the RT² Profiler PCR Array format are suitable for your real-time cycler (see pages 4-6). The format of the RT² Profiler PCR Array is indicated by the last letter of the catalog number. An incorrect RT² Profiler PCR Array format will not fit the real-time cycler properly and may damage the real-time cycler.
- **Do not** cut the plastic plate of the RT² Profiler PCR Array.
- For accuracy and precision, ensure that micropipettors are calibrated before beginning the protocol. Be sure not to introduce bubbles into the wells of the RT² Profiler PCR Array when pipetting.
- **Do not** use DEPC-treated water. Use high-quality, nuclease-free water.
- If precipitates are present in the Mastermix tubes, warm the reagents at 42°C for 1 minute and vortex briefly to dissolve. Repeat if necessary.

Procedure

1. Briefly centrifuge the RT² SYBR Green Mastermix (10–15 s) to bring the contents to the bottom of the tube.

Note: As the RT² SYBR Green Mastermix contains HotStart DNA *Taq* Polymerase that is active only after heat activation, reactions can be prepared at room temperature (15-25°C).

2. Prepare the PCR components mix in a 5 ml tube or a loading reservoir depending on the RT² Profiler PCR Array format, as described in Table 3.

Table 3. PCR components mix

Array format	96-well A, C, D, F	384 (4 x 96) option E, G	384 HT option E, G
2x RT ² SYBR Green Mastermix	1350 µl	650 µl	2100 µl
cDNA synthesis reaction	102 µl	102 µl	102 µl
RNase-free water	1248 µl	548 µl	1998 µl
Total volume of master mix	2700 µl	1300 µl	4200 µl

Note: This provides an excess volume of 300 µl (formats A, C, D, F), 340 µl (formats E, G: 384 (4 x 96) option), or 360 µl (formats E, G: 384 HT option) to allow for pipetting errors. Perform pipetting steps as precisely as possible to ensure that each well receives the required volume.

Note: For Custom RT² Profiler PCR Arrays, prepare a volume of PCR components mix 10% greater than required for the total number of reactions to be performed.

Note: Save the remaining 9 µl cDNA synthesis reaction at –15 to –30°C, as it may be needed to perform quality control analysis.

3. Dispense the PCR components mix into the RT² Profiler PCR Array depending on the RT² Profiler PCR Array format, as described below.

Note: Change pipet tips following each pipetting step to avoid cross-contamination between the wells.

Note: If using an instrument to automate this step, contact Technical Service for plate specifications.