

**EMPLEO DE ANDAMIOS  
TRIDIMENSIONALES CELULARIZADOS  
ESTIMULADOS MECÁNICA Y  
ELÉCTRICAMENTE PARA LA  
CREACIÓN DE TEJIDO MUSCULO-  
ESQUELÉTICO**

**TESIS DOCTORAL**

**FRANCISCO JOSÉ CALERO CASTRO**

**SEVILLA, JUNIO DE 2022**



**EMPLEO DE ANDAMIOS TRIDIMENSIONALES  
CELULARIZADOS ESTIMULADOS MECÁNICA Y  
ELECTRICAMENTE PARA LA CREACIÓN DE  
TEJIDO MUSCULO-ESQUELÉTICO**

**ESCUELA INTERNACIONAL DE POSGRADO**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e  
Investigación Clínica  
Departamento de Cirugía

Autor

Francisco José Calero Castro

Tutor y Director

Fernando de la Portilla de Juan

Sevilla, Junio de 2022





# AGRADECIMIENTOS

No sería objetivo si dijera que no tendría a quien agradecer nada. El desarrollo en este Oficio no ha sido un camino sencillo hasta haber podido llegar a este anhelado final. Sin El apoyo que me ha dado toda la gente que me rodea no habría sido tan fácil haber podido Llegar hasta aquí. Esta experiencia ha sido gracias a todas las personas que me han Influenciado e inspirado desde siempre a ser quien hoy he podido llegar a ser y poder Afrontar un reto de este calibre. Esta estapa se cierra con vivencias que no podre olvidar Nunca.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Fernando De la Portilla por haberme brindado la oportunidad de poder desarrollar este trabajo. Gracias por haber confiado desde mis inicios en mí y dejarme crecer profesionalmente en esta profesión, por permitirme adentrar en el mundo de la Ingeniería Tisular y los biomateriales y dejarme descubrir mi vocación.

A Victor Pérez y a José Fernando Rubio por su ayuda en los estudios reológicos y habernos podido proporcionar los andamios fabricados mediante electrospinning. A Alberto Olmo y Francisco Rodríguez por haber contribuido en la fabricación de las placas de electrodos fabricadas mediante impresión 3D.

A los técnicos de limpieza, del servicio de cultivo y de microscopía. A Carlos por su disponibilidad siempre para entregarme a tiempo el instrumental del biorreactor para cada experimento. A Rocío por tener siempre en orden el incubador y el biorreactor, a pesar de que no lo haya puesto fácil. A Konstantin y a John por su paciencia y haberme facilitado la experimentación con el servicio de microscopía.

A mis compañeras de laboratorio por hacer tan llevadero el día a día dentro del laboratorio. A Sheila, por ser una compañera ejemplar, siempre dispuesta a ayudarme y enseñarme y hacerme el camino más fácil dentro de esta profesión. A Mavi, aunque ya no estés por aquí, sigues estando para cualquier cosa que necesitemos de ti. A Patri por su tremenda paciencia y profesionalidad, no me cabe duda que te espera una carrera brillante. A Elena, por tu fuerza y tu capacidad de resistencia que tienes, eres una de las personas más duras y valientes que he conocido. A Rocío, por hacer tan amenas todas las mañanas con tu alegría. Y al resto de compañeros que han pasado por el laboratorio Laura,

M<sup>a</sup> Ángeles, Imán, María, Paula, Carlotta y Adele. Al servicio de Cirugía General por haberme hecho sentir uno más dentro del Servicio y a enfermería del bloque quirúrgico. Especialmente a Sara, Noelia, María José, Gregorio, Sandra y Lola. Y a mi amiga de Ingeniería, Sara, por entender todos mis dilemas dentro de nuestro mundo de la investigación biomédica y todos los momentos de desconexión por Sevilla.

A mis amigos de siempre por ser un apoyo fundamental. Sobre todo a Paquito, Carlos, Alba, Vero, Mamen, Ana, Ana María, Olga, José Luis, Manuel y Alberto, muchas gracias por estar siempre que os necesito, por el apoyo que me dais a diario y por hacerme sentir tan bien siempre que estamos juntos pero sobre todo por haberme comprendido mis ausencias y más en estos últimos meses, espero estar ahora más libre para vosotros. Y también a las recientes incorporaciones, Blanca, Cristina y Ana María, por la frescura que nos aportan. No me puedo dejar atrás a mi fiel escudera, Isa, por acompañarme en cada ocurrencia y por convertirte en alguien indispensable en mi vida. Por todas las llamadas de teléfono de vuelta y por dejarme confiar en ti. Estoy seguro que tu momento va a llegar pronto, eres una persona trabajadora que se merece todo lo bueno. Me siento muy afortunado de poder contar contigo siempre que te necesito.

A mi familia y mis primos por ser para mí como hermanos, principalmente a mis primos Sara, Desirée y Juan. Muchas gracias por dejarme contar con vosotros siempre que os necesito. Pero sobre todo por hacer inolvidable cada encuentro de los Castro.

A mis abuelos por todo el cariño con el que nos has tratado siempre sin esperar nada a cambio. Especialmente a mi abuela, nunca tendré suficientes palabras para agradecerte la alegría que siempre nos das. Gracias hacerme ver lo privilegiados que somos hoy en día teniendo una educación al alcance de todos y enseñarme a valorarla.

A mis padres por haberme educado en libertad y dejarme decidir por mí mismo mi futuro y dejarme ser quién soy hoy en día. Por hacerme ver que se puede sacar fuerza de donde no la hay, siempre que exista la voluntad de uno. A mi padre por inculcarme valores de tenacidad y perfeccionismo y a mi madre, que siempre se preocupa porque todo esté correcto y no nos haya faltado nunca de nada. Gracias por enseñarme que siempre hay que hacer una parada y de que hay tiempo para todo. Nunca habrá palabras suficientes para expresar toda la gratitud que tengo. Siento tanta admiración por vosotros por vuestra forma de superar todos los obstáculos que os estáis encontrando continuamente.

A mi hermana Noelia, por enseñarme a ser fiel a mis principios, convicciones y decisiones. Hace 8 años, en un mar de dudas sobre si ese chico de 18 años había escogido realmente bien a lo que se quería dedicar el resto de su vida, el destino decidió ponerle punto y final a tu camino, dejándonos a todos con un futuro incierto y muchas cuestiones por resolver. Pero aquí estoy, casi 9 años después, fiel a mi decisión como me enseñaste. Hoy, no me arrepiento de la elección que tomé, de poder contribuir a que no pase lo que tuvimos que vivir. Me consuela saber al menos pudieras ver mis primeros pasos en esta trayectoria. Estoy seguro que donde quieras que estés, esta meta la estás celebrando como si fuera tuya también. No sabes cuánto te echo de menos y cuanto me gustaría poder celebrarlo contigo.

A mi hermana Natalia, que siempre me apoya y me defiende. Por haberme dado tanta felicidad y haberme enseñado tanto, y especialmente que hay vida más allá del trabajo y que hay que aprender a compaginarlo. Eres un referente con tu profesionalidad y claridad a la hora de tomar las decisiones. Gracias por haberme hecho el mayor regalo que me podrían hacer, los dos niños de mis ojos. Ojalá me pudieras transmitir parte de la paciencia que estás desarrollando. A Bartolo por estar siempre dispuesto para cuando le necesito pero sobre todo por cuidar tan bien de mi hermana y mis sobrinos.

A mi sobrino Noel, que tanto quiero. Por ser una luz que me ilumina en los momentos más oscuros y evadirme momentáneamente de la realidad para llevarme a su mundo lleno de inocencia. Por hacerme sentir tanto y emocionarme con tan solo verte. Es todo un privilegio verte crecer. Espero que esa alegría que tienes te acompañe siempre. Finalmente, me gustaría dejar constancia de que estas últimas palabras las empecé cuando tan solo llevabas 48 horas en el mundo pero ya las estaba pensando antes de saber si te tendría que llamar Fabio o Elián durante el resto de tu vida. Espero, Noel y Elián, que esto algún día os pueda servir como inspiración para que sepáis que se puede llegar hasta límites que uno no alcanza a imaginar. Espero que podáis superar todos los obstáculos que os encontréis y siempre le saquéis lo positivo porque todo os ayudará a aprender y a haceros más fuerte. Que el destino os permita hacer lo que realmente os guste y tengáis una vida llena de felicidad como la que vosotros nos dais.





# INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Generalidades del músculo esquelético .....	3
1.1.1. Embriología del músculo esquelético .....	4
1.1.2. Histología del músculo esquelético .....	9
1.1.3. Inervación del músculo .....	10
1.1.4. Vascularización del músculo esquelético .....	12
1.1.5. Diferencias del músculo esquelético y músculo liso.....	13
1.2. Ingeniería Tisular .....	14
1.2.1. Definición .....	14
1.2.2. Componentes dentro de la Ingeniería Tisular.....	17
1.3. Biomateriales .....	19
1.3.1. Definición .....	19
1.3.2. Historia.....	21
1.3.3. Propiedades y cualidades necesarias para el uso de un biomaterial.....	22
1.3.4. Clasificación y tipos.....	25
1.4. Técnicas de Fabricación de andamios .....	33
1.4.1. Bioimpresión 3D .....	33
1.4.2. Electrospinning.....	42
1.5. Biorreactores.....	47
1.5.1. Biorreactor de estimulación mecánica .....	50
1.5.2. Estimulación eléctrica .....	51
1.6. Ingeniería de tejidos aplicado a músculo.....	52
1.6.1. Músculo liso .....	53
1.6.2. Músculo esquelético.....	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	59

2.1.	Hipótesis .....	61
2.2.	Objetivo .....	62
2.2.1.	Objetivo principal.....	62
2.2.2.	Objetivos secundarios .....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....		65
3.1.	Tipo de Estudio .....	67
3.2.	Diseño de dispositivos.....	67
3.2.1.	Andamios tisulares .....	67
3.2.2.	Placa electroestimulación .....	68
3.3.	Cultivo celular .....	69
3.4.	Fabricación de hidrogeles para bioimpresión 3D.....	70
3.4.1.	Colágeno .....	70
3.4.2.	COL / Matrigel .....	70
3.4.3.	MEC .....	70
3.4.4.	Colágeno y alginato.....	70
3.4.5.	Gelatina .....	71
3.5.	Bioimpresión 3D .....	72
3.6.	Fabricación de andamios de electrospinning .....	73
3.7.	Determinación de condiciones ideales de cultivo .....	74
3.8.	Estimulación de los andamios con biorreactor .....	77
3.9.	Pruebas reológicas.....	81
3.10.	Ensayo de viabilidad celular .....	82
3.11.	Estudio del citoesqueleto de los miotubos.....	82
3.12.	Estudio de funcionalidad celular .....	83
3.12.1.	Estimulación eléctrica.....	84
3.13.	Estudio inmunohistoquímico .....	84
3.14.	Variables de estudio .....	85

3.14.1.	Variables independientes .....	85
3.14.2.	Variables dependientes .....	85
3.15.	Estudio estadístico.....	87
RESULTADOS	.....	89
4.1.	Propiedades mecánicas de los hidrogeles.....	91
4.1.1.	Resultados reológicos: Andamio de PCL.....	91
4.1.2.	Resultados reológicos: Hidrogeles.....	92
4.2.	Testeo inicial de viabilidad celular y diferenciación.....	93
4.2.1.	Viabilidad.....	93
4.2.2.	Inmunohistoquímica.....	96
4.3.	Viabilidad celular .....	97
4.3.1.	Andamios bioimpresos.....	97
4.3.2.	Andamios de nanofibras .....	109
4.3.3.	Bioimpresión vs Electrospinning .....	113
4.4.	Morfología del citoesqueleto .....	115
4.4.1.	Andamios bioimpresos.....	115
4.4.2.	Andamios de nanofibras .....	116
4.5.	Actividad funcional de los tejidos.....	124
DISCUSIÓN	.....	131
5.1.	Estudio comparativo de líneas celular L6 y C2C12.....	133
5.2.	Determinación de la densidad celular ideal .....	136
5.3.	Análisis de los andamios de bioimpresión.....	137
5.3.1.	Estudio de la viabilidad de la biotinta inyectada al inicio y al final del experimento.....	144
5.4.	Análisis de los andamios de electrospinning .....	145
5.5.	Análisis del impacto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre los andamios.....	148

5.6.	Estudio comparativo entre ambas técnicas de fabricación de andamios ....	154
5.7.	Limitaciones y dificultades .....	155
5.8.	Perspectivas de futuro.....	157
CONCLUSIONES .....		158
REFERENCIAS .....		158

## INDICE FIGURAS

Figura 1: Músculo esquelético e histología .....	4
Figura 2: Factores que intervienen la miogénesis.....	5
Figura 3: Expresión de genes, proteínas y factores de transcripción durante la miogénesis .....	6
Figura 4: Sarcómero relajado y contraído .....	11
Figura 5: Proceso de contracción de una fibra muscular .....	12
Figura 6: Enfoques de Ingeniería Tisular .....	15
Figura 7: Componentes de la Ingeniería Tisular .....	16
Figura 8: Línea del tiempo de la historia de los biomateriales .....	21
Figura 9: Estructura del colágeno fibrilar .....	27
Figura 10: Estructura del gel de alginato y estructura tras reticulación.....	29
Figura 11: Estructura de la PCL .....	32
Figura 12: Línea del tiempo de la bioimpresión 3D .....	35
Figura 13: Tipos de bioimpresión 3D .....	36
Figura 14: Bioimpresión basada en extrusión .....	37
Figura 15: Esquema de ink-jet bioprinting.....	38
Figura 16: Esquema de SLA.....	40
Figura 17: Esquema de electrospinning .....	43
Figura 18: Línea del tiempo de electrospinning .....	44
Figura 19: Diseño de andamios .....	67
Figura 20: Andamio 3 .....	68

Figura 21: Diseño tapadera para electroestimulación .....	69
Figura 22: Cultivo celular .....	69
Figura 23: Campana de flujo laminar .....	72
Figura 24: Bioimpresora y cabezal de bioimpresión .....	73
Figura 25: Andamio fabricado mediante electrospinning .....	74
Figura 26: Biorreactor TC-3.....	77
Figura 27: Esquema temporal de ensayos .....	78
Figura 28: Configuración estimulación mecánica .....	79
Figura 29: Estimulación eléctrica mediante tapadera de placa diseñada .....	80
Figura 30: Estimulación eléctrica .....	80
Figura 31: Explicación ratio del aspecto .....	86
Figura 32: Propiedades reológicas.....	91
Figura 33: Hematoxilina-Eosina e Inmunohistoquímicas de hidrogeles .....	94
Figura 34: Hematoxilina-Eosina e Inmunohistoquímicas de hidrogel CA1 .....	95
Figura 35: Viabilidad celular.....	95
Figura 36: Viabilidad celular.....	98
Figura 37: Test viabilidad celular de CA1 con una densidad celular de $40 \times 10^6$ células/mL .....	98
Figura 38: Viabilidad celular por densidad celular de L6 en biotinta CA2. ....	100
Figura 39: Viabilidad celular por estimulación de L6 en biotinta CA2.....	101
Figura 40: Test de viabilidad celular .....	102
Figura 41: Viabilidad celular de CA2 y electrospinning. ....	105



Figura 42: Test de viabilidad celular C2C12.....	106
Figura 43: Viabilidad celular de L6 y C2C12. ....	108
Figura 44: Test de viabilidad celular .....	109
Figura 45: Viabilidad celular entre biotintas con diferente concentración de colágeno y alginato.....	109
Figura 46: Test de viabilidad celular de andamios fabricados mediante electrospinning .....	110
Figura 47: Viabilidad celular de andamios fabricados mediante electrospinning.....	111
Figura 48: Viabilidad celular de andamios fabricados mediante bioimpresión vs electrospinning.....	114
Figura 49: Inmunofluorescencia de CA2 con C2C12.....	115
Figura 50: Inmunofluorescencia de andamios de colágeno y alginato .....	116
Figura 51: Inmunofluorescencia de andamios fabricados con electrospinning.....	117
Figura 52: Inmunofluorescencia de andamios alineados fabricados con electrospinning .....	118
Figura 53: Grosor de las fibras .....	119
Figura 54: Alineamiento de las fibras .....	121
Figura 55: Distribución de las fibras.....	120
Figura 56: Fusión nuclear.....	123
Figura 57: Densidad de actina .....	124
Figura 58: Luminiscencia de las células ante soluciones altas en K+ .....	125

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos de andamios y ensayos realizados. ....	75
Tabla 2: Viabilidad celular y morfología celular de CA1 y CA2.....	97
Tabla 3: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en diferentes densidades celulares en la biotinta CA2. ....	100
Tabla 4: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.....	101
Tabla 5: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en densidad celular $40 \times 10^6$ células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.....	103
Tabla 6: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en densidad celular $80 \times 10^6$ células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.....	103
Tabla 7: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en densidad celular $160 \times 10^6$ células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.....	104
Tabla 8: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en densidad celular $160 \times 10^6$ células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.....	107
Tabla 9: Viabilidad celular y morfología celular de L6 y C2C12. ....	108
Tabla 10: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados por electrospinning.....	111
Tabla 11: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios alineados estimulados. ....	112
Tabla 12: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning. ....	114
Tabla 13: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning sin estimulación. ....	114

Tabla 14: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning estimulados mecánicamente. ....	115
Tabla 15: Morfología nuclear de andamios de electrospinning. ....	122
Tabla 16: Morfología nuclear de andamios alineados estimulados. ....	122
Tabla 17: Concentraciones de calcio intracelular y luminiscencias tras estímulos de soluciones altas en K <sup>+</sup> . ....	127

## **INDICE DE VÍDEOS**

QR 1: Vídeo andamio random.....	126
QR 2: Vídeo andamio semialineado .....	126
QR 3: Vídeo andamio alineado .....	128
QR 4: Vídeo andamio alineado con estimulación eléctrica .....	129
QR 5: Vídeo andamio alineado con estimulación mecánica .....	129
QR 6: Andamio respondiendo a pulsos eléctricos y solución alta en potasio .....	130

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>ADN:</b> Ácido Desoxirribonucleico	<b>ADP:</b> Adenosín difosfato
<b>Alg:</b> Alginato	<b>AM:</b> Fabricación Aditiva
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>BMP:</b> Proteína Morfogénica Ósea
<b>BS:</b> Solución Bloqueo	<b>BSA:</b> Albúmina de Suero Bovino
<b>°C:</b> Grado centígrado	<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> Calcio
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b> Cloruro cálcico	<b>CAD:</b> Diseño asistido por ordenador
<b>CE:</b> Conformidad Europea	<b>cm:</b> centímetro
<b>Col:</b> colágeno	<b>dECM:</b> Matriz extracelular descelularizada
<b>DLP:</b> procesamiento digital de la luz	<b>DMEM:</b> Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido	<b>ECM:</b> Matriz Extracelular
<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético	<b>EEUU:</b> Estados Unidos
<b>EGF:</b> Factor de crecimiento endotelial	<b>EHD:</b> electrohidrodinámicas
<b>ePTFE:</b> Politetrafluoroetileno expandido	<b>ERK:</b> Extracellular Signal-Regulated Kinases
<b>Ethd1:</b> homodímero-1 de etidio	<b>FBS:</b> Suero Fetal Bovino
<b>FDA:</b> Food and Drug Administration	<b>FDM:</b> Modelado por Deposición Fundida
<b>FGF:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos	<b>GA:</b> Ácido 1,4- $\alpha$ -L-ácido gulurónico
<b>GMSC:</b> Células madre mesenquimales gingivales	<b>Gly:</b> Glicina
<b>HA:</b> Ácido hialurónico	<b>hASC:</b> Células madre derivadas del tejido adiposo humano
<b>HGF:</b> Factor de crecimiento de hepatocitos	<b>HFIP:</b> 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
<b>IF:</b> Inmunofluorescencia	<b>IGF:</b> Factor de crecimiento de insulínico
<b>IHQ:</b> Inmunohistoquímica	<b>iPSC:</b> Induced Pluripotent Stem Cell
<b>ISO:</b> International Organization for Standardization	<b>K<sup>+</sup>:</b> Potasio
<b>kV:</b> Kilo Voltio	<b>LDM:</b> Low Temperature Deposition Modeling
<b>LIFT:</b> Laser-Assisted Bioprinting	<b>MA:</b> Ácido 1,4- $\beta$ -D-manurónico
<b>MAPK:</b> Mitogen-Activated Protein Kinases	<b>MG:</b> Medio de crecimiento
<b>Mg:</b> Magnesio	<b>mL:</b> mililitro
<b>mM:</b> milimolar	<b>MPa:</b> Megapascal

<b>MR:</b> Medicina Regenerativa	<b>MRF:</b> Factores de Regulación Miogénicos
<b>MRF4:</b> Factor Regulador Miogénico 4	<b>MSC:</b> células madre mesenquimales
<b>MyHC:</b> Isoformas de cadena pesada de miosina	<b>NFAT:</b> vía del factor nuclear de las células T activadas
<b>nM:</b> nanomolar	<b>NSF:</b> National Science Foundation
<b>PANi:</b> Polianilina	<b>PBS:</b> Phosphate-Buffered Saline
<b>PCL:</b> Policaprolactona	<b>PDGF:</b> Platelet Derived Growth Factor
<b>PEG:</b> Polyethylene Glycol	<b>PEG-DA:</b> Polyethylene Glycol Diacrylate
<b>PFA:</b> Paraformaldehido	<b>Pi:</b> Unidad de fosfato
<b>PLA:</b> Ácido poliláctico	<b>PLCL:</b> Poly(lactide-co-epsilon-caprolactone)
<b>PLGA:</b> Poly(lactic-co-glycolic acid)	<b>PVA:</b> Acetato de polivinilo
<b>PVDF:</b> Fluoruro de polivinilideno	<b>Rpm:</b> Revoluciones por minuto
<b>SDF-1<math>\alpha</math>:</b> Factor derivado de células estromales	<b>Sem:</b> Semana
<b>Shh:</b> Sonic Hedgehog	<b>SLA:</b> Estereolitografía
<b>SLS:</b> Sinterizado Selectivo por Láser	<b>SMA:</b> Smooth Muscle Actin
<b>SMAD:</b> Small Mothers Against Decantaplegic	<b>STL:</b> STereoLithography
<b>TCF:</b> T-Cell Factors	<b>TGF-<math>\beta</math>:</b> Factor de crecimiento transformante
<b>U:</b> Unidad enzimática	<b>UV:</b> Ultravioleta
<b>V:</b> Voltio	<b>VEGF:</b> Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>W/V:</b> weighth/volumen	





## RESUMEN

La Ingeniería de Tejidos tiene dentro de sus desafíos la regeneración de músculo esquelético. Para ello es preciso el uso de andamios tisulares, que pueden ser fabricados por diversas técnicas, siendo dos de las más utilizadas la bioimpresión 3D y el electrospinning. El empleo de biorreactores que estimulen mecánica y/o eléctricamente andamios celularizados podría promover la diferenciación de tejido muscular-esquelético. Es por ello que en este trabajo se ha estudiado el empleo de andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning estimulados mecánicamente y eléctricamente para la regeneración de músculo esquelético.

Se han empleado 9 biotintas diferentes a testar; colágeno, colágeno y Matrigel; colágeno, Matrigel, fibrina y albúmina de suero bovino y el resto biotintas de colágeno y alginato a diferentes concentraciones. Se han usado 3 andamios de electrospinning de PCL y gelatina con diferente grado de alineamiento entre sus fibras random; semialineado y alineado. Se compararon dos líneas celulares de mioblastos L6 y C2C12. Los andamios fueron estimulados mecánica y eléctricamente. Tras esto, se midió la viabilidad, morfología del citoesqueleto y funcionalidad de las fibras que se crearon.

Los resultados mostraron que los andamios colágeno y alginato ( $82.33 \pm 13.14\%$ ) presentaron mayor viabilidad celular ( $P=0.001$ ) frente al resto de biomateriales. Entre las biotintas de colágeno y alginato se vio que las que tenían mayor concentración de colágeno y alginato aumentaban la viabilidad ( $73.26 \pm 3.33\%$  vs  $94.08 \pm 3.50\%$ ;  $P=0.000$ ). La estimulación mecánica y eléctrica no tuvo efecto sobre la viabilidad, sin embargo, sí que lo tuvo sobre la morfología tanto de las células L6 como de las C2C12, siendo mayor la madurez en la línea C2C12. Comparando la bioimpresión y el electrospinning, el segundo presentó mayor viabilidad y maduración celular. La morfología del citoesqueleto de los andamios bioimpresos no fue miotubular, al contrario que los andamios de electrospinning. Entre estos andamios solamente se demostró que los miotubos de los andamios alineados ( $9.84 \pm 1.15\ \mu\text{m}$ ) eran más finos que los de los andamios random ( $11.55 \pm 3.39\ \mu\text{m}$ ;  $P=0.001$ ) y semialineados ( $11.32 \pm 2.73\ \mu\text{m}$ ;  $P=0.003$ ). Al estimular los andamios alineados mecánicamente se aumentó el grosor ( $12.92 \pm 3.29\ \mu\text{m}$ ;  $P=0.000$ ), la fusión nuclear ( $95.73 \pm 1.05\%$ ;  $P=0.004$ ), la densidad de actina ( $80.13 \pm 13.52\%$ ;  $P=0.017$ ) respecto al control. Los andamios random y los andamios alineados estimulados mecánicamente presentaron mayor contractibilidad.





# INTRODUCCIÓN



# CAPÍTULO 1



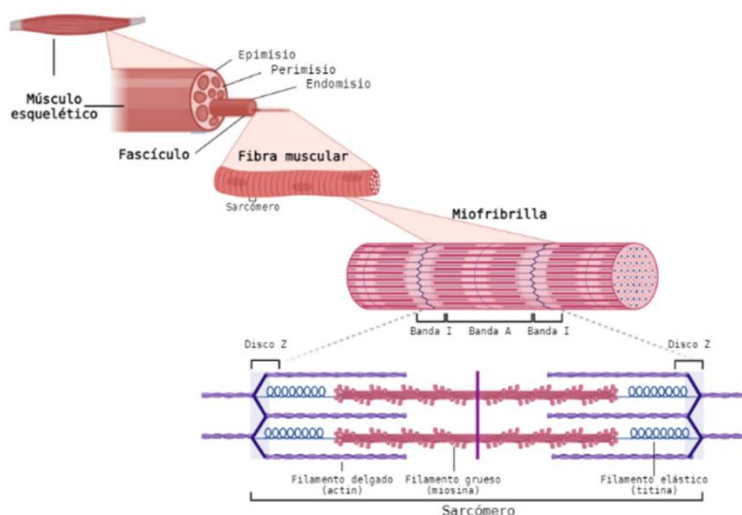
## 1.1. Generalidades del músculo esquelético

El **músculo esquelético** es uno de los tejidos más dinámicos y plásticos del cuerpo humano. En los seres humanos, el músculo esquelético representa aproximadamente el 40 % del peso corporal total, contiene entre el 50 y el 75 % de todas las proteínas corporales y representa entre el 30 y el 50 % del recambio proteico de todo el organismo. La masa muscular depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas y ambos procesos son sensibles a factores como el estado nutricional, el equilibrio hormonal, la actividad física, el ejercicio y las lesiones o enfermedades, entre otros (1). Este músculo se caracteriza por su acción mediante estímulos voluntarios enviados desde el sistema nervioso central a través de señales transmitidas por motoneuronas (2).

Las estructuras anatómicas fundamentales del mencionado músculo son (1):

- **Epimisio:** La capa externa del músculo, rodeando el vientre muscular.
- **Perimisio:** Dentro del epimisio, engloba y organiza los distintos fascículos musculares.
- **Endomisio:** Capa de revestimiento a las fibras musculares, integradas por estructuras miofibrilares.

El músculo esquelético (Figura 1) se caracteriza por seguir una disposición muy ordenada de las fibras musculares asociadas al tejido conectivo. La célula progenitora del músculo esquelético es el **mioblasto**, son células mononucleadas que durante su maduración se fusionan y formando fibras alargadas polinucleadas (3). La unidad estructural del tejido muscular es la **miofibra**, una célula única polinucleada de unos 20-100 µm de diámetro. Las miofibras están dispuestas en paralelo y presentan una longitud desde 2 mm hasta varias decenas de milímetros dependiendo del músculo. Las miofibras están recubiertas por una matriz de tejido conectivo, el **endomisio**, que agrupa las fibras en fascículos. Estos fascículos a su vez están soportados por el **perimisio** (formado por colágeno, fibras elásticas, nervios y vasos sanguíneos). Existe una última membrana, el **epimisio**, que envuelve el músculo y sostiene la continuidad estructural y funcional de la unión músculo tendón. Este tejido conectivo está compuesto por colágeno (tipo I y III) y proteoglicanos (4).



*Figura 1: Músculo esquelético e histología.*

### 1.1.1. Embriología del músculo esquelético

#### 1.1.1.1. Linaje celular

Los músculos esqueléticos se originan en el mesodermo paraxial, un tejido que se forma en el blastoporo primitivo durante la gastrulación y, posteriormente, en el brote de la cola durante la elongación del eje embrionario. El mesodermo paraxial naciente constituye el mesodermo presomítico en el extremo posterior del embrión. El mesodermo presomítico es un tejido transitorio que puede subdividirse a su vez en una región posterior inmadura y otra anterior comprometida, la última de las cuales se segmenta para formar los somitas. Es dentro de los somitas donde se inicia la miogénesis esquelética con la especificación de los progenitores premiogénos y los mioblastos esqueléticos. Varias fases de proliferación y diferenciación conducen a la formación de miofibras multinucleadas a partir de la fusión de miocitos mononucleados (5).

El proceso de generación del músculo -la **miogénesis**- puede dividirse en varias fases distintas (6). Durante la miogénesis embrionaria, las estructuras derivadas del mesodermo generan las primeras fibras musculares, posteriormente se generan fibras adicionales a lo largo de estas fibras iniciales (7,8). En la fase perinatal, los progenitores miogénicos residentes en el músculo proliferan, pero posteriormente disminuyen a medida que el número de mionúcleos alcanza un estado estable y la síntesis de proteínas miofibrilares alcanza su máximo (9,10). Una vez que el músculo ha madurado, estos progenitores entrarán en quiescencia y en adelante residirán en él como células satélite. El músculo

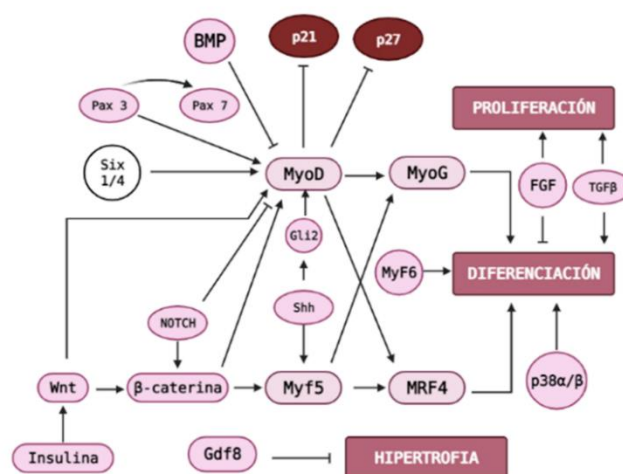


esquelético adulto, como todos los órganos que se renuevan, depende de un mecanismo que compensa el recambio de las células diferenciadas terminalmente para mantener la homeostasis del tejido (11,12). Este tipo de miogénesis depende de la activación de células satélite que tiene el potencial de diferenciarse en nuevas fibras (13,14).

Los mioblastos proliferantes derivan de precursores **Pax3+** que se encuentran en el dermomiótoma (15,16). Los mioblastos competentes para la fusión producen estructuras basadas en la actina que invaden la célula fundadora del músculo y forman poros, permitiendo la transferencia del citoplasma y el núcleo del mioblasto a la futura fibra y así formar miotubos multinucleados (17). La miofibra esquelética madura contiene un citoesqueleto altamente organizado compuesto por miofibrillas alineadas (18). Los procesos de **diferenciación** y fusión están regulados durante el desarrollo, aún queda mucho por conocer de su desarrollo, no obstante en el siguiente epígrafe, discutiremos brevemente la regulación y los factores que intervienen en la diferenciación y formación de miofibras (5).

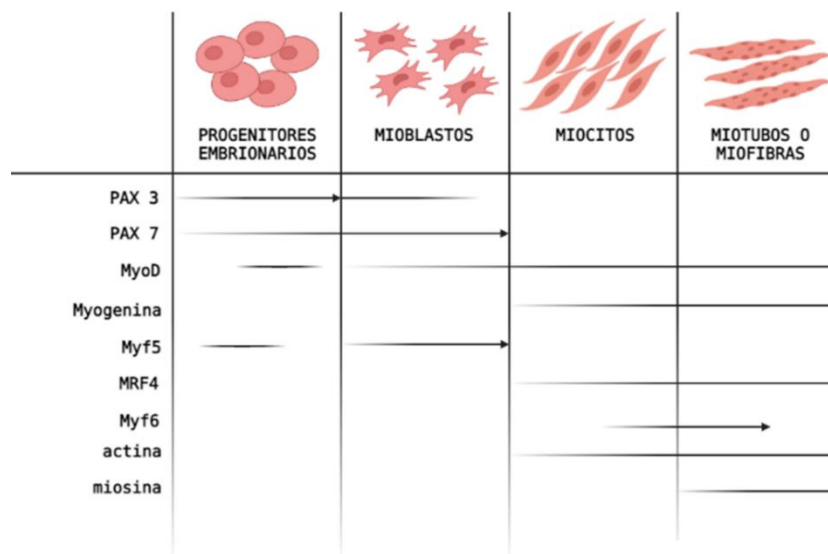
#### 1.1.1.2. Factores miogénicos

Un amplio espectro de moléculas de señalización conducen a la miogénesis durante el desarrollo embrionario y la renovación del músculo (19,20). La activación de los receptores de la superficie celular por estas señales induce vías intracelulares que conducen a la expresión de genes que asignan la identidad miogénica a los progenitores musculares (21). A continuación veremos los factores que regulan la formación muscular (Figura 2):



*Figura 2: Factores que intervienen la miogénesis.*

- Pax 3 y Pax 7:** Son un par de genes que se expresan en el mesodermo paraxial antes de la formación de los somitos, manteniendo su expresión en el epitelio somático. Pax 3 es un regulador clave de la miogénesis, activa la expresión de MyoD en los somitos (22) y junto con Pax 7 es necesario para la mayoría de los procesos de miogénesis derivados de los somitos. Además, las proteínas Pax 3 y Pax 7 parecen marcar las células miogénicas tardías que dan lugar a las células satélite responsables del crecimiento (22–24). Pueden estar ambos estrechamente regulados mutuamente, ya que cuando Pax 7 es eliminado en el locus Pax 3, la mayoría de las funciones de Pax 3 se restauran (25). La eliminación de ambos genes conlleva una formación miogénica defectuosa (26). Hay estudios que sugieren que la pérdida de Pax 3 es letal en el desarrollo miogénico embrionario, impidiendo la futura expresión de Pax 7 (27). La eliminación de Pax 7 provoca defectos en etapas posteriores del desarrollo, causando músculos más pequeños con menos miofibras (27,28). En la figura 3 podemos visualizar en la etapa del desarrollo embrionario que se expresan estos genes y otros típicos del músculo esquelético.



*Figura 3: Expresión de genes, proteínas y factores de transcripción durante la miogénesis.*

- Los factores de regulación miogénicos (MRF):** Son un grupo de cuatro proteínas específicas del músculo, entre las que se encuentran **MyoD**, **Myf5**, **Myogenin** y el **factor regulador miogénico 4 (MRF4)**, que actúan en diferentes puntos del linaje muscular para establecer de forma cooperativa el fenotipo del

músculo esquelético mediante la regulación de la proliferación, la detención irreversible del ciclo celular de las células precursoras, seguida de una activación regulada de los genes sarcoméricos y específicos del músculo para facilitar la diferenciación y el ensamblaje del sarcómero (29). Los MRF son esenciales para el desarrollo muscular. Los genes MRF se expresan exclusivamente en las células miogénicas durante la miogénesis embrionaria (30).

- **MyoD** tiene un papel fundamental en el proceso de diferenciación muscular. MyoD fue el primero de la familia MRF que se identificó (30). La activación de MyoD depende del gen Pax 3, del factor homeodomain 2 y del factor de transcripción Six1/4 (31). MyoD actúa como un activador transcripcional de algunos genes como la miogenina y también sobre inhibidores de ciclo celular ciclina-cinasa p21 y p27 (32–34).
- **Myf5** es el primer MRF que se expresa durante el desarrollo embrionario, siendo regulado transitoriamente en el mesodermo paraxial y posteriormente con los otros MRFs durante la formación del miotoma (35,36). Junto a MyoD, Myf5 regulan la activación de miogenina y el MRF4 para especificar los mioblastos para la diferenciación terminal (37,38).
- La **miogenina** y el **MRF4** participan directamente en el proceso de diferenciación y desencadenan la expresión de genes específicos de los miotubos (37,38).
- El factor de transcripción **Myf6** regula la diferenciación final de los miotubos en el ratón (39).
- **Wnt** es una señal inducida por los tejidos embrionarios que rodean al somito proceso (40,41). Se ha demostrado que la señalización de la insulina actúa con la señalización de Wnt para promover la miogénesis y la fusión de mioblastos (13,42). Las proteínas Wnt son una familia de glicoproteínas necesarias para la miogénesis en los somitas (43). La vía de señalización Wnt, activa el complejo  $\beta$ -catenina/TCF (44), para que así  $\beta$ -catenina active la miogénesis a través del MRF Myf5 (45,46). Wnt también activa MyoD a través de otra vía independiente de la catenina (47).
- **Shh** (Sonic Hedgehog): Al igual que Wnt, se trata de una señal inducida por los tejidos embrionarios que rodean al somito (40,41). Esta señal induce directamente

la expresión de Myf5 (48) y a través del factor de transcripción Gli2 regula la transcripción de MyoD (49).

- **BMP:** la proteína morfogenética ósea (BMP) inhibe la expresión de ciertos genes miogénicos, como MyoD (50). Las BMP constituyen una subclase de la superfamilia **TGF- $\beta$**  que se identificó originalmente por su papel en la formación ósea temprana (51). Las BMP ejercen sus actividades a través de receptores de serina-treonina quinasa que conducen a la activación de las proteínas SMAD y a la subsiguiente activación, o represión, de los genes diana (52).
- **NOTCH:** La activación de la señalización NOTCH desencadena un módulo de señalización que desembocará en el inicio de la miogénesis. Esto se da a través de  $\beta$ -catenina la cual se ha estudiado que activa la expresión de Myf5 y MyoD (53). La señalización NOTCH reprime la expresión de MyoD, conllevando a una pérdida de progenitores miogénicos (50).
- **La p38 MAPK** juega un papel importante en el control de la miogénesis, por lo que se ha demostrado que la inhibición de la p38 $\alpha/\beta$  (Mapk14/11) bloquea la diferenciación miogénica y la fusión celular (54). La vía del factor nuclear de las células T activadas (NFAT)/calcineurina también está activa en el músculo esquelético y participa en el control de la diferenciación miogénica, la formación de miotubos y la especificación del tipo de fibra (55).
- **TGF- $\beta$ :** *In vivo*, la elongación de las miofibras tiene lugar mediante la fusión de nuevos mioblastos en sus extremos y depende de la señalización del TGF $\beta$  (56).
- Otra proteína importante para la miogénesis es la **miostatina**, que reprime la hipertrofia muscular. En ausencia de miostatina, los mutantes muestran un llamativo fenotipo hipertrófico (57).
- Los **factores de crecimiento** también juegan un papel en la miogénesis, tal es así que el factor de crecimiento de hepatocitos (**HGF**) ayuda en la migración de los mioblastos (58). La insulina actúa en la señalización de Wnt promoviendo la miogénesis y la fusión de mioblastos (13), mientras que la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (**FGF**) promueve la proliferación de mioblastos mientras bloquea la diferenciación (59). **HGF, FGF y el factor de crecimiento insulínico (IGF)** activan las células satélite (13).

### 1.1.2. Histología del músculo esquelético

Como se ha comentado anteriormente, una fibra muscular está compuesta por varios núcleos celulares, cada núcleo se encarga de la síntesis de las proteínas (60). Aproximadamente, el 80% del contenido de las fibras son proteínas (contráctiles, reguladoras, citoesqueléticas) y el 8% sarcoplasma (61). En el epimisio, una fibra muscular está rodeada por el sarcolema, esta membrana celular proporciona estabilidad estructural y permite la transducción de señales neuronales. Además el sarcolema tiene asociadas varias proteínas que están conectado a la estructura interna del miofilamento, concretamente a la proteína actina del filamento delgado, la cual se encarga del citoesqueleto celular (62).

Los **miofilamentos** (Figura 1) se juntan y ordenan para formar los **sarcómeros**, que son las unidades contráctiles básicas del músculo esquelético. El Sarcómero es el fragmento entre **dos líneas Z** consecutivas. A su vez, podemos apreciar una zona más oscura en la línea Z conocida como **Banda I**. La banda I muestra únicamente filamentos delgados, mientras que la **banda A** contiene tanto filamentos delgados como gruesos y por ello se ve más oscura (63). Los dos miofilamentos (proteínas) más abundantes son la **actina** y la **miosina**, que comprenden aproximadamente el 70-80 % del contenido proteico total de una sola fibra. La miosina es el principal motor molecular y en los mamíferos se han descrito un total de once genes de miosina sarcomérica. De esta manera, las fibras de tipo I expresan isoformas de miosina de cadena pesada (**MyHC**) que se caracteriza por una conmutación lenta y son adecuadas para la resistencia, mientras que las fibras de tipo II expresan MyHC de rápida contracción y son adecuadas para trabajos de alta intensidad y corta duración (4). El **sarcómero** y el **sarcoplasma** contienen muchas otras proteínas que contribuyen a la estructura del **citoesqueleto**, al acoplamiento de los procesos de excitación y contracción, a la liberación de energía y a la generación de fuerza (64). Las principales proteínas reguladoras son:

- **Troponina** dependiente del calcio (que incluye las troponinas C, I y T), y la tropomiosina, que se asocian al filamento de actina y desempeñan papeles muy importantes en el proceso de activación que conduce al deslizamiento del miofilamento y a la generación de fuerza (1).
- La **titina** es una proteína elástica que se une al disco Z del sarcómero (65).

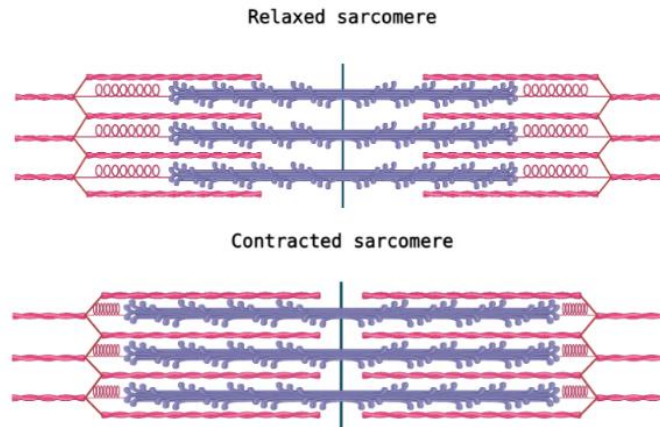
- La **nebulina** se integra en los filamentos finos que contienen actina. Junto a la titina contribuyen a las propiedades mecánicas, fisiológicas del músculo y a la integridad del sarcómero. También influyen en la tensión pasiva y en las características de rigidez de las células individuales, y pueden ser relevantes para el ensamblaje de las miofibrillas y la señalización celular (64,65).
- El **disco Z** del sarcómero contiene varias proteínas, entre ellas la actinina, y sirve de punto de unión para el miofilamento de actina. Otras proteínas conectan el disco Z (por ejemplo, la desmina) con el sarcolema y la matriz extracelular (ECM), como se ha indicado anteriormente, y pueden ser disfuncionales en algunas miopatías (1).

El sistema de **túbulos transversales T** es una invaginación del sarcolema cuyo papel importante es la conducción del potencial de acción nervioso al interior de la célula (66). Esta red de túbulos está en contacto con el exterior de la célula y asegura que la excitación pueda propagarse uniformemente por toda la fibra. La **disferlina** es una importante proteína localizada en la membrana del sistema de túbulos T y es sensible a los cambios en la concentración de calcio dentro de la célula (67).

### 1.1.3. Inervación del músculo

El deslizamiento de las proteínas responsables de la contracción muscular es el resultado final de una cascada de reacciones que transforma señales eléctricas en señales químicas, como por ejemplo voltajes de membrana a partir de **sensores de ion Ca<sup>2+</sup>**. La despolarización de la membrana de la célula muscular resulta en una rápida transmisión de la señal nerviosa o eléctrica a lo largo de la fibra muscular a través de los túbulos-T (66). La red de túbulos está en contacto con el exterior de la célula y asegura que la excitación pueda propagarse uniformemente por toda la fibra (Figura 4) (67).



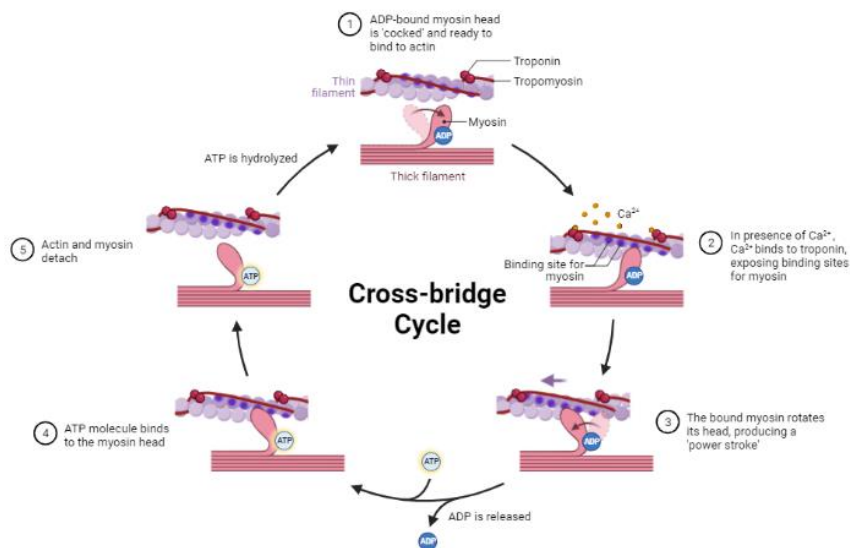


*Figura 4: Sarcómero relajado y contraído.*

En la membrana tubular se encuentran unos **biosensores de voltaje** que están directamente en contacto a **canales de salida de  $\text{Ca}^{2+}$**  del retículo sarcoplásmico de la célula (también conocidos como acoplamiento excitación-contracción). Aquí es donde se produce el cambio de señal eléctrica a química que comentamos previamente. El retículo sarcoplásmico es responsable del almacenamiento, la liberación y la recaptación de calcio tras la activación. Dos tipos de proteínas en el retículo sarcoplásmico contribuyen a mantener la homeostasis del calcio: la  **$\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa** del retículo sarcoplásmico y la **calsequestrina**. La primera es responsable de la recaptación de calcio en la cisterna tras la activación del músculo y la segunda fija el calcio de forma suelta dentro del retículo sarcoplásmico (1).

Los **sensores de  $\text{Ca}^{2+}$**  de las fibras representan una segunda interfaz que transformará la señal química en una **respuesta contráctil**. Estos biosensores son los más sensibles a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  conocidos por el hombre, en la actualidad no se ha conseguido la fabricación de un sensor artificial capaz de igualar su eficacia. Para ello los iones se unen a la troponina-C provocando la contracción de las fibras de actina/miosina en el músculo. La unión del ion  $\text{Ca}^{2+}$  a la troponina C desplaza a la tropomiosina, dejando libre los sitios activos de la actina. La miosina se une a estos puntos activos al llevarse a cabo la hidrólisis del ATP, liberando ADP y Pi. Se produce un cambio conformacional en la cabeza de la miosina que permite desplazar el filamento de actina hacia la banda H. Este nuevo cambio permite la unión de un nuevo ATP a la cabeza de miosina, separándose de la actina. Se repite el ciclo varias veces por segundo, permitiendo el desplazamiento del filamento de actina por la cabeza de la miosina hacia la banda H. El ciclo se mantendrá

siempre que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares se mantengan altas. Una vez finalizado el impulso nervioso, las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  lo devuelven al retículo sarcoplásmico (Figura 5) (63).



*Figura 5: Proceso de contracción de una fibra muscular.*

Las mitocondrias generan la energía necesaria para las acciones musculares cuando el oxígeno se pone a disposición de la fibra muscular (68). Algunas mitocondrias están situadas más cerca del sarcolema, lo que reduce la distancia de difusión del oxígeno transportado por el suministro capilar. Esto es especialmente útil durante el ejercicio aeróbico (o de resistencia) cuando aumenta la demanda de oxígeno (1).

### 1.1.4. Vascularización del músculo esquelético

El tejido muscular es uno de los que más metaboliza la glucosa ya que representa más del 80% de la eliminación de la glucosa estimulada por la insulina. La permeabilidad del músculo esquelético a la glucosa es alta, por lo que se espera que el flujo sanguíneo (suministro de sustrato) actúe como paso limitante de la tasa de captación de glucosa. La insulina desempeña un papel central como vasodilatador, para así poder eliminar la glucosa estimulada por la insulina. Tradicionalmente, la insulina induce la relajación de los grandes vasos conductores, lo que conduce a un aumento general del flujo sanguíneo y la captación de glucosa del músculo. Los capilares también responden a los efectos vasodilatadores de la insulina, lo que da lugar a una mayor perfusión microvascular. La conexión funcional entre la captación de glucosa y la vasodilatación estimulada por la

insulina se ha hecho cada vez más evidente, ya que se requiere una vascularidad tisular y una exposición a los nutrientes adecuados para un correcto metabolismo de la glucosa (69).

La angiogénesis también está inducida por el ejercicio del músculo esquelético siendo el resultado de las respuestas integradas de múltiples sistemas y estímulos. Los niveles de VEGF aumentan en el músculo ejercitado. La degradación de las proteínas de la ECM libera factores angiogénicos y hace posible la migración celular (70).

### **1.1.5. Diferencias del músculo esquelético y músculo liso**

El requisito funcional más notable de la musculatura esquelética es la capacidad de generar fuerza y/o movimiento bajo el control del sistema nervioso. Los músculos lisos, por el contrario, desempeñan funciones en el cuerpo que son más o menos continuas, y que a menudo implican muy poco movimiento o el mantenimiento de fuerzas tónicas constantes (2).

Una de las diferencias más evidentes entre las células musculares esqueléticas/cardíacas y las células musculares lisas es su tamaño y aspecto general, siendo las últimas unas de las más pequeñas del organismo. Además, las fibras y las proteínas contráctiles tienen una distribución diferente a la que presentan las células musculares esqueléticas (71).

La proporción de actina respecto a la miosina que posee el músculo liso es mayor que la del músculo esquelético (72). El músculo liso carece de troponina que posee el músculo esquelético para la regulación de los filamentos de actina, en su lugar pueden contener caldesmón o calponina que pueden desempeñar funciones modulares en la contracción del músculo liso (73). La molécula de miosina del músculo liso es morfológicamente idéntica a la miosina del músculo esquelético, pero bioquímicamente muy diferente, especialmente en lo que respecta a la regulación de la actividad ATPasa activada por la actina. La miosina lisa puede formar grandes filamentos y despolimerizarse, en lugar de ensamblarse en un filamento grueso. Esta mayor labilidad de los filamentos de miosina del músculo liso podría desempeñar un papel en los procesos fisiológicos normales y permitir una rápida reestructuración del aparato contráctil, lo que no ocurre en los sarcómeros de los músculos estriados. El menor contenido de miosina y la polimerización

incompleta de la miosina conducen a una densidad de filamentos gruesos del músculo liso mucho menor que en el músculo esquelético y cardíaco (72).

Aunque el músculo liso carece de la estructura sarcomérica organizada del músculo esquelético y cardíaco, está organizado en dominios de filamentos contráctiles. Debido a la mayor longitud de los filamentos finos y a la organización menos restringida de las unidades contráctiles, las células individuales pueden acortarse más del 70% de su longitud en reposo. El  $\text{Ca}^{2+}$  regula la contracción tanto de los músculos estriados como de los lisos, pero los mecanismos son diferentes (74).

## 1.2. Ingeniería Tisular

### 1.2.1. Definición

El fracaso de tejidos y órganos debido a enfermedades, lesiones y defectos de desarrollo se ha convertido en una de las principales preocupaciones económicas y sanitarias (75). En la actualidad, el uso de tejidos y órganos donados es la práctica clínica para hacer frente a esta situación. Sin embargo, debido a la escasez de donantes de órganos, el creciente número de personas en las listas de espera para trasplantes y el envejecimiento cada vez mayor de la población, la dependencia de los tejidos y órganos donados no es un enfoque práctico (76).

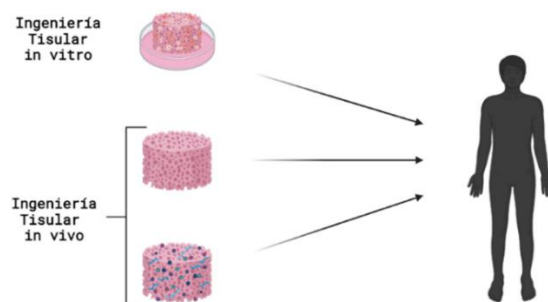
La **Ingeniería de Tejidos (IT)** ha surgido para solventar esta necesidad. La IT y la **Medicina Regenerativa (MR)** son campos multidisciplinarios que combinan conocimientos y tecnologías de diferentes campos como la biología, la química, la ingeniería, la medicina, la farmacia y la ciencia de los materiales para desarrollar terapias y productos para la reparación o el reemplazo de tejidos y órganos dañados (76,77).

Según Langer y Vacanti la IT es la aplicación de los principios de la ingeniería y las ciencias biológicas para el entendimiento de la relación estructura-función en tejidos, y el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de dichos tejido que maneja tres aspectos tecnológicos básicos: el empleo de células aisladas, el de sustancias inductoras a formación de tejido y la disposición de ambos sobre un andamios tisulares (77). Durante su crecimiento y maduración, las células están expuestas a una serie de interacciones con su entorno y las células vecinas que condicionan el éxito de estos procesos (78).

La MR es una disciplina bastante nueva, estrechamente relacionada con la IT y la biología. Se considera una rama de la investigación traslacional en IT y biología molecular. El objetivo consiste en un proceso de sustitución, ingeniería o regeneración de células, tejidos u órganos humanos para restaurar o establecer la función normal de los tejidos u órganos dañados. La originalidad de este nuevo campo de investigación radica en las condiciones de estimulación de las células y los tejidos utilizando los mecanismos de reparación del propio cuerpo para obtener nuevos tejidos u órganos funcionales (79).

En general, la IT busca fabricar implantes funcionales que puedan inducir la regeneración de los tejidos (80). Una de las principales ventajas de la IT es la reparación con precisión del defecto del tejido. Por lo tanto, es de esperar que se pueda satisfacer la demanda de injertos de tejidos, reconstrucciones quirúrgicas y dispositivos mecánicos para la reparación de tejidos (81).

Este campo ha avanzado tanto en los últimos tiempos que se está utilizando para desarrollar terapias para pacientes que padecen enfermedades crónicas graves que afectan a órganos importantes como el riñón, el corazón y el hígado proporcionándoles tejidos sanos diseñados para sustituir su tejido enfermo y restaurar su función (76). En la actualidad, la IT se ha desarrollado en dos tipos (Figura 6):



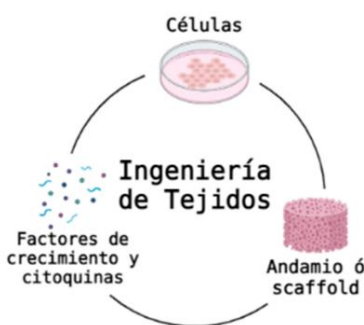
**Figura 6: Enfoques de Ingeniería Tisular.**

- Uno es la **IT *in vitro***, que consiste en implantar un complejo funcionalizado de células y andamios, cultivados *in vitro* para la formación deseada de nuevos tejidos (82,83).
- La otra es la **IT *in vivo***, basada en la implantación de un andamio que será el encargado de reclutar las células necesarias para la funcionalización *in vivo* (84–

86). Existen estudios que propician un nicho microambiental de apoyo que influye en el comportamiento de las células endógenas en el sitio de interés. Una variante dentro de la IT *in vivo* es la **IT *in situ***, donde el andamio a implantar es cargado con citoquinas o moléculas de señalización paracrina para impulsar la regeneración endógena proporcionando señales a las células huéspedes (87).

En nuestro caso nos vamos a centrar en la IT *in vitro*. Normalmente, para lograr una eficacia satisfactoria en la reparación de tejidos en esta disciplina hay que tener en cuenta tres factores clave (Figura 7) (81):

- (i) La selección de las células apropiadas, que contribuyen a la formación del tejido deseado.
- (ii) La elección correcta de los andamios que sirvan para una imitación de la ECM, que no sólo ofrezca un soporte tridimensional sino que genere un entorno de crecimiento para que las células contribuyan a la formación del tejido.
- (iii) Conseguir complejos célula-andamio que permitan un control de las interacciones entre las células y los andamios que dirijan la regeneración tisular deseada.



*Figura 7: Componentes de la Ingeniería Tisular.*

Como se está comentando es muy importante el uso de **andamios tisulares** que recreen la **matriz extracelular (ECM)**. Este concepto referencia a una red de moléculas y proteínas y fibras, en su mayoría de colágeno que proporcionan un soporte tridimensional a las células para así formar los tejidos y órganos (88). Además, la ECM le confiere a las células resistencia a la tracción (89). Aproximadamente el 30% de todas las proteínas del cuerpo de los vertebrados están compuestas por colágeno, aunque este

valor varía en función del tejido. Es muy importante conocer la ECM del tejido a recrear porque crea un entramado y un microambiente que modulará las células y su comportamiento. La célula está inmersa en un paisaje dinámico compuesto por macromoléculas insolubles de la ECM, factores bioactivos solubles y células vecinas (90). El entorno que controla el destino de la célula dentro del cuerpo vivo se denomina **microambiente celular**. Este se compone de señales de las células vecinas, estímulos físicos, factores solubles, como los factores de crecimiento, y factores insolubles, como la ECM. Se ha demostrado que la ECM influye en la mitogénesis y la quimiotaxis celular (91), dirige la diferenciación celular (92–94) e induce respuestas constructivas de remodelación del tejido del huésped (95–97).

La regeneración del tejido a partir de un cultivo de células es un procedimiento limitado; se ha comprobado que estas células necesitan un armazón físico que haga una función similar a la ECM y dirija la organización celular. La ECM de todos los tejidos define en gran medida el nicho microambiental y modula la migración, el comportamiento y el fenotipo de las células residentes durante el desarrollo, la homeostasis y en respuesta a las lesiones (87).

## 1.2.2. Componentes dentro de la Ingeniería Tisular

### 1.2.2.1. Andamios tisulares

Los andamios son estructuras diseñadas para proporcionar un entorno tridimensional en la formación de tejidos, constituyendo el soporte estructural que permite dirigir el crecimiento celular y facilitar el desarrollo de tejidos (87). Debe permitir la adhesión, el crecimiento, la diferenciación y la colonización de las células para obtener un nuevo tejido que tenga la misma funcionalidad que el sustituido. Por lo general, se trata de un biomaterial poroso. La porosidad (tamaño, distribución, diámetros de las interconexiones) desempeña un papel importante en el crecimiento y la rehabilitación de las células: cuanto mayor sea la vascularización del órgano objetivo, mayor deberá de ser el volumen poroso desarrollado y el área específica del andamio. Otros muchos parámetros, como las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del material, son muy importantes: la rugosidad, la química de la superficie, la energía de la superficie, el tipo de material (polímero o cerámica), la degradación y los productos de degradación, etc (98). La regeneración de las propiedades físicas de la ECM nativa es importante para la regeneración de las

propiedades biológicas, es imprescindible el **biomimetismo** de la ECM, que se define como la propiedad de un andamio de imitar la estructura del órgano o tejido que reemplaza (87). En el epígrafe 1.3.3 sobre las propiedades de biomateriales se detallan las propiedades que debe de tener un biomaterial y un andamio tisular.

### 1.2.2.2. Fuentes celulares

En la actualidad se utilizan diversos tipos de células para la IT. Entre ellas se encuentran las autólogas, las alogénicas, las progenitoras, las células madre adultas unipotentes o multipotentes y las iPSC. Para algunas aplicaciones, la capacidad de expandir un número suficiente de células autólogas a partir de una pequeña biopsia está bien establecida (99). Sin embargo, en muchos casos, es un reto cosechar y/o expandir suficientes células autólogas apropiadas para este propósito. Nuevas fuentes o métodos para obtener estos tipos celulares en cantidades pueden hacer avanzar la ingeniería de estos tejidos/órganos y beneficiar significativamente el tratamiento de las enfermedades asociadas (100).

La extensión de este enfoque a otros sistemas de tejidos y órganos dependerá en gran medida de la búsqueda de fuentes de células madre y progenitoras adecuadas. Actualmente se están investigando intensamente tres fuentes principales de células madre (76):

1. Las **células madre embrionarias**, que se derivan de embriones humanos desechados, y las células germinales embrionarias equivalentes;
2. Las **iPSC** derivadas de la reprogramación genética de células somáticas; y
3. Las **células madre de tejidos adultos** autólogas o alogénicas (procedentes de tejidos fetales, neonatales, pediátricos o de donantes adultos).

Todas las células madre tienen en común su capacidad de autorrenovación y su capacidad para dar lugar a determinadas clases de células diferenciadas. Las células madre embrionaria, las células germinales embrionarias e iPSC pueden servir como precursoras de muchos tipos de células especializadas que se encuentran durante el desarrollo normal y, por tanto, son pluripotentes. Las células madre adultas suelen estar restringidas a conjuntos limitados de linajes celulares, por lo que se denominan unipotentes (limitadas a un único destino) o multipotentes (pueden dar lugar a múltiples tipos celulares) (76).



En nuestro trabajo nos vamos a centrar en dos líneas celulares de mioblastos:

- **L6:** es una línea celular de mioblastos de rata.
- **C2C12:** es una línea celular de mioblastos de ratón C2 establecida por Yaffe y Saxel (101). Las células C2C12 se cultivan como mioblastos proliferativos y, mientras no alcancen la confluencia, las células pueden pasarse y expandirse indefinidamente. Sin embargo, al alcanzar la confluencia, los mioblastos comienzan a diferenciarse, fusionándose en fibras alargadas, multinucleadas y ocasionalmente contráctiles. Esta diferenciación es estimulada por la retirada de factores de crecimiento e implica la expresión coordinada de muchos genes específicos y proteínas del músculo (102).

### 1.2.2.3. Biorreactores

Se ha establecido ampliamente que los modelos de cultivo bidimensionales (2D) *in vitro* demasiado simplificados no pueden representar las complicadas respuestas fisiológicas o fisiopatológicas humanas. Aunque los avances en los sistemas de cultivo tridimensionales (3D) son prometedores, la complejidad celular heterogénea, junto con la ECM asociada del tejido nativo, no ha podido ser recapitulada por completo. En las últimas décadas, los biorreactores ofrecen la solución de ingeniería para recrear el entorno fisiológico de la regeneración tisular y se están perfeccionando para ofrecer mejores condiciones de cultivo *in vitro* y *ex vivo*, para acabar convirtiéndose en sistemas de crecimiento tisular seguros, ampliables y reproducibles (103).

## 1.3. Biomateriales

### 1.3.1. Definición

La definición actualizada de un **biomaterial** es la siguiente "**material destinado a suplir o sustituir todo o parte de un órgano deficiente**". Esta última definición integra el entorno biológico (sistema vivo, fluidos biológicos, proteínas, células y tejidos), así como las limitaciones y funciones biológicas. Por lo tanto, los biomateriales se diferencian de otros materiales en el sentido de que deben tener la capacidad de existir en contacto con los tejidos del sistema vivo sin provocar un grado inaceptable de defensa o una respuesta hostil del huésped (79).

Sin embargo, esta definición ha ido evolucionando hasta nuestros días desde que en 1967 el Dr. Jonathan Cohen (104) *“Actualmente no hay acuerdo sobre lo que distingue a los biomateriales de los demás. A efectos de este artículo, incluiré todos los materiales, excepto los fármacos y las suturas, que se utilizan como implantes.”* Según esta definición cualquier biomaterial usado como implante con un resultado positivo puede ser denominado como un biomaterial, aunque está muy lejos del concepto moderno de biomaterial.

En el sexto "Simposio Internacional Anual de Biomateriales" celebrado en Clemson, Carolina del Sur (EE.UU.), en 1974 se definió un biomaterial como una sustancia sistemáticamente inerte desde el punto de vista farmacológico, diseñada para ser implantada en un sistema vivo o incorporada a él. Es fácil intuir de aquí que se excluyen compuestos bioactivos como los vidrios bioactivos que ya existían (105).

8 años después, durante la "National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on the Clinical Applications of Biomaterials", se volvió a realizar una nueva definición similar a la del Dr. Cohen y la adición del tiempo *“in vivo”* (106): *“Una sustancia (que no sea un fármaco) o una combinación de sustancias, de origen sintético o natural, que puede utilizarse durante cualquier período de tiempo, como un todo o como una parte de un sistema que trata, aumenta o sustituye cualquier tejido, órgano o función del cuerpo.”*

En 1987, el profesor David Franklyn Williams dio una definición completamente diferente e innovadora de biomaterial (107): *“Un biomaterial es un material no viable utilizado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con sistemas biológicos.”* La definición no excluye explícitamente los fármacos y gira en torno al concepto de "no viable", lo que significa que los biomateriales no deben ser o estar compuestos por "tejidos vivos" cuando se aplican, excluyendo así cualquier trasplante.

Finalmente, en 1991 durante la “Conferencia de Consenso” de Chester, Reino Unido se dio la definición de biomaterial más aceptada (108): *“Cualquier sustancia o combinación de sustancias, que no sean fármacos, de origen sintético o natural, que pueda utilizarse durante cualquier periodo de tiempo, que aumente o sustituya parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con el fin de mantener o mejorar la calidad de vida del individuo.”*

### 1.3.2. Historia

En la breve historia de los biomateriales, se puede demostrar que desde el origen o al menos al principio de la "historia", el ser humano ha utilizado diversos materiales para sustituir órganos o partes de órganos. Algunos de estos sustitutivos fueron vidrio para los ojos, madera para los dientes, oro en la odontología o lino para suturar entre otros (109). Para comprender mejor la evolución de los biomateriales hasta llegar a los de hoy en día diferenciaremos los biomateriales en 4 generaciones (Figura 8):



Figura 8: Línea del tiempo de la historia de los biomateriales.

- La “**primera generación de biomateriales**” comenzó con la humanidad y se limitó simplemente a los materiales que estaban disponibles en el entorno natural del ser humano y que se utilizaban simplemente para sustituir órganos heridos como dientes, ojos y extremidades (109). Esta primera generación de biomateriales sólo tenía en cuenta los conceptos básicos de biocompatibilidad y funcionalidad (110).
- La **segunda** es muy larga y comenzó con la "historia" de la mejora del conocimiento humano y terminó a mediados del siglo XX - esta generación obtuvo todos los beneficios de la revolución industrial. Los biomateriales de segunda generación se desarrollaron mediante la incorporación de la propiedad de biorreabsorción, además de la bioinercia y la biocompatibilidad, conocimientos

que fueron adquiridos tras la experiencia en materias como la ciencia de los materiales, la biología, la química, la mecánica, la electricidad, la química y la ingeniería biomédica y la medicina, pueden llevar los materiales a aplicaciones médicas en tiempo real (110). Uno de los primeros biomateriales que se comenzó a usar en la antigüedad fue el oro en la reparación dental hace unos 2.600 años. Otro de los primeros biomateriales que se usaron fue el vidrio como sustitutivo de los ojos perdidos o heridos e incluso han sido hallados prótesis de madera tras una amputación de dedos del pie. Durante las dos últimas guerras mundiales y debido a las numerosas amputaciones de los soldados después de las batallas se empezaron a trabajar en prótesis de aluminio y los polímeros (111).

- La **tercera y actual generación** comenzó con el desarrollo de los polímeros como nuevos y prometedores materiales durante el siglo XX. Se consideró la interacción del biomaterial con las células, la importancia de las señales físicas y bioquímicas en la estimulación de la respuesta celular y las reacciones inmunogénicas para su uso como biomaterial potencial en la aplicación médica. El objetivo actual de los científicos es explorar el desarrollo de materiales biomiméticos, que entran en la clase de biomateriales de cuarta generación (109). Además de la biocompatibilidad, se introdujo la naturaleza biorreabsorbible para el uso de materiales en aplicaciones médicas. Así se introdujeron materiales como el nailon o la seda para suturas biorreabsorbibles con éxito en las cirugías (112).
- La **cuarta generación** está en sus inicios y es una mezcla de sueños y realidades (109). Esta generación está constituida por los materiales implicados en los recientes resultados de los avances en el campo de los biomateriales: IT, nanomedicina y MR (79).

### **1.3.3. Propiedades y cualidades necesarias para el uso de un biomaterial**

Los biomateriales a usar como andamios tisulares deben de tener propiedades similares a las de las ECM del tejido. A continuación se detallan las propiedades que debe de poseer un biomaterial y un andamio para ser usado en IT y MR:

- **Biomimetismo:** La aplicación de andamios tisulares implica la reproducción idéntica de los componentes extracelulares de un tejido u órgano. Esto puede

lograrse empleando componentes funcionales celulares específicos de los tejidos o fabricando tipos y gradientes de biomateriales fisiológicamente precisos. Para que este enfoque tenga éxito, es necesaria la replicación de los tejidos biológicos a microescala. Así pues, es necesario comprender el microambiente como se ha comentado anteriormente. En definitiva, los andamios deben tener propiedades similares a la de los tejidos a reparar (113).

- **Biocompatibilidad:** Se refiere a la capacidad de los andamios para actuar como soporte 3D que tendrán química de superficie para promover la adhesión, proliferación y migración celular *in vitro*. Después de la implantación, se refiere a la capacidad del andamio para ser tolerado por el organismo receptor, limitando la aparición de mecanismos de rechazo, mediante la producción de escasa respuesta inmune e inflamatoria (114).
- **Biodegradación:** En líneas generales, podemos decir que un material es degradable cuando su peso molecular disminuye con el tiempo. Cuando esta degradación se produce por la acción biológica del entorno, se utiliza el término “biodegradable” y cuando el material desaparece para ser incorporado al organismo, es más correcto el uso de la palabra “bioabsorbible”. Esta característica permite el reemplazo gradual y ordenado del andamio por tejido funcional. El andamio ideal debe tener una tasa de degradación apropiada, equivalente a la del proceso de regeneración del tejido sobre el que se implanta, teniendo en cuenta que los productos de degradación no sean tóxicos (114).
- **Bioactividad:** Estimulación de la rápida adhesión del tejido a la superficie del implante (sin formación de tejido fibroso) y creación de una unión estable a largo plazo que impida micromovimientos y el inicio de una respuesta inflamatoria (115).
- **Características mecánicas:** Las células mantienen un grado de tensión fisiológica dentro de los tejidos, la cual va a determinar las características mecánicas y el comportamiento de los mismos. Entre estas características hay que considerar la rigidez, flexibilidad, el módulo de elasticidad y la resistencia a parámetros como tracción, fractura y fatiga. La resistencia mecánica como todas las propiedades mecánicas de un andamio tisular debe ser la más parecida posible a la del tejido encargado de reparar y a su vez, resistente para permitir la manipulación quirúrgica (116).

- **Grado de porosidad:** La porosidad se define como el porcentaje de espacios vacíos en un sólido, y es una característica morfológica independiente del material. La estructura porosa provee al implante de dos funciones críticas: proporcionar puertas de entrada para la migración de las células y permitir una mayor área para la interacción de células específicas (113).
- **Topografía de superficie:** Uno de los objetivos en la construcción de un andamio tisular es favorecer la interacción celular; cuando un biomaterial se pone en contacto con el tejido, la reacción inicial es la adherencia de proteínas a la superficie de este material, la cual determinará posteriormente la adhesión celular. Por tanto, la superficie química del andamio es la que va a determinar la interacción celular, siendo necesaria la presencia de determinados grupos químicos, denominados ligandos, en la superficie del material. La secuencia de aminoácidos RGD, Arginina-Glicina-Aspartato, es la más usada para favorecer la adherencia celular (87).
- **Estabilidad:** La estabilidad se define como la determinación de la estabilidad física, química y estructural de los andamios en diferentes condiciones. Los andamios deben presentar cierta estabilidad a las condiciones fisiológicas que presenta el organismo y concretamente a las condiciones, fuerzas y tensiones a las que se someterá el andamio cuando sea implantado (116).
- **Esterilidad:** La esterilidad es el estado de estar libre de microorganismos patógenos. Los andamios a usar en IT deben ser capaces de mantener todas sus propiedades ante su exposición a un cualquier método de esterilización. La radiación ultravioleta, gamma, soluciones antimicrobianas y el etanol son utilizados con éxito para la esterilización de andamios tisulares (117).
- **Aplicabilidad:** La aplicabilidad se refiere al uso de los andamios en el lugar objetivo de una manera efectiva y se mantengan durante el tiempo oportuno hasta el comienzo de la regeneración del tejido. Debido a su naturaleza biodegradable, es fácilmente eliminable del lugar de aplicación sin producir ningún efecto secundario (87).
- **Vascularización:** Se conoce como neovascularización al proceso de formación de vasos nuevos en un tejido adulto, siendo esencial para permitir el intercambio de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho (118).

- **Tecnología de fabricación/potencial de comercialización:** La técnica de fabricación de los andamios es un factor crucial en la producción de andamios de IT. Es un desafío producir una gran cantidad de andamios a un costo relativamente bajo o razonable, es decir, que se pueda ofrecer fácilmente al mercado conllevando a una fácil reproducción. El valor de la formulación incluye el costo del material, la composición, y los requisitos técnicos para generar y optimizar una fórmula (115).

Los biomateriales pertenecen a la familia de los productos sanitarios. Actualmente, existe la **norma ISO 10993** que nos permite conocer los requisitos que deben de seguir tanto los productos sanitarios como los biomateriales. Esta norma, además detalla la experimentación y evaluación a la que debe de ser sometido un biomaterial tanto *in vitro* como *in vivo* para conocer su biocompatibilidad en función de su aplicación. Si el biomaterial supera todas las pruebas, el biomaterial puede llevar el **marcado CE**, que proporciona una certificación de las evaluaciones pertinentes previamente a la comercialización del mismo. Los biomateriales pueden distribuirse en cuatro clases según el riesgo que suponen para el paciente: **Clase I, Clase IIa, Clase IIb y Clase III** (artículo R5211-7 del Código de Salud Pública francés). La mayoría de los biomateriales implantados pertenecen a las clases II y III que recogen los dispositivos invasivos y estarán en contacto desde un plazo medio-largo (117).

#### 1.3.4. Clasificación y tipos

Existen diferentes criterios para la clasificación de los biomateriales. Una de las más comunes es la clasificación en base a su **estructura química**. De esta forma encontramos los biomateriales metálicos, cerámicos, poliméricos o compuestos. Otro criterio es en base al grado de **interacción con el entorno biológico**, así encontramos materiales inertes, bioactivos y biorreabsorbibles (119).

Finalmente, la tercera clasificación será la que vamos a usar en este trabajo y es en base al **origen del material**. Según este criterio encontraremos materiales naturales o sintéticos. En los siguientes epígrafes se detalla brevemente las características de los biomateriales tanto naturales como sintéticos que se han usado en este trabajo.

### 1.3.4.1. Naturales

#### 1.3.4.1.1. Colágeno

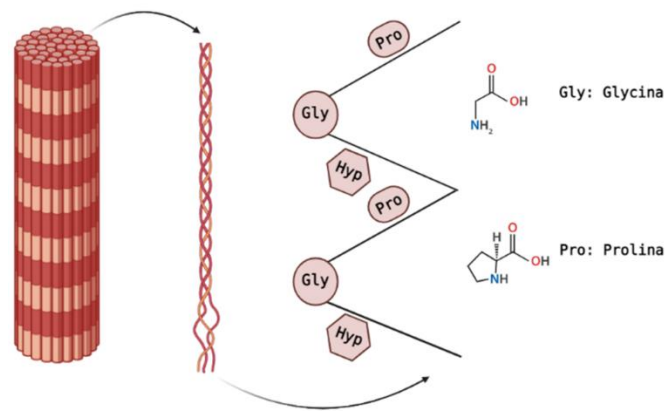
El **colágeno** es una de las principales proteínas que podemos encontrar en la ECM la cual está implicada en la expresión de diferentes funciones de las células y tejidos. Los componentes del colágeno interactúan secuencialmente entre sí y con otros constituyentes de la ECM para producir estructuras de orden superior con numerosos niveles jerárquicos de asociación y funciones específicas. Al tratarse de una de las principales proteínas de la ECM, es muy usada para reproducir su función. No obstante, hay que tener en cuenta de que la ECM va a variar según el tipo de tejido por lo que el diseño de ECM va a ser diferente según el tejido al que se dirija (120).

Principalmente, el colágeno puede distinguirse en dos tipos: **fibrilar y no fibrilar**. Hay 28 tipos de colágeno y los tipos de colágeno I, II y III son los colágenos clásicos que forman fibrillas y representan el 80-90% de todos los colágenos del cuerpo humano (120,121). La fibrilla de colágeno es muy importante desde el punto de vista de que sus propiedades y la morfología proporcionan la clave de las estructuras del andamio en el cuerpo según la localización (120).

El término colectivo "colágeno" engloba a toda una familia de glicoproteínas que se caracterizan por tres rasgos característicos. El primero de ellos es la secuencia de repetición de aminoácidos  $[\text{Gly-X-Y}]_n$ . El segundo rasgo característico es la ocupación de las posiciones X e Y por la prolina y su forma hidroxilada, la hidroxiprolina, respectivamente. En tercer lugar, la triple hélice derecha está formada por tres cadenas de poliprolina izquierda de idéntica longitud, lo que confiere al colágeno una estructura cuaternaria única. La molécula de colágeno está compuesta por una región de triple hélice y dos regiones no helicoidales en cada extremo de la hélice. La conformación de la triple hélice es el elemento estructural que define a todos los colágenos. La triple hélice del colágeno (estructura terciaria) tiene una estructura en espiral formada por tres cadenas polipeptídicas paralelas (estructura secundaria) que se enrollan una alrededor de la otra en una hélice regular para generar una estructura en forma de cuerda. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre las glicinas de las cadenas adyacentes estabilizan la triple hélice. La prolina y la hidroxiprolina estabilizan la molécula de colágeno debido a su naturaleza alicíclica, y dan rigidez a la cadena, donde se producen impidiendo la



rotación alrededor del enlace CN (122). La figura 9 representa gráficamente la estructura del colágeno fibrilar.



**Figura 9: Estructura del colágeno fibrilar.**

Las fibrillas de colágeno presentan un alto grado de alineación axial, lo que da lugar a una periodicidad característica, debida a la alternancia de zonas de solapamiento (dos hélices triples adyacentes) y de separación (hélices triples alineadas cabeza con cola con algo de espacio entre ellas), producida por la disposición de empaquetamiento específica de las moléculas de colágeno de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro (122).

Se ha demostrado que el colágeno posee una no inmunogenicidad y una buena compatibilidad celular, y puede obtenerse de diversas fuentes. El colágeno se purifica tras ser tratado con un ajuste de pH o con digestión de pepsina. En cualquier caso, el colágeno debe ser soluble en agua para poder procesarlo y utilizarlo como biomaterial. Existen varios tipos de matriz de colágeno: gel, película, micropartículas, conjugado, minipellets o esponja (123,124). Sin embargo, todavía hay muchos problemas que superar como la baja resistencia mecánica y la rápida tasa de degradación en solución acuosa del colágeno no reticulado. Principalmente, la reticulación se realiza utilizando grupos  $\alpha$ -amino de lisina o hidrolisina, y residuos de ácido aspártico o ácido glutámico (123–125). Este biopolímero puede ser reticulado utilizando la temperatura o el cambio de pH o incluso utilizando la vitamina Riboflavina (126,127). El reticulado del colágeno les proporciona resistencia a la tracción y propiedades viscoelásticas de las que el colágeno no reticulado carece (128,129). La reticulación o gelificación del colágeno requiere un mínimo de 30 minutos a 37 °C. Por lo tanto, el uso del colágeno directamente en la bioimpresión 3D es

difícil y se suele emplear en combinación con otros materiales para solventar este problema (128).

Existen trabajos de bioimpresión 3D donde combinan el colágeno con alginato sódico para el desarrollo de condrocitos presentando un aumento en la viabilidades y de las propiedades mecánicas de los andamios generados (130). Las revisiones actuales (131) indican que los trabajos se han centrado en la regeneración tisular de piel de vasos sanguíneos.

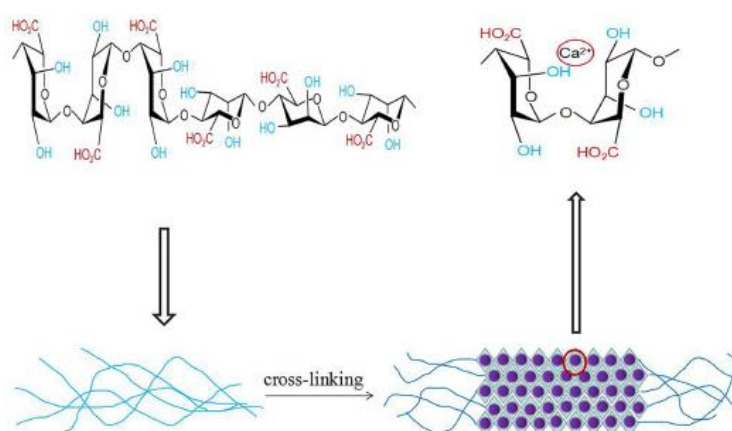
### 1.3.4.1.2. Alginato

El **alginato** es un biopolímero aniónicos naturales extraídos de las paredes de algas pardas de la familia de las “feofíceas”, tales como *Laminaria hyperborea* y *Laminaria Lessonia* (132). Es un polisacárido construido a partir de dos monómeros primero, el **ácido 1,4- $\beta$ -D-manurónico** (MA) y segundo, el **ácido 1,4- $\alpha$ -L-ácido gulurónico** (GA), que se organizan en una configuración para formar una larga cadena de polímero de naturaleza aniónica (133). La longitud de la cadena y el porcentaje de cualquiera de las unidades repetitivas alteran el funcionamiento del polímero e inducen a diferentes propiedades (134,135).

El alginato es conocido por su alta biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y por ser biodegradable (136). Tal es así que, existen varias formas de alginatos que están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para su uso principalmente como agente espesante (137). El alginato muestra una química de reticulación y encapsulación de proteínas y otras biomoléculas como fármacos gracias a su alta tasa de permeabilidad (138), permitiendo su liberación paulatina para la administración (139), pero no admite la infiltración celular. El alginato no es digerido enzimáticamente por los mamíferos y los hidrogeles de alginato solo se degradarán de manera incontrolada cuando los iones divalentes se intercambien con los medios circundantes (136). La tasa de degradación y las propiedades mecánicas del hidrogel se consideran factores críticos en la formación de nuevos tejidos. Su degradación depende en gran medida del grado de oxidación, del pH y de la temperatura del medio (140). A pesar de todas estas ventajas, se ve afectado por una estabilidad mecánica y biológica (adhesión celular, inhibiendo la proliferación celular) inadecuada producto de la ausencia

de péptidos de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), los cuales intervienen en la unión celular (136).

Para solventar estas desventajas, se reticulan largas cadenas de alginato. Existen diferentes formas de reticulación, algunas son la reticulación covalente (141) o la reticulación celular (142). Pero la más utilizada es la reticulación iónica con iones calcio (figura 10), bario, magnesio y estroncio, que potencian la gelificación del alginato favoreciendo la encapsulación de células (133). El calcio es el más utilizado debido a su carencia de toxicidad. Además, su lenta biodegradabilidad *in vivo* puede mejorarse oxidando el alginato, ya que proporciona a la estructura lugares más reactivos (136).



**Figura 10:** Estructura del gel de alginato y estructura tras reticulación (143).

Así, a partir del análisis de la literatura, se puede afirmar que, aunque los alginatos presentan retos característicos de inestabilidad mecánica y fijación celular (debido a su origen natural), estos biomateriales presentan grandes cualidades para la IT gracias a la variedad de mecanismos de reticulación modificación de la superficie, compuestos y en combinación con otros biomateriales (136).

A pesar de los inconvenientes que presentan los hidrogeles de alginato, sus posibles modificaciones permiten que sean numerosas las aplicaciones de los hidrogeles de alginato:

- **Alginatos en apósitos para heridas:** Los hidrogeles de alginato se utilizan ampliamente como interfaces de heridas en apósitos destinados a favorecer la cicatrización tras quemaduras, úlceras por presión, úlceras venosas y otras heridas cutáneas exudativas. Dado que los alginatos permiten la difusión relativamente

libre de agua y solutos, se cree que los apósitos de alginato generan un entorno relativamente fisiológico en la interfaz de la herida que favorece la cicatrización (144).

- **Alginatos en la encapsulación:** En la actualidad se está trabajando en el uso de biomateriales que sirvan como vehículo transportador de fármacos. La estructura del alginato protege y facilita la administración de los compuestos terapéuticos previstos. Debido a su flexibilidad, capacidad de modificación y biocompatibilidad bien estudiada, los hidrogeles a base de alginato suelen ser candidatos para esta aplicación. Se han encapsulado en el alginato agentes terapéuticos que van desde la insulina hasta la doxorrubicina, pasando por células y tejidos enteros, que se han administrado en el entorno fisiológico y se han estudiado en ensayos preclínicos y clínicos (144).
- **Alginato en bioimpresión 3D e IT:** Hay trabajos que han estudiado el uso del alginato para la bioimpresión 3D de andamios de alginato (136).

### 1.3.4.1.3. Gelatina

La **gelatina** es una forma desnaturalizada e hidrolizada de colágeno que se obtiene hidrolizando las fibrillas de proteína de colágeno mediante métodos físicos y químicos (145). Se obtiene principalmente de la piel de cerdo y es relativamente rentable en comparación con el colágeno debido a su forma desnaturalizada y es menos inmunogénica (146).

La propiedad termorresistente de la gelatina se debe al proceso de desnaturalización del colágeno que aporta las propiedades de gelificación reversible en la gelatina. Se gelifica fácilmente a baja temperatura y se funde a mayor temperatura en estado líquido. La gelatina se ha utilizado en varios formatos y mezclas para aplicaciones de IT debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades de procesamiento simples (145).

Se encuentra básicamente en dos tipos de gelatinas, el **tipo A**, que es obtenido por el tratamiento ácido del colágeno y el **tipo B** que se obtiene por el tratamiento alcalino. El **valor Bloom** o fuerza de gel depende de la cantidad de cadenas de colágeno intactas y de la longitud media total de la cadena del polímero natural (147).

A pesar de ser la forma desnaturalizada del colágeno, contiene muchos aminoácidos como glicina, prolina, ácido glutámico, hidroxilprolina, arginina, alanina, ácido aspártico,

etc., que despiertan el interés de los investigadores para su uso como biomaterial en IT en la fabricación de andamios (148) y otros campos de la industria farmacéutica como microesferas (149) y vehículos de administración de fármacos, factores de crecimiento (150) y células (151), selladores para prótesis vasculares o apósitos para heridas (145).

La gelatina presenta algunas limitaciones como la falta de propiedades mecánicas y la rápida biodegradación. No obstante, algunos trabajos se han centrado en el uso de la reticulación gelatina (152,153) y de su modificación química (154) para mejorar la estabilidad térmica y mecánica. En IT, la gelatina ha sido usada en 3 estados diferentes; andamios porosos en combinación con otros biomateriales como acetato de vinilo y quitosano (155) presentando una estructura porosa, adhesión celular y alineación; también se han preparado hidrogeles de gelatina reticulada y PVA o con agarosa; finalmente se han creado andamios mediante electrospinning de gelatina en combinación con polímeros como PCL para la regeneración de piel (156). Otros ensayos de andamios han mostrado una buena biocompatibilidad y potencial de diferenciación con células estromales mesenquimales alogénicas en cerebro de rata (145).

#### 1.3.4.1.4. Fibrina

La **fibrina** es una proteína que se encuentra en la sangre y ayuda a la coagulación. El hidrogel de fibrina puede fabricarse a partir de fibrinógeno mediante el tratamiento enzimático de la trombina. Este hidrogel tiene una excelente biocompatibilidad y propiedades de biodegradación, pero tiene propiedades mecánicas débiles. Es por ello que se suele mezclar con otros polímeros para aumentar la viscosidad de la tinta. Los hidrogeles de fibrina han sido usados en regeneración de uretra, nervios y encapsulamiento de células de Schwann (134).

#### 1.3.4.1.5. Ácido hialurónico

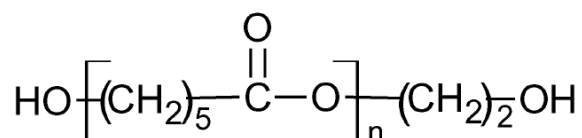
El **ácido hialurónico** (HA) es un polisacárido natural que se observa abundantemente en la ECM del cartílago y los tejidos conectivos. Es un biomaterial útil por sus propiedades de adhesión celular. Al igual que otros polímeros naturales, el HA tiene unas propiedades mecánicas bajas y un comportamiento de gelificación lento en comparación con los hidrogeles de polímeros sintéticos. Debido a sus escasas propiedades mecánicas y a su lento tiempo de gelificación, se suele modificar químicamente o mezclar con otros polímeros para lograr la imprimibilidad en 3D. Hasta ahora se han descrito muchas

mezclas diferentes de biotintas basadas en HA. Este puede ser reticulado con otros polímeros para aumentar la estabilidad de la estructura impresa manteniendo la adhesión y viabilidad celular, como el PEG o la fibrina, que se usó en regeneración de menisco y vasos vasculares, respectivamente. Otros trabajos aumentaron las propiedades mecánicas y reológicas aumentando la irradiación ultravioleta (UV) a la que se expone el gel de HA metacrilado (116,134).

### 1.3.4.2. Sintéticos

#### 1.3.4.2.1. PCL

La **policaprolactona** (PCL) es un polímero semicristalino, que presenta un punto de fusión de 59-69°C y una temperatura de transición vítrea de -60°C. Las propiedades de PCL incluyen disponibilidad, no toxicidad, biocompatibilidad y alta elasticidad (157). La PCL es un poliéster alifático sintetizado mediante la polimerización de apertura de anillo de la  $\epsilon$ -caprolactona (Figura 11). La degradación del PCL es muy lenta debido a los cinco grupos -CH<sub>2</sub> en las cadenas repetidas alifáticas y la degradación se produce principalmente a través de la escisión hidrolítica de los enlaces éster y, por lo tanto, ha recibido mucha atención como material para su uso como biomaterial implantable (158). Se trata de uno de los biomateriales poliméricos más prometedores que se ha utilizado como andamio para la medicina regenerativa. La PCL es un biomaterial aprobado por la FDA que se utiliza en aplicaciones médicas como dispositivo de administración de fármacos, suturas y barrera de adhesión (147).



*Figura 11: Estructura de la PCL.*

La PCL ha encontrado una serie de aplicaciones como andamios para aplicaciones de IT que abarcan una gama de tejidos, desde el hueso y el cartílago hasta los tejidos blandos como los vasos sanguíneos y la piel, debido a la facilidad de fabricación. Este polímero puede adaptarse a diferentes andamios 3D utilizando diferentes técnicas de fabricación como electrospinning, la impresión 3D y los métodos de extrusión (147). No obstante, uno de los inconvenientes es el problema de la hidrofobicidad, que dificulta la adhesión

celular, por lo que generalmente se recomienda su uso modificando la superficie o por la síntesis de otros polímeros hidrofílicos (159).

Diversos estudios han estudiado el uso de la PCL en andamios de impresión 3D con quitosano (160) o solos de PCL (161) en la regeneración de tejido óseo. Pektok et al. (162) produjeron andamios biodegradables de pequeño diámetro fabricados con nanofibras de PCL mediante electrospinning mostrando una mejora en la cicatrización que los injertos de ePTFE. Otra de las aplicaciones que presenta la PCL es para la liberación de fármacos a largo plazo, ya sea a través de microfibras o microesferas (163).

#### 1.3.4.2.2. Matrigel

Nombre comercial de una solución de proteína gelatinosa secretada por las células de sarcoma de ratón, que presenta una gran similitud a la ECM y se utiliza como sustrato de matriz de membrana basal para el cultivo celular. La composición del Matrigel es similar a la de una membrana basal conservada en el desarrollo temprano que facilita la organización de los microtejidos en diferentes tipos de tejidos y diferentes especies. Los componentes son la laminina-111, el colágeno IV, la entactina y el proteoglicano de heparán sulfato, que proporcionan funciones tanto estructurales como de transducción de señales. Todos estos factores la hacen altamente similar a la membrana basal embrionaria. Además de los componentes principales, se han identificado varios factores de crecimiento, como el FGF, el EGF, el TGF, el IGF y el PDGF (164).

## 1.4. Técnicas de Fabricación de andamios

### 1.4.1. Bioimpresión 3D

#### 1.4.1.1. Definición

La **bioimpresión** es una subcategoría de la **impresión 3D** o **fabricación aditiva (AM)** que se define por la impresión de estructuras utilizando células viables, biomateriales y moléculas biológicas (165,166). La bioimpresión debe producir andamios con una microarquitectura adecuada que proporcione estabilidad mecánica y promueva el crecimiento celular, al tiempo que considera el impacto de la fabricación en la viabilidad celular (167).

Tras esta definición, resulta imprescindible definir la impresión 3D, que no es más que un proceso para crear piezas directamente de un modelo de **diseñado por ordenador (CAD)**. La impresión 3D es una técnica de fabricación por capas, siendo su característica más llamativa que las piezas son creadas por adición y no por sustracción (168).

La impresión 3D o AM ha revolucionado la perspectiva del diseño de los dispositivos médicos. Esta novedosa tecnología nos permite fabricar un prototipo de un diseño CAD en un tiempo relativamente corto y con un bajo costo, evitando los largos procesos de los métodos de fabricación convencionales (168).

Sus usos y aplicaciones en biomedicina han sido muy diversos, abarcando desde sus usos en cirugía como modelos anatómicos para la planificación quirúrgica y guías para la inserción de tornillos hasta la IT y órganos artificiales pasando por sistemas de administración de medicamentos o prótesis y órtesis para países de bajos recursos (168).

### 1.4.1.2. Historia de la bioimpresión 3D

La bioimpresión ha surgido de la unión de la AM, la IT + la MR y la biofabricación. Estas tecnologías comenzaron sus andaduras en la década de 1980 por separado hasta que a comienzos de este siglo convergen para dar paso a la bioimpresión 3D (169).

Los inicios de la bioimpresión 3D se remontan a los comienzos de la impresión 3D (Figura 12). Esta tecnología comenzó en la década de 1970, pero no fue hasta 1981 cuando Hideo Kodama describió esta tecnología. Su proceso de AM se basó en la reticulación de los polímeros con radiación UV (170). Aunque presentó una solicitud de patente para esta invención en 1980, esta expiró sin pasar a las fases posteriores del proceso de patentes japonés (169). En 1984, Charles Hunt creó objetos 3D en versión reducida mediante capa a capa y exposición a la luz UV, lo que hoy en día conocemos como **estereolitografía (SLA)** (170). Durante la década y la siguiente comenzaron a surgir otras versiones de esta tecnología como es el modelado por deposición fundida (FDM), donde un termoplástico es extruido y modelado cuando se aplica calor (169); el **sinterizado selectivo por láser (SLS)**, que implica la deposición por fusión de polímero en polvo para crear un objeto 3D (171); el **robocasting** que ha empleado materiales que experimentarían el flujo y la estabilización simplemente mediante la aplicación y el cese de las fuerzas impulsoras del flujo (172).



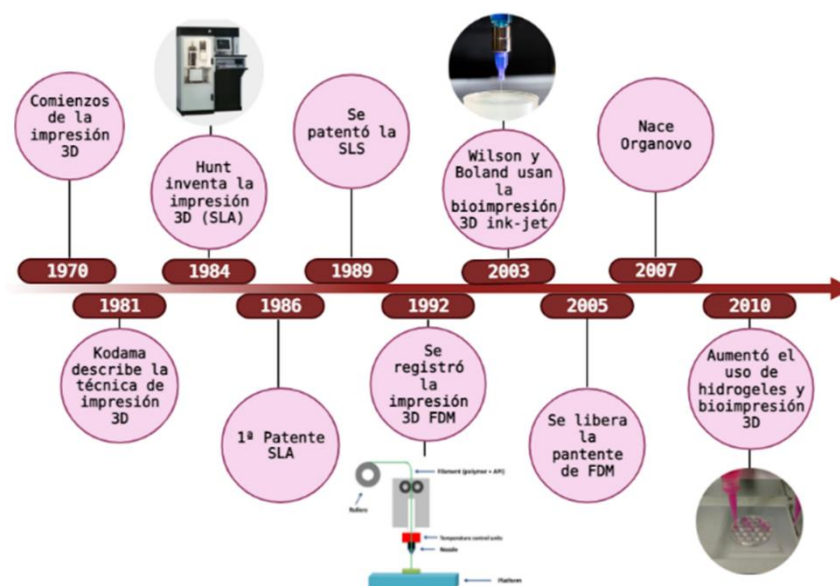


Figura 12: Línea del tiempo de la bioimpresión 3D.

Los primeros pasos de la bioimpresión consistieron en la aplicación de las tecnologías de impresión 3D (SLS, SLA, FDM) existentes en sistemas de liberación de fármacos (173) o regeneración ósea (174,175). A principios de la década de 2000 los desarrollos se centraron en la innovación de los materiales a usar, así surgió el uso de hidrogeles (176). Además la expiración de la patente del FDM a mediados de los años 2000, hizo que aumentara la investigación de la impresión 3D (169).

Poco a poco, esto fue evolucionando, y la creación de andamios biofuncionales o bioactivos condujo a centrarse en el concepto de bioimpresión de tejidos y órganos. De esta forma se comenzaron a inventar nuevas técnicas para desarrollos en IT y facilitar el control de los microambientes celulares y las interacciones célula-material como la inclusión de células dentro de hidrogeles (177). Durante la primera década de los 2000, el creciente interés y la expectación en torno a la tecnología de bioimpresión se relacionaron con un amplio interés en los enfoques de biofabricación para abordar los desafíos dentro de la IT (178).

Comenzaron a surgir algunas empresas como **Organovo**, la cual fue el resultado de una técnica de bioimpresión donde se depositaban agregados celulares y esferoides con una **impresora ink-jet** modificada provista de **agujas luer-lock** (179), se trata de una tecnología híbrida basada en gotas que apuntaba al eventual uso de tecnologías basadas en la extrusión en la impresión de esferoides (179,180).

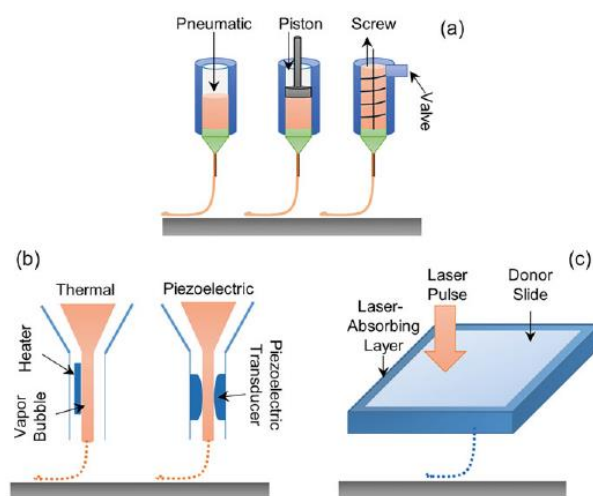
El creciente interés que despertó la bioimpresión 3D dio lugar a nuevas tecnologías de impresión 3D. El **bioplotting** consistía en una herramienta basada en la extrusión similar a las bioimpresoras de extrusión neumática y por émbolos neumática a demanda (181). La tecnología SLA fue evolucionando hasta el punto de llegar a usarse para fabricar andamios con células (182). En la década de 2000, se demostró la factibilidad del uso de la **impresión ink-jet** con biotintas que contienen células (183).

Sin embargo, los materiales a usar siguen siendo el gran reto de la bioimpresión 3D para permitir la traslación (184). Los hidrogeles que pueden sufrir una rápida reticulación en presencia de una señal química o térmica se han consolidado en la investigación de esta tecnología (178).

A principios de la década de 2010, la bioimpresión estaba bien establecida, y el campo creció junto con otras aplicaciones de la AM en la ciencia y la ingeniería (185). Cada tecnología de bioimpresión tiene sus ventajas y limitaciones. Las investigaciones actuales se basan en aprovechar el potencial de bioimpresión 3D e identificar los materiales para hacer frente a los principales retos de la IT y la medicina regenerativa: conseguir estructuras 3D (178).

### 1.4.1.3. Tipos de bioimpresión 3D

Las técnicas de bioimpresión 3D se pueden clasificar en función de los fenómenos físico-químicos que hacen depositar las biotintas. Así encontramos (Figura 13) (178):



*Figura 13: Tipos de bioimpresión 3D. a) Basado en extrusión. b) Basado en deposición de gotas (ink-jet). c) Basadas en transferencia de energía (LIFT) (186).*

- **Basados en extrusión:** Se trata de los métodos más comunes (187). Se caracterizan por la extrusión continua de un material, que normalmente está en una jeringa acoplado a la boquilla. El flujo es impulsado por presión neumática (188), por presión de un embolo o un tornillo (189). El material al ser extruido por la boquilla debe sufrir una transición rápida a un estado estable que le permita conservar su estructura 3D capa sobre capa (Figura 14). Esta transición depende de las propiedades de un material determinado (190). Algunos métodos basados en la extrusión:

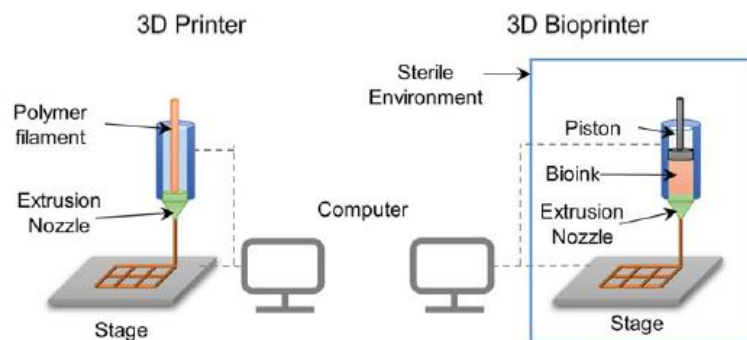
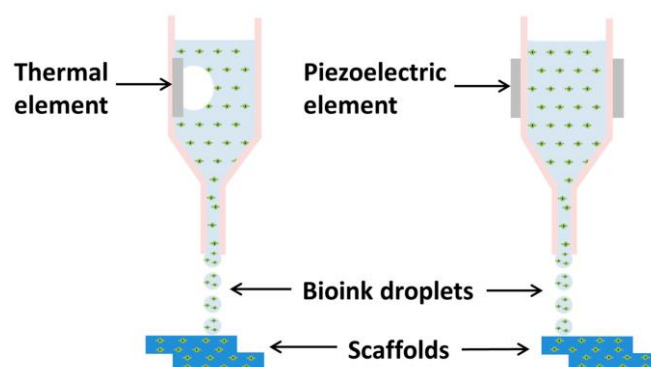


Figura 14: Bioimpresión basada en extrusión. Izquierda FDM. Derecha Bioplotting (186).

- **Fused deposition modeling (FDM):** Un material termoplástico es calentado y depositado a través de un extrusor creando filamentos de unos 200 $\mu$ m. Normalmente se suele usar en andamios acelulares debido a las altas temperaturas (191).
- **Low temperatura deposition modeling (LDM):** El enfriamiento de los materiales extruidos puede inducir transiciones térmicas que estabilicen las biotintas. Sin embargo, al igual que el FDM, las temperaturas utilizadas son incompatibles con las biotintas, por lo que la impresión es acelular. Para aprovechar las transiciones térmicas en bioimpresión las temperaturas deben oscilar entre 0 y 37°C (192).
- **Robocasting:** generalmente usado en extrusión de andamios acelulares. Se basa en depositar materiales disueltos en un disolvente volátil que al ser impreso se evapora y conduce a la formación de una construcción sólida (193).
- **Bioplotting:** La biotinta es extruida neumática o mecánicamente en un medio líquido que promueve la reticulación de la biotinta y promueve la

formación de la estructura del hidrogel. Diversos mecanismos pueden promover la reticulación: cambios térmicos, una reacción con un componente en el medio o la dispensación de múltiples componentes (194).

- **Basadas en deposición por gota:** Las biotintas van a ser depositadas en forma de gotas pequeñas sobre una superficie, donde las gotas deben estabilizarse para mantener la estructura y no fluir por la superficie. La forma de la extrusión va a variar en función de la tecnología que se use: imprimiendo sobre una superficie que contiene un agente de reticulación; utilizando un cabezal de impresión adicional para imprimir un agente de reticulación directamente sobre la biotinta; e imprimiendo sobre una superficie que está expuesta continuamente a un agente que induce la reticulación, como la exposición continua a la luz UV en el caso de una tinta fotosensible (190).
  - **Inkjet-based bioprinting:** Hay dos métodos que impulsan la salida de los pequeños volúmenes. El primer mecanismo es un mecanismo térmico en el que un microcalentador genera pequeñas burbujas de un fluido que empujará a la biotinta a salir en gotas (195). El segundo método es un dispositivo piezoeléctrico crea un cambio de volumen mecánico que provoca el desplazamiento del fluido (figura 15) (196).



*Figura 15: Esquema de ink-jet bioprinting.*

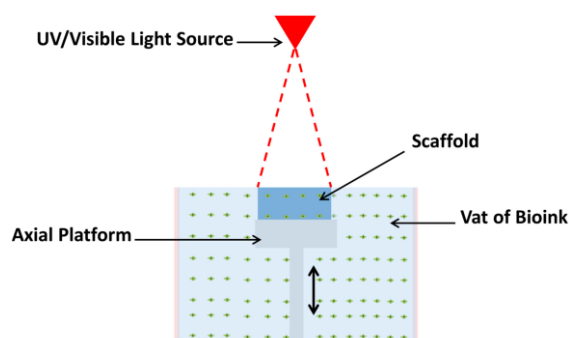
- **Microvalve-based droplet formation technologies:** La biotinta es depositada por presión neumática. Para generar las gotas, el orificio de la boquilla puede abrirse o cerrarse mediante una microválvula. Este control se consigue mediante solenoides que abren o cierran la válvula en

respuesta a la corriente eléctrica que genera un campo magnético que actúa sobre el émbolo de la válvula (197).

- **Acoustic bioprinting:** Las gotas son generadas por presión de ondas de alta frecuencia. Las ondas sonoras se generan mediante transductores de ultrasonidos que focalizan estas ondas acústicas en un punto cercano a la superficie de una interfaz fluido-aire. La convergencia de las ondas acústicas en un punto focal da lugar a una perturbación localizadora que puede expulsar gotas del tamaño de un picolitro que pueden incluir células suspendidas en el fluido (198).
- En la generación de gotas **electrohidrodinámicas (EHD)**, se aplica un alto voltaje a una boquilla conductora, en relación con una superficie de impresión conectada a tierra (199). El potencial crea un campo eléctrico entre la boquilla y la superficie e induce una carga en el fluido de la boquilla, de forma similar al electrospinning. La generación de gotas se produce continuamente en este proceso (200).
- **Laser-Assisted Bioprinting:** La bioimpresión por transferencia directa inducida por láser (LIFT) implica la transferencia de una biotinta en forma de gota desde un sustrato específico LIFT a una superficie de impresión tras la aplicación de luz láser (figura 13 c). Consta de tres partes: un portaobjetos del donante (cinta), un pulso de láser y un portaobjetos del receptor. La cinta está formada por una capa de vidrio transparente, una fina capa de metal y una capa de biotinta. La biotinta se transfiere desde la cinta al portaobjetos receptor cuando la capa de metal debajo del hidrogel se vaporiza mediante un pulso de láser. Puede ser clasificada también como transferencia de energía (167).
- **Por transferencia de energía:** Estos métodos se basan en la focalización de una fuente de energía sobre la biotinta para estabilizar el biomaterial. Las energías suelen ser calor o luz. No obstante, la naturaleza del transporte de la biotinta difiere de los métodos basados en la extrusión y en las gotas, ya que los materiales utilizados en los métodos basados en la transferencia de energía se reticulan en el lugar, en lugar de moverse como un filamento discreto o gotas desde un cabezal de impresión hasta la superficie de construcción. A diferencia de los métodos anteriores, el material se coloca sobre una superficie de construcción y la fuente

de energía se mueve sobre la superficie para reticular el material y así sucesivamente capa por capa (190).

- **Laser-Based Bioprinting o SLA:** Es una técnica de AM que utiliza luz UV o visible para polimerizar la resina fotocurable capa por capa. La polimerización se produce desde la parte superior, donde el biomaterial se expone a la energía lumínica. Después de que cada capa se polimerice, la plataforma que soporta la estructura bajará, permitiendo que una nueva capa se fotopolimerice en la parte superior (Figura 16) (167).



*Figura 16: Esquema de SLA.*

- La **sinterización selectiva por láser (SLS)** fusiona material en polvo utilizando la energía térmica de un rayo láser enfocado. El rayo láser se escanea por capas de un grosor de 20 a 150  $\mu\text{m}$ . Estos métodos basados en el polvo son intrínsecamente acelulares (ya que los procesos utilizan energía o sustancias químicas que matarían a las células). Por lo tanto, pueden utilizarse en la bioimpresión principalmente en la fabricación de andamios acelulares (201).
- Los métodos de **procesamiento digital de la luz (DLP)** o de proyección digital de la luz son muy similares a los enfoques de SLA en términos de procesamiento general, con la diferencia clave de cómo se aplica la luz a la capa reticulada. En la DLP, la luz se proyecta sobre la superficie de toda la capa a la vez, iluminando sólo las regiones que deben ser reticuladas (202).

Cada tecnología está estrechamente vinculada a un material o clase de materiales concretos. A continuación se enumeran una serie de modalidades comúnmente definidas, pero la mayoría de las bioimpresiones basadas en la extrusión que utilizan hidrogeles y

biotintas no encajan en una de estas categorías y se agruparían simplemente como "bioimpresión basada en la extrusión" sin más clasificación.

#### 1.4.1.4. Propiedades de los biomateriales de uso

Como se ha comentado en los epígrafes anteriores, los materiales en bioimpresión 3D siguen siendo uno de los grandes retos para llegar a los objetivos de la IT. Los materiales que se usan en bioimpresión 3D se denominan bioink o biotintas, aludiendo a la tinta que va a ser impresa. Esta debe de cumplir con las propiedades y características que vimos que debían de tener los biomateriales, es decir, que fueran biocompatibles, propiedades mecánicas, biodegradables o capaces de ser esterilizados entre otras (116). No obstante, la bioimpresión 3D impone una serie de características o requisitos que deben de tener los biomateriales o biotintas:

- La **imprimibilidad**, en el contexto de los biotintas, se relaciona con su procesabilidad para la aplicación específica de la bioimpresión y la posterior creación de andamios biológicos y de alta calidad. Los factores que influyen en la imprimibilidad incluyen la resolución, la fidelidad de la forma y la viabilidad celular de la estructura impresa en 3D. Estos factores pueden modularse ajustando las propiedades del material, como la viscosidad, la tensión superficial y el mecanismo de reticulación (203).
- La **tensión superficial** es precisa para mantener la integridad estructural de la biotinta tal como se imprime. Se refiere al resultado de las fuerzas cohesivas que existen entre los materiales presentes en una biotinta (134).
- El **grado de reticulación** es otra característica importante ya que permite proporcionar una buena fidelidad de la forma después de la bioimpresión (134).
- **Las propiedades mecánicas** del material seleccionado deben permitir que la biotinta cree estructuras autosuficientes con una fidelidad de forma mantenida en la impresión y permitir una integración satisfactoria con las capas previamente impresas para preservar la integridad de toda la construcción impresa en 3D (204).
- Evitar la **sedimentación celular** para que las biotintas tengan distribuciones celulares homogéneas y no se asienten (116).
- La **viabilidad de las células** y el éxito de la encapsulación dependen de muchos factores, entre ellos la rigidez de la construcción impresa, las técnicas de posprocesamiento y la hidrofiliidad y viscosidad de la biotinta. En la

bioimpresión, la fabricación de una capa puede describirse como la transferencia de energía (mecánica, térmica, química y electromagnética) de la máquina de bioimpresión al material cargado de células. Este proceso puede afectar al fenotipo y la viabilidad de las células, dañar las membranas celulares o alterar el equilibrio osmótico entre las células y el entorno externo. Uno de los criterios clave para una buena biotinta es proteger las células de las fuerzas mecánicas dañinas que se experimentan durante la extrusión (205).

- Otros aspectos importantes deseables para un biotinta **son la gelificación *in situ*, las propiedades viscoelásticas, el bajo coste, la fácil disponibilidad, la escalabilidad industrial, la biomimetización de las estructuras internas de los tejidos**, la integridad mecánica y la **compatibilidad inmunológica**, cuando se implantan *in vivo*, y la amplia variedad de diferentes tipos de células. La **permeabilidad** del gas de oxígeno, los residuos metabólicos y el transporte de nutrientes también son importantes (168).

### 1.4.2. Electrospinning

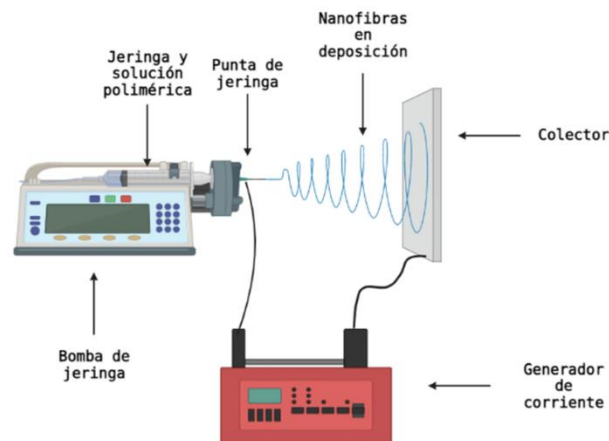
#### 1.4.2.1. Definición

En los últimos tiempos, el **electrospinning** ha surgido un gran interés por la capacidad de crear nanofibras. Fue patentado por primera vez por Cooley (206) y Morton (207) en 1902. En el campo de la biomedicina, estas nanofibras pueden utilizarse con diferentes funcionalidades, Por un lado, son capaces de imitar la ECM de los tejidos abarcando con una gran superficie (208), mientras que también pueden ser usados como dispositivos de administración de fármacos, fibras antimicrobianas y encapsulación de antioxidantes en el área de la ciencia de los alimentos (209).

El electrospinning consta de una **bomba de jeringa** con una **jeringa**, donde se encuentra la solución del material, una **hilera** y un **colector de fibras** conectado a una **fuentes de alimentación** de alto voltaje (Figura 17). El material es disuelto en un disolvente conveniente, el cual al final del proceso va a ser evaporado. La fuente de alimentación va a generar un campo eléctrico entre la punta de la jeringa y el colector. La bomba de jeringa expulsa la solución del polímero. El potencial eléctrico generado hace que el polímero se estire debido a la alta reacción de la tensión superficial de la solución por las repulsiones electrostáticas de la solución y el campo eléctrico aplicado. Cuando el



campo eléctrico aplicado supera la tensión superficial del polímero forma un hilo de polímero estable que sale del cono de Taylor. El hilo de polímero es expulsado bajo la influencia del campo eléctrico que lo desplaza hacia el colector conectado a tierra. El chorro de solución que se aplica con cargas electrostáticas sufre un estiramiento antes de llegar al colector. Finalmente, el chorro se solidifica en el colector en forma de nanofibras con la evaporación de los disolventes (210).



*Figura 17: Esquema de electrospinning.*

El electrospinning puede considerarse una variante de la técnica de electrospraying (211), ambas basadas en el uso de un alto voltaje para expulsar chorros de líquido. Las principales diferencias entre el electrospinning y el electrospraying radican en la viscosidad y viscoelasticidad del líquido implicado y, por tanto, en el comportamiento del chorro. Durante el electrospinning, el chorro puede mantenerse en forma continua para producir fibras en lugar de romperse en gotas (para la formación de partículas) como ocurre con la electrodeposición (212).

El grosor de las fibras y la morfología de las mismas puede ser modificado variando diferentes parámetros del electrospinning tales como el tipo de polímero, la naturaleza del disolvente, el voltaje aplicado, la distancia entre la punta de la jeringa y el tipo de colector (213). Por ejemplo, un colector tipo rotatorio permite obtener nanofibras alineadas mientras que el colector de tipo estático favorece la generación de nanofibras aleatorias (210).

1.4.2.2. Historia

La historia de producción de fibras se remonta a la prehistoria, tal es el hecho que se han encontrado artículos de algodón del año 5000 a.C. En el año 1300 se inventó el huso para fabricar fibras de lana y algodón para la producción de tejidos (Figura 18) (214).

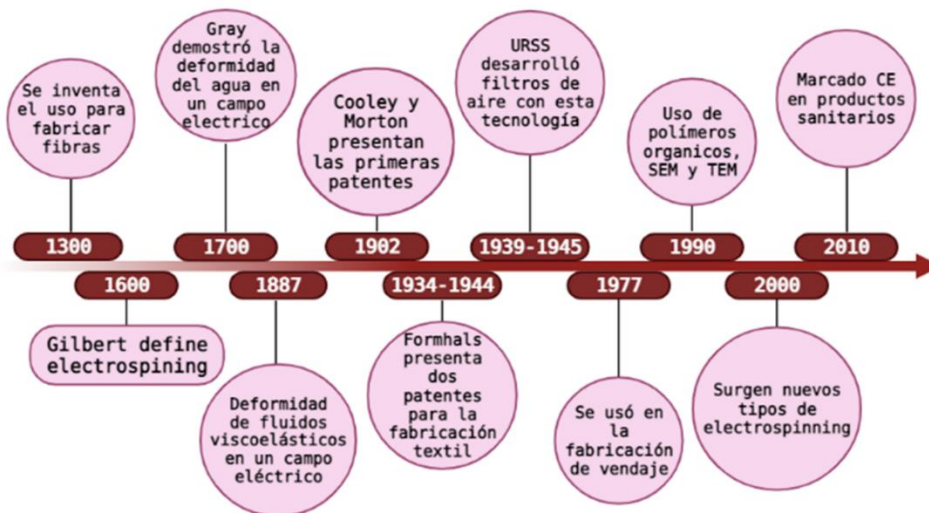


Figura 18: Línea del tiempo de electrospinning.

El concepto de electrospinning comenzó a surgir en 1600 cuando William Gilbert observó la deformación de una gota de agua en forma de cono en presencia de un campo eléctrico (215). Stephan Gray, observó un siglo después como la gota podía generar un hilo muy fino (216). Charles V. Boys, en 1887, demostró la formación de fibras finas a partir de un fluido viscoelástico en presencia de un campo eléctrico externo y cómo estas eran capaces de moverse hacia el borde del plato, lo que ahora conocemos como colector (217).

Sin embargo, no es hasta 1902 cuando John Cooley y William Morton presentaron dos patentes sobre electrospinning, respectivamente en las que se describía un prototipo de montaje para electrospinning (206,207). Posteriormente, Anton Formhals presentó un par de patentes adicionales en 1934 y 1944 para divulgar la mejora del equipo, avanzando hacia la comercialización del electrospinning para la fabricación de hilos textiles (218,219). Durante la segunda guerra mundial, la Unión Soviética desarrolló filtros de aire

mediante electrospinning. Tras estos acontecimientos, el desarrollo de la técnica de electrospinning experimentó 20 años de estancamiento, ya que no recibió mucha atención por parte del mundo académico ni de la industria. Hasta que en 1977, se patenta el uso de esta tecnología como aplicación para material de vendaje (220).

A principios de la década de 1990, gracias a la accesibilidad que presentaban los microscopios electrónicos, se comenzó a reinventar la técnica y a incrementar el uso de polímeros orgánicos para la generación de nanofibras por los grupos de Darrell Reneker y Gregory Rutledge (221,222). Durante principios de este siglo, se comenzaron a desarrollar nuevas estrategias para controlar la estructura, porosidad, morfología y la alineación de las nanofibras lo que aumentó sus oportunidades en aplicaciones en la biomedicina (223). También se desarrolló diferentes tipos de electrospinning como el coaxial que permite producir nanofibras recubiertas (224).

En la actualidad, varias empresas han diseñado y puesto en marcha líneas de producción industrial para fabricar nanofibras electrospiladas en grandes volúmenes, lo que permite obtener productos comerciales posteriores. Con la obtención de la marca de Conformidad Europea (CE) para el injerto de acceso vascular AVflo de Nicast, cada vez son más los productos biomédicos basados en nanofibras de electrospinning para uso clínico (212).

#### 1.4.2.3. Aplicaciones

La investigación biomédica actual está investigando las posibles aplicaciones biomédicas de las nanofibras fabricadas mediante electrospinning que pueden ser divididas en 2 ramas:

- **Sistemas de liberación de fármacos:** Se han desarrollado varios sistemas de administración de fármacos con nanofibras para la administración local de agentes terapéuticos debido a la gran flexibilidad en la elección del material, la facilidad de encapsulación del fármaco y la gran versatilidad en las formulaciones de los mismos (225).

Es posible crear una liberación de fármaco en 2 fases, una inicial en ráfaga seguida de una liberación prolongada, basada en la difusión del fármaco y la degradación del polímero para las formulaciones de nanofibras electrospinning (226). Sin embargo, hay veces que la liberación en ráfaga no es deseable y es conveniente

su eliminación, para ello, el uso de electrospinning coaxial nos puede ayudar a eliminar esta primera liberación e incluso retrasar el inicio de la liberación hasta que las fibras comienzan a ser degradadas (227).

No solamente es posible la encapsulación de fármaco en nanofibras, sino que hay incluso estudios que han encapsulado y liberado factores de crecimientos, tales como el VEGF o el FGF controlando su liberación con nanopartículas. Esto aceleró la epitelización y la maduración de los vasos sanguíneos (228).

- **IT:**

- **Recreación de tumores:** Las fibras electrospinning como andamios 3D para la recreación de modelos *in vitro* de tumores han sido muy usados ya que permiten imitar fielmente la interacción célula-ECM (229). Los andamios de electrospinning se han usado en la recreación de sarcoma de Ewing en 3D, melanoma y cáncer de mama, glioblastoma presentando una reproducción mejor del tumor. No solamente han sido empleados para recrear modelos tumorales, sino también como tejidos de modelos neuronales, modelos de mucosas, modelos de tejidos de la barrera hematoencefálica y modelos de cultivo de células de la glía (225).
- **MR:** Los polímeros sintéticos, como el PLGA y el PCL, se utilizan ampliamente por su buena integridad mecánica (230). En comparación, los materiales naturales, como el colágeno, la gelatina y el quitosano, presentan propiedades biocompatibles superiores, aunque con propiedades mecánicas más débiles (231). Por lo tanto, se han desarrollado andamios híbridos combinando polímeros sintéticos y naturales o polímeros sintéticos/naturales y partículas inorgánicas (232).

De este modo, mediante la modificación de las nanofibras se pretende poder controlar el comportamiento celular en función de lo que nuestras investigaciones requieran gracias a la recreación del microambiente y de la ECM (225). Es posible el recubrimiento de fibras sintéticas con polímeros naturales o factores de crecimiento mediante el electrospinning coaxial o la modificación de la superficie (233). La diferenciación celular es un factor controlable a través de las señales topográficas tales como el tamaño (234), la orientación (235) o las propiedades mecánicas (236). Por ejemplo, un andamio con fibras alineadas y blandas promoverán la diferenciación de músculo o neural mientras que una orientación más

aleatoria y unas propiedades mecánicas más rígidas promueven la osteogénesis. La creación de andamios con fibras electroactivas con biomateriales de nueva generación permiten recrear mejor la estructura y la conductividad de la ECM para la propagación de señales eléctricas y pueden regular la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células (237), facilitando la regeneración de los nervios, el corazón y el músculo esquelético (238). Los andamios de nanofibras funcionalizadas pueden mejorar la diferenciación de las células madre de forma significativa y ofrecer señales bioquímicas sinérgicas y guía de contacto para dirigir el destino de las células madre (239). La migración celular desempeña un potente papel en el desarrollo embrionario, esta puede ser controlada mediante la guía topográfica (240,241), o por la funcionalización de fibras mediante la adición de señales (242). Además de la topografía, las propiedades mecánicas también afectan a la migración celular (243). La señalización química es fundamental para el reclutamiento de células endógenas, la funcionalización de los andamios de fibra con moléculas bioactivas y factores quimiotácticos como el factor derivado de células estromales (SDF-1 $\alpha$ ), (244) el FGF y el VEGF es una vía prometedora en la IT (245), y por impresión EHD a chorro controlada espacialmente (225).

## 1.5. Biorreactores

Los **biorreactores** clásicamente han sido asociados a los bioprocesos industriales como la fermentación de levaduras. Tuvieron su origen en 1857 (246), pero sólo se ha utilizado ampliamente en la IT y la MR hasta que el concepto de IT fue propuesto y definido formalmente por la National Science Foundation (NSF) (Estados Unidos) en 1987 (247). Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas, esta idea ha ido evolucionando hasta hoy en día donde frecuentemente se aplican en IT. Ahora está claro que los biorreactores representan no sólo potentes herramientas técnicas para apoyar y dirigir el desarrollo *in vitro* de tejidos vivos y funcionales, sino también sistemas de modelos de cultivo dinámicos para estudiar los mecanismos fundamentales de la función celular en condiciones fisiológicamente relevantes (248).

En la IT intervienen tres elementos clave: las **células**, el **andamio** y las **citoquinas** (77). Sin embargo, el entorno en el que los tres elementos interactúan *in vitro* es diferente al *in vivo*, y los tres elementos suelen estar combinados, careciendo de la sincronización con diversos factores ambientales como la tensión mecánica y el campo eléctrico (103).

Los biorreactores se utilizan para recapitular los **entornos fisiológicos** en los que existen las células *in vivo*: regeneración de tejido para su posible uso clínico, probar posibles nuevos tratamientos en entornos similares a los *in vivo* y establecer nuevas dianas terapéuticas. Concretamente, en este trabajo nos centraremos en los biorreactores que están dedicados a la IT y MR. Algunos de estos sistemas pueden admitir el crecimiento de tejidos enteros en andamios, el cocultivo de células de diferentes fenotipos, generar condiciones de cultivo dinámicas que faciliten la transferencia de masa y disponer de sensores avanzados y capacidades de imagen que permitan la monitorización en tiempo real de los parámetros fisiológicos (76). De esta forma se ayuda a mitigar problemas o hándicaps que presentan los cultivos convencionales tales como la aparición de zonas necróticas y aumentar el tamaño de tejido creado (75,249). Aportando además ciertas mejoras como el crecimiento celular masivo y homogéneo de las células en el tejido voluminoso, el suministro eficiente de nutrientes y la eliminación de metabolitos, así como los estímulos ambientales esenciales (250).

Por un lado, puede convertirse en un medio importante para investigar las modulaciones de diferentes estimulaciones ambientales en el cultivo funcional 3D de células y tejidos específicos. Por otro lado, es una de las claves para mejorar la calidad del tejido funcional y reducir el coste de producción. Además, también es un paso clave en la traslación de los resultados de la IT del laboratorio a la industria para la producción a gran escala y la aplicación de directrices y procedimientos operativos estándar (103).

Entre los usos de los biorreactores en la IT destacan (251):

- Mejorar la infiltración y distribución celular sembrando dinámicamente las células en andamios.
- Facilitar la expansión celular para mitigar cambios fenotípicos indeseados que pueden ocurrir cuando se construye artificialmente un tejido.
- Superar las limitaciones de oxígeno y transporte de nutrientes que se observan en los cultivos 3D estáticos.

- Mejorar la estructura y propiedades mecánicas de la ECM.

Los biorreactores para el cultivo de tejidos representan un sistema de modelo de control para (251):

1. Estudiar los efectos de los estímulos biofísicos y agentes terapéuticos en las células y tejidos construidos.
2. Comparar las respuestas de la construcción *in vitro* en cuanto a la *in vivo*, ayudando a definir su potencial de supervivencia.
3. Desarrollar y probar regímenes de terapia física para pacientes que han recibido implantes de estos tejidos.

Los biorreactores se pueden clasificar en base a diferentes criterios, uno de ellos y más típicos es en función de las condiciones de flujo dinámico. De esta forma podemos encontrar 4 tipos de biorreactores **Spinner Flask**, los **biorreactores de perfusión**, los **biorreactores Rotating Wall Vessel** y el **biorreactor de rotación biaxial** (103,248).

Sin embargo, en este estudio nos vamos a regir por otros criterios más convenientes a nuestro tejido diana, en este caso el músculo esquelético. Algunos trabajos optan por la clasificación de los biorreactores de tejido muscular en función del desarrollo o mantenimiento del tejido muscular, si el biorreactor se implanta dentro de un organismo o se conecta al mismo (*in vivo*) o el tejido/organismo muscular se mantiene aislado de un organismo huésped (*in vitro* o *ex vivo*) (248). Concretamente, los que a este trabajo conciernen se centran en la creación de tejido *in vitro* o *ex vivo*.

El uso moderno de biorreactores para cultivar tejido muscular *in vitro* consiste en una adaptación de los biorreactores usados para la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso. Tratándose de adaptaciones físicas de sistemas ya existentes para su uso en otros tejidos (252). Tal es el caso que existen revisiones literarias dedicadas a la IT donde exponen sistemas para los huesos, los ligamentos, los tendones y los cartílagos. Todo ello ha podido ser suscitado por la combinación de actividades mecánicas tanto activas como pasivas que requiere el músculo esquelético, mientras que los tejidos óseos y cartilaginosos solamente precisan de una señal mecánica pasiva. Estas señales que requieren el músculo se tratan de actividad mecánica tanto activa como pasiva, a menudo provocada por intervenciones eléctricas aplicadas externamente estratégicamente

coordinadas para producir la contracción y alargamiento de las fibras conduciendo a un mayor aumento de la masa muscular (253,254).

### 1.5.1. Biorreactor de estimulación mecánica

Para imitar los regímenes de carga fisiológicos, algunos biorreactores han incorporado sistemas de **carga mecánica** para proporcionar fuerzas de **compresión, tensión, cizallamiento y torsión** a los injertos. A nivel celular, estos estímulos activan las vías de señalización celular de la mecano-transducción y provocan cambios como las adhesiones focales, los contactos entre células y los cambios en la expresión genética, sincronizándose contracciones con los estímulos y aumentando la expresión de proteínas de la ECM (255).

Generalmente la **compresión** se ha usado con éxito para la IT de hueso y cartílago con buenos resultados tanto de proliferación, viabilidad y diferenciación (256). Las fuerzas de **torsión** se han utilizado en la IT de ligamentos y discos intervertebrales (257). Las fuerzas cortantes o de **cizallamiento** han creado un elevado interés debido a la imitación del flujo sanguíneo. Estos estudios han demostrado un aumento de la proliferación y síntesis de ECM (258).

Finalmente, las fuerzas de **tracción** se experimentan con más frecuencia en los músculos, los tendones, los ligamentos y los tejidos cardíacos (259). Los andamios tisulares con progenitores miogénicos pueden ser estimulados mecánicamente mediante una tensión uniaxial. Los andamios son conectados a un actuador mecánico externo y realizando un acortamiento y/o alargamiento uniaxial de una distancia y frecuencia determinados. Las condiciones de cultivo pueden establecerse de forma que el propio tejido muscular genere una fuerza suficiente para provocar cambios de longitud activos o pasivos contra un punto de anclaje conforme. La reacción de los miotubos contra puntos de anclaje fijos en el cultivo tiene el importante efecto de provocar la alineación de los miotubos a lo largo del eje formado por los dos puntos de anclaje, incluso cuando no se aplican otras fuerzas externas (260).

Nagai et al. han analizado los cambios a nivel molecular, como el aumento de los niveles de fosforilación de ERK, al aplicar una tensión estática uniaxial a un andamio sembrado de células musculares esqueléticas (261). Baker et al. demostraron un aumento de la producción de colágeno y de la expresión de genes fibrosos en la carga de tracción



dinámica de las células madre mesenquimales (MSC) sembradas en nanofibras de PCL (262). Sharifpoor et al. demostraron una mayor masa de ADN, una mejor cobertura del área celular, de la distribución de las células y aumento de las propiedades mecánicas de tracción al aplicar una tensión cíclica uniaxial en andamios de poliuretano sembrados con células musculares lisas (263).

En resumen, la aplicación de señales mecánicas funcionalmente relevantes dentro de la cámara de un biorreactor ha demostrado claramente una mejor funcionalidad del tejido debido a la recapitulación del microambiente biofísico nativo. Aunque será una hazaña técnica imitar exactamente las condiciones *in vivo* per se en un biorreactor, nuestro progreso en la comprensión de los efectos mecánicos en la IT nos está acercando al desarrollo de tejidos/órganos de ingeniería clínicamente relevantes (259).

### **1.5.2. Estimulación eléctrica**

La **estimulación eléctrica** o magnética puede aplicarse a diversos tejidos, como los nervios, el corazón, los huesos y cartílagos, los músculos y el esqueleto. La mayoría de las células humanas generan y emplean señales eléctricas para comunicarse entre sí (264).

En 1987, Findl et al. propusieron el término **homeostasis eléctrica** para denominar un estado en el que las células no reaccionan permanentemente a una sola estimulación. Cuando se aplica la estimulación, la propia célula regula el entorno interno y el de la membrana celular (265). Dicha estimulación eléctrica externa altera la forma, la motilidad y dirección de las células, y afecta a la membrana plasmática (266). En condiciones normales, la estimulación eléctrica externa en el rango fisiológico no afecta notablemente a las funciones generales de la célula a nivel macroscópico (264).

La estimulación eléctrica se ha utilizado durante muchos años en cultivos celulares bidimensionales de músculo para estudiar su efecto sobre la formación de miotubos, la alineación de los miocitos, el tipo de fibra, la función metabólica, la transcripción y la síntesis de proteínas. En las construcciones musculares tridimensionales, la estimulación eléctrica puede utilizarse tanto para evaluar la contractilidad y la excitabilidad de los tejidos diseñados como para intentar guiar el desarrollo de los tejidos diseñados durante el cultivo durante un periodo superior a 2 semanas sin que se produzcan fallos (260). Se ha demostrado que la estimulación crónica de baja frecuencia altera el fenotipo y la función del músculo de ingeniería (267).

La estimulación eléctrica induce cambios en la adhesión, la migración, la proliferación, la diferenciación y la expresión génica de las células debido a los efectos sobre las vías de señalización causados por la migración de la membrana celular y los iones (268) mientras que la estimulación eléctrica de baja frecuencia aumentó el nivel de calcio intracelular e indujo la proliferación de MSC (269).

Sin embargo, el tipo de estimulación, la intensidad, la frecuencia, la duración, el estado aplicado del campo eléctrico y los periodos de descanso deben seleccionarse cuidadosamente, ya que los que están fuera de rango pueden causar resultados negativos. En general, dado que la estimulación eléctrica causa más daño a medida que aumenta la intensidad, la frecuencia o la duración del estímulo, algunos investigadores informan de que, los protocolos de estimulación deben imitar los patrones de actividad mínimos que se cree que prevalecen *in vivo*. Por lo tanto, la investigación extensiva tiene como objetivo determinar los parámetros de estimulación eléctrica que inducen la respuesta celular óptima (264).

### **1.6. Ingeniería de tejidos aplicado a músculo**

La pérdida o daño del tejido muscular puede perjudicar los mecanismos de reparación endógena (270). El uso de tejido autólogo suele ser el principal procedimiento (271), sin embargo crea nuevos defectos y aumenta la morbilidad. Los aloinjertos pueden ser usados para evitar estos problemas, sin embargo, el suministro, el estado del tejido y la inmunogenicidad son sus principales inconvenientes (272). Es por ello de que las terapias celulares están despertando un interés científico. Esta estrategia terapéutica se basa en el suministro de precursores miogénicos o células madre al tejido muscular para mejorar la regeneración y la reparación tisular gracias a la integración estructural y funcional en el tejido huésped. El uso de andamios donde cultivar con señales que imiten microentorno puede ser un regulador de la miogenicidad (273). Algunos de los problemas que se asocian a las terapias celulares pueden solucionarse adoptando un enfoque que incluya los biomateriales como nicho para las células, lo que llevaría a estrategias de IT muscular.

Los principales enfoques que se pueden encontrar en la literatura en IT de músculo se centran en el comportamiento final de las células, es decir, en la formación de miotubos funcionales que sean capaces de contraerse. El andamio aparece sobre todo como guía para la organización y diferenciación celular (274).

### 1.6.1. Músculo liso

El músculo liso se reconoce ahora como un contribuyente clave a la morfogénesis de los órganos ramificados y plegados. Al tratarse de un tejido mesenquimal participa en la señalización recíproca con el epitelio para generar complejos patrones de pliegues epiteliales (275). En los mecanismos físicos de morfogénesis inducidos por el músculo liso, existe una compleja interacción de mecanismos físicos y bioquímicos, y la comprensión de esta interacción es clave para construir una imagen completa de los acontecimientos morfogénéticos (276). Aunque el músculo liso es conocido principalmente por sus propiedades contráctiles, el acortamiento de las células musculares lisas no parece ser crítico para sus efectos morfogénéticos (277). La elevada rigidez mecánica que presentan los tejidos *in vitro* parece ser el reto para dirigir la morfogénesis epitelial.

Las investigaciones de regeneración de músculo liso se han centrado en el intestino delgado, el esófago, el pulmón, el oviducto, el epidídimo, uréter, vejiga o vasos sanguíneos (278).

### 1.6.2. Músculo esquelético

#### 1.6.2.1. Actualidad en el tema y biomateriales

Hoy en día la IT aplicada a la regeneración de tejido muscular combina el uso de células, andamios y factores de crecimiento. Los andamios permiten controlar y guiar la regeneración de los tejidos. Los andamios ofrecen a las células una ECM artificial que recrea las propiedades del tejido.

En los últimos años, se han aplicado enfoques de ingeniería muscular *in vitro*, *in vivo* e *in situ* para producir y regenerar músculo esquelético. Cada enfoque tiene sus propias ventajas y desventajas (279). Nos centraremos en el enfoque *in vitro*, el cual incluye la diferenciación *in vitro* de las células en miotubos. La estructura del tejido se suele optimizar mediante el precondicionamiento en un biorreactor antes de la implantación. Sin embargo, los principales retos de la IT del músculo esquelético *in vitro* son la dimensión requerida, la complejidad de la estructura, la insuficiente alineación de los miotubos, la insuficiente generación de fuerza contráctil (280) y la alta densidad celular necesaria para inducir la diferenciación en miotubos alineados. Además, los biomateriales

seleccionados para la ingeniería del músculo esquelético *in vitro* tienen que ser biocompatibles y las células aplicadas no deben provocar reacciones de rechazo (281). A continuación se presentan las estrategias y biomateriales descritos en la literatura para la regeneración muscular.

### 1.6.2.1.1. Bioimpresión

En los últimos años, el uso de la bioimpresión 3D se ha incrementado para la fabricación de andamios en la regeneración de músculo esquelético. El uso de la matriz extracelular descelularizada (dECM) ha sido uno de los biomateriales principales usados en bioimpresión 3D. Choi et al. desarrollaron hidrogeles a partir de dECM, con una elevada viabilidad celular y alineamiento de los miotubos que se formaron (282). Kim et al. usaron dECM- metacrilada, con unas propiedades bioquímicas y topográficas que imitaban al músculo esquelético. Además, demostraron una aceleración en la diferenciación miogénica a partir de mioblastos C2C12 (283).

Otros estudios también han usado la bioimpresión 3D mediante extrusión pero con diferentes biomateriales como el colágeno y una biotinta multicomponente con colágeno, Matrigel, fibrinógeno y ácido hialurónico. Para la reticulación de los mismos han impreso sobre una gelatina que modificaba el pH de la biotinta y así poder reticularlas. De esta manera, Hinton et al. demostraron un método eficaz para la bioimpresión 3D de colágeno y un conjunto de biomateriales para la imitación de la ECM con una alta viabilidad celular (284).

Kim et al. prepararon un hidrogel con gelatina, fibrinógeno y ácido hialurónico y crearon andamios mediante bioimpresión 3D para crear la estructura del músculo nativo. Demostraron *in vivo* que estos andamios celularizados con progenitores de músculo humano pudieron restaurar la función del músculo dañado (285).

Syedmahmoud empleó una biotinta de gelatina metacrilada y alginato con diferentes concentraciones reticuladas mediante la exposición de UV y  $\text{CaCl}_2$ . El alginato al 8% (w/v) y 10% (w/v) presentaron una características más adecuadas para la regeneración de músculo esquelético (286).

Otro estudios han usado alginato al 2.5% en combinación con PLA para la regeneración de menisco cultivados durante 16 días. A pesar de la viabilidad y las fibras

creadas, este estudio demostró la baja permeabilidad que presentaron a los nutrientes celulares. Lo cual podría ser mejorado reduciendo la concentración de los materiales (287). El alginato también ha sido usado en combinación con gelatina, demostrándose su viabilidad y sus propiedades mecánicas para la regeneración de músculo (288). Mozetic et al. crearon una biotinta de pluronic P127 y alginato. Demostraron que este hidrogel tenía la capacidad de diferenciar los miocitos en miotubos con buenas propiedades mecánicas (289).

Yang et al. utilizaron la bioimpresión 3D para la regeneración de cartílago. Usaron una biotinta de colágeno y alginato 10%(w/v), demostrando su buena biocompatibilidad promoviendo la supervivencia y la proliferación debido al aumento de la proliferación y supervivencia de los condrocitos (130).

#### 1.6.2.1.2. Electrospinning

En la regeneración de músculo esquelético, los materiales más usados para la fabricación de andamios mediante electrospinning son los polímeros sintéticos como el PLGA (290) o la PCL (291,292). Como anteriormente se vio, los materiales sintéticos precisan de materiales naturales para así aumentar su biocompatibilidad y adherencia celular (291,293).

Las diferentes configuraciones del proceso abren un abanico amplio para estudiar cuales son las configuraciones ideales para la regeneración muscular. Así se pueden ver modificadas las propiedades mecánicas de los andamios y la reorientación de las fibras sobre el andamio (274). Las fibras alineadas de los andamios de electrospinning favorecen la organización celular y la orientación de las mismas a lo largo de las fibras. Las células se fusionan mejor en mioblastos y el citoesqueleto se reorganiza a diferencia de las fibras no orientadas (294,295).

Microfibras de PCL fueron combinadas con nanofibras de fibrina para imitar la estructura jerárquica de la ECM (296). Mejoraron la formación, la orientación y la longitud de los miotubos C2C12 a través de una escala multidimensional. Los andamios de PCL y polianilina mostraron los efectos positivos que podrían tener la orientación de las fibras, sin embargo, también reportaron que las fibras aleatorias aumentaban la resistencia a la tracción y disminuían la elongación a la rotura a medida que aumentaba la concentración de polianilina (297).

Perez-Puyana et al. (159) crearon andamios de nanofibras de PCL y gelatina y de PCL y colágeno. Las fibras más pequeñas fueron más aptas para la adhesión celular. La gelatina hizo que las propiedades mecánicas fueran más similares a las del músculo. Estos andamios fueron fabricados con diferente organización de las nanofibras, concluyéndose que todas presentaban una buena viabilidad celular y que los andamios semialineados mostraron una mejora en la diferenciación y generación de miotubos.

### **1.6.2.2. Biorreactores**

#### 1.6.2.2.1. Estimulación mecánica

Varios estudios han aplicado cargas mecánicas a andamios cargados de células para desarrollar tejidos musculares funcionales y estructuralmente biomiméticas demostrando su importancia durante la miogénesis (298). También tiene un impacto significativo en el diámetro y longitud de las fibras musculares esqueléticas maduras, así como en el número de células y la composición de las miofibras (274).

Pennisi et al. expusieron miocitos a una tensión cíclica uniaxial que resultó en un estiramiento y alineamiento de los miocitos de forma perpendicular en relación al eje de tensión y provocó la diferenciación celular más rápida (299). Otros trabajos relacionaron la tensión cíclica unidireccional con un aumento de la miosina (294,300).

No obstante, otros estudios no han encontrado efecto del estiramiento uniaxial sobre la maduración y la diferenciación celular (301). Por lo tanto, todavía no existe un consenso sobre los protocolos que deben aplicarse a estas construcciones. Se prevé que la estimulación mecánica pueda inducir una respuesta biológica mejor pero aún no se ha asociado sistemáticamente, dependiendo de los parámetros de deformación utilizados (duración, frecuencia, dirección) (298).

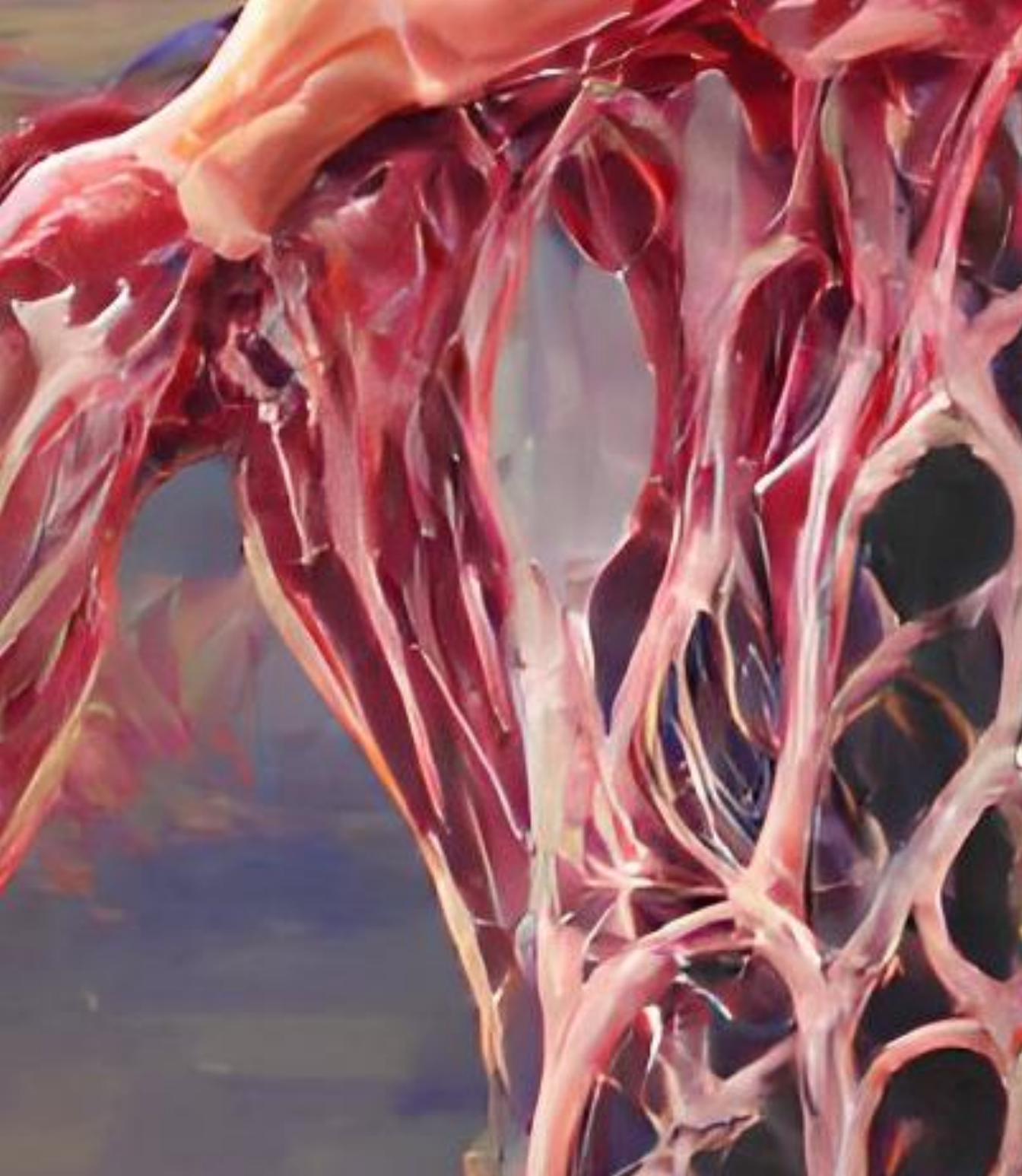
#### 1.6.2.2.2. Estimulación eléctrica

La estimulación eléctrica tiene como objeto simular el efecto de las motoneuronas sobre los andamios. Diversos estudios han demostrado el efecto sobre la maduración y la contractilidad de los miotubos ante andamios no electroestimulados (302). Se ha descrito que la estimulación eléctrica puede activar vías de señalización (303,304).

En cambio, Stern-Straeter et al. centrándose en la influencia de la estimulación eléctrica de cultivos de mioblastos primarios en una matriz de fibrina degradable, describieron el impacto negativo que induce su estimulación en el proceso de diferenciación miogénica, con una inhibición de los factores miogénicos (305). La coordinación de la estimulación eléctrica dentro del proceso de diferenciación de las células progenitoras musculares es delicada y no debe introducirse demasiado pronto (306).

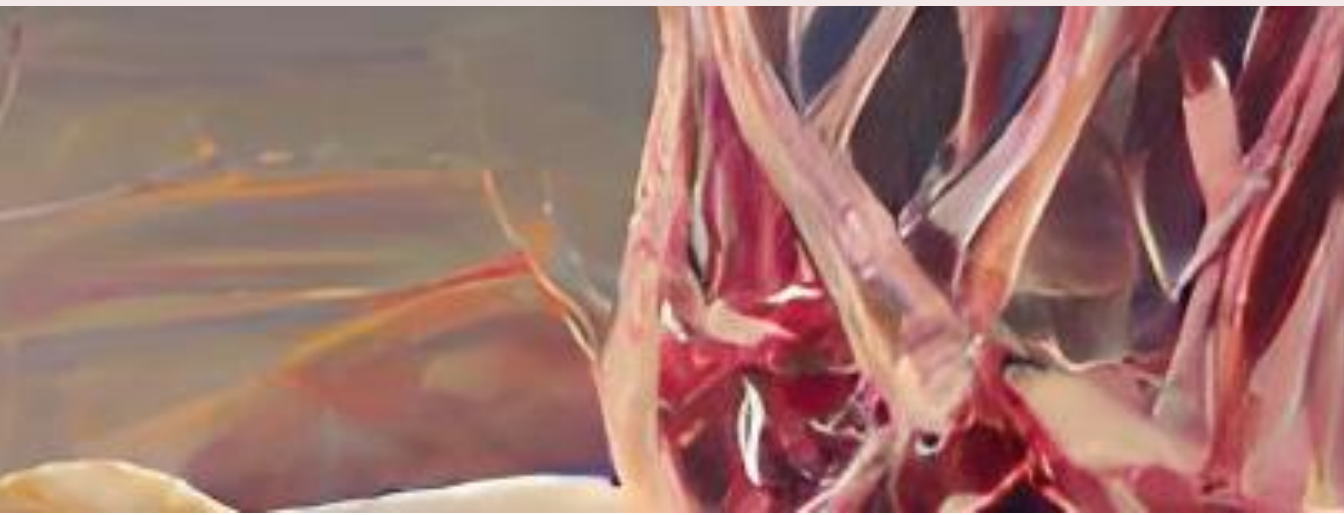






## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

# **CAPÍTULO 2**





## 2.1. Hipótesis

El músculo esquelético representa el 40% del peso total del ser humano y contribuye de manera significativa a varias funciones corporales. Su principal función es la transformación de la energía química en mecánica. El hecho de que sea un tejido altamente diferenciado, limita la capacidad para regenerarse. A pesar de que existen diferentes técnicas como tratamiento no hay en la actualidad un tratamiento para lograr la recuperación total (1).

La IT surge como una nueva disciplina que tiene como objetivo la regeneración de tejidos dañados intentando imitar las propiedades del tejido nativo (77). Para ello, entre otros elementos, hace uso de andamios tisulares que pretenden conformar estructuras tridimensionales funcionales (80). Su fabricación puede llevarse a cabo de diferentes formas, siendo la bioimpresión 3D y el electrospinning las dos más utilizadas en la actualidad.

La bioimpresión 3D ha impulsado importantes innovaciones en el campo de la IT. Esta tecnología utiliza CAD y puede facilitar la construcción de tejido vivo individualizado al defecto de cada paciente mediante el depósito directo de biomateriales, biomoléculas y células. Los materiales que encapsulan las células desempeñan un papel esencial a la hora de proporcionar un microentorno adecuado para la diferenciación celular y la maduración en el proceso de bioimpresión. Estos materiales servirán para la recreación de una ECM, que señalarán los procesos celulares, por lo que es diferente para cada tejido y linaje celular (167).

Como hemos visto en la introducción existe una vasta literatura en la que se ha empleado diferentes hidrogeles en conjunto con la bioimpresión 3D para crear andamios que permiten la habitabilidad de altas densidades celulares con una buena viabilidad (130,284,307)

Por otro lado el electrospinning es una técnica muy prometedora para la creación de estructuras de andamiaje con una conformación fibrilar que favorece la regeneración de determinados tejidos. Efectivamente, las estructuras nanofibrilares de andamios creados con este método han demostrado propiedades beneficiosas para la proliferación, adhesión y alineamiento de las células (210).

Finalmente, existen antecedentes que demuestran que la combinación de gelatina al 4% y PCL al 16% es ideal para que sea utilizada en la creación de andamios ya que crea estructuras más deformables, menos rígidos y más hidrofílica, favoreciendo una mayor adhesión celular (292).

Diferentes trabajos han descrito una mejor funcionalidad y diferenciación del tejido cuando los andamios son expuestos a estimulación mecánica (259,299), aumentando la expresión de actina y miosina (294,300), diámetro y longitud de las fibras musculares esqueléticas maduras (274). Por otro lado, la estimulación eléctrica simulando el efecto de las motoneuronas ha permitido aumentar la contractilidad de los miotubos (302), promoviendo variaciones en la adhesión, proliferación y expresión génica de las células (268). Sin embargo, estas estimulaciones pueden tener efectos negativos y es muy importante su estudio para llegar a conocer las condiciones ideales de cultivo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito nos planteamos la hipótesis de que:

**La bioimpresión 3D y el electrospinning de PCL con gelatina, así como su estimulación en un biorreactor electro-mecánico podría mejorar la creación de tejido muscular esquelético.**

## 2.2. Objetivo

### 2.2.1. Objetivo principal

Conseguir regenerar tejido músculo esquelético funcional a través de andamios tisulares fabricados mediante bioimpresión 3D y electrospinning y con la estimulación de los mismos con un biorreactor electro-mecánico.

### 2.2.2. Objetivos secundarios

- 1) Determinar la línea celular idónea de estudio.
- 2) Fijar el tiempo de cultivo.
- 3) Valorar la cantidad de células a usar en la siembra de los andamios.
- 4) Precisar la mejor técnica para la fabricación de andamios para la regeneración de tejido muscular-esquelético.
- 5) Describir los estímulos convenientes para la regeneración del tejido.

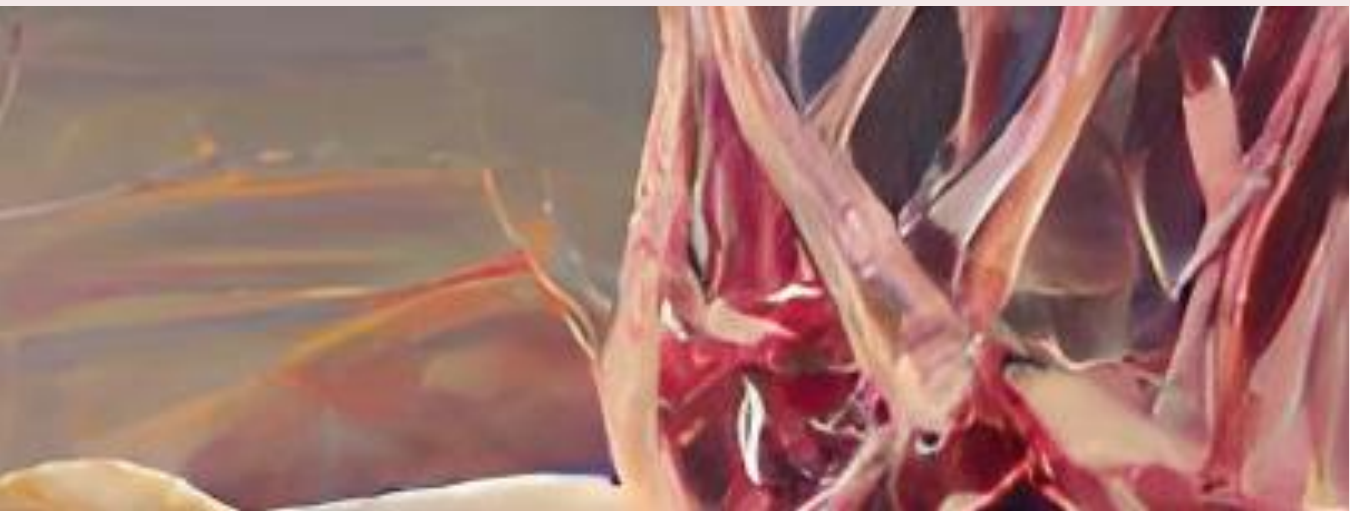
- 6) Determinar la viabilidad celular de los andamios y cuáles son los mejores andamios para la regeneración atendiendo a la viabilidad celular y su morfología.
- 7) Estudiar el grosor de las fibras.
- 8) Analizar la direccionalidad de las fibras.
- 9) Examinar la densidad nuclear de los miotubos.
- 10) Estudiar la expresión de actina y la morfología del citoesqueleto de los miotubos.
- 11) Comprobar la funcionalidad de las fibras.







# MATERIALES Y MÉTODOS



# CAPÍTULO 3





### 3.1. Tipo de Estudio

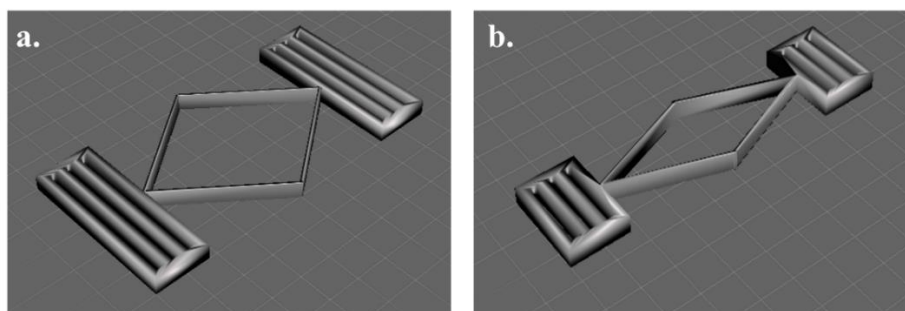
Estudio comparativo *in vitro* para la regeneración tisular de músculo esquelético a partir de andamios creados mediante bioimpresión 3D de hidrogeles de colágeno en combinación con otros biomateriales frente a andamios fabricados mediante electrospinning de PCL y gelatina y estimulados mecánica y eléctricamente.

### 3.2. Diseño de dispositivos

Para el diseño de los dispositivos se usó el software de diseño asistido FreeCAD 0.17 (FreeCAD © Juergen Riegel, Werner Mayer), un modelador 3D paramétrico, libre y multiplataforma.

#### 3.2.1. Andamios tisulares

Se generó una estructura 3D de 1 mm de altura, 20 mm de largo y 10 mm de ancho. Su conformación consta de un rombo hueco de 14 mm de largo y 10 mm de ancho, en cada uno de los extremos longitudinales, se encuentran un prisma rectangular de 3 mm de largo y 10 mm de ancho (Figura 19 a, andamio 1). Cada prisma está conectado al rombo en su parte central. Se diseñó otro andamio igual, pero 5 mm de ancho en lugar de 10 (Figura 19 b, andamio 2).

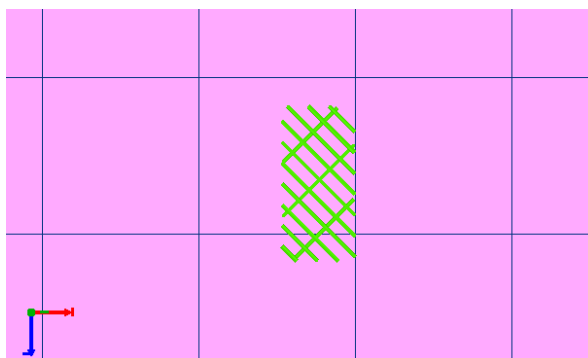


*Figura 19: Diseño de andamios. a. Andamio 1. b. Andamio 2.*

Diseñado el andamio, se exportó desde FreeCAD como archivo STL, para utilizarlo en el proceso de bioimpresión más adelante. Gracias al software propio de la bioimpresora REGEMAT3D, se plantearon y realizaron diversas modificaciones para aumentar la eficacia de la fijación del hidrogel sobre los andamios: la impresión del hidrogel con una

estructura rectangular sólida sin poros para abarcar toda la estructura y variaciones en cuanto a la posición de la cama en el eje de impresión para aprovechar al máximo cada impresión. Para ello, se ajustaron las distintas características como el patrón de relleno, dimensiones del andamio, extrusor y altura de capa.

Otro diseño de andamios (andamio 3, figura 20) que se usó fue un rectángulo de 0.8 mm de altura, 5 mm de ancho y 10 mm de largo. El poro interno del andamio fue un poro rectangular con una orientación de 45° respecto al eje longitudinal de 2 mm x 0.5 mm.

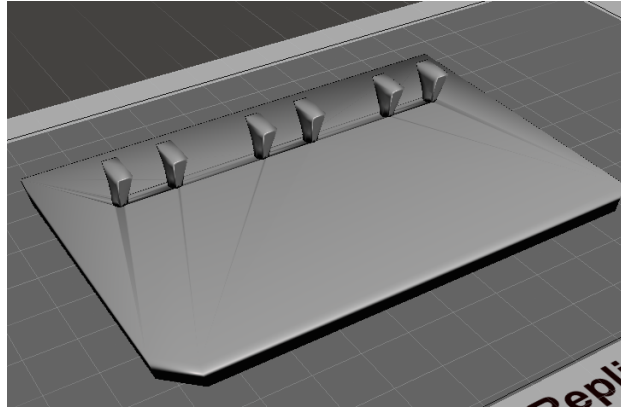


*Figura 20: Andamio 3.*

### 3.2.2. Placa electroestimulación

Con el objeto de poder estimular los cultivos sin necesidad del uso de la cámara del biorreactor Ebers, se diseñó una tapadera (Figura 21) para una placa de 6 pocillos de unas dimensiones de 83 x 125 x 20 mm con unos orificios y guías por las que se introducen los electrodos para la electroestimulación. La tapadera consistió en una réplica de una tapa con la particularidad de la adición de 6 orificios, 2 para 3 pocillos por los que poder introducir unos electrodos para la estimulación eléctrica. El radio de los orificios fue de 2 mm. Los orificios tenían unas guías de 20 mm de ancho que llevaran hasta el fondo del pocillo el electrodo. Las guías fueron creadas mediante proyección entre un cilindro de 2 mm de radio y un rectángulo de 10 x 4 mm. Las guías de cada pocillo estaban separadas 20 mm.

A su vez, se diseñó otra placa de las mismas características pero con la diferencia de que las guías fueron fabricadas con PCL conductor para evitar la introducción de los electrodos.



*Figura 21: Diseño tapadera para electroestimulación.*

### **3.3. Cultivo celular**

Para el cultivo celular (Figura 22) se emplearon las líneas celulares de músculo esquelético de *Rattus norvegicus* L6 (ATCC® CRL-1458, Virginia, EEUU) y mioblastos de *Musculus*, de ratón C2, C2C12 (ATCC CRL-1772, Virginia, EEUU). Las células se cultivaron por separado pero en las mismas condiciones. Fueron sembradas en medio de crecimiento (DMEM/High Glucose, HyClone™ Dulbecco's, Nuevo Hampshire, EEUU) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (F7524, SigmaAldrich, Missouri, EEUU) y penicilina-estreptomicina al 1% (15140-122, Gibco, Nuevo Hampshire, EEUU) (GM) y se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 85-90% de confluencia. Se subcultivaron las células empleando tripsina/EDTA al 0.05% (25300-062, Gibco, Nuevo Hampshire, EEUU) para su posterior inclusión en los andamios.



*Figura 22: Cultivo celular.*

Los andamios fueron cultivados en placa con GM y se mantuvieron en un incubador con temperatura y dióxido de carbono (37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Transcurridos 4 días el medio

fue modificado por medio de diferenciación (DMEM/High Glucose, HyClone™ Dulbecco's) suplementado con suero fetal bovino al 2% (FBS) y penicilina-estreptomicina al 1% (DM) hasta completar las 2, 3 o 4 semanas (según procediera) desde su siembra. En todo momento el medio fue cambiado cada 48-72 horas. En el caso de los andamios que se cultivaron durante 1 semana, el medio GM se cambió a DM a las 24 horas de la siembra.

### **3.4. Fabricación de hidrogeles para bioimpresión 3D**

Los hidrogeles utilizados fueron los siguientes:

#### **3.4.1. Colágeno**

Se propuso la preparación de un hidrogel compuesto únicamente por colágeno tipo I (4 mg/ml, Opticol Collagen, Cell. Saint Louis, EEUU), Se usó una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL de la línea L6 y se cultivaron durante 4 semanas.

#### **3.4.2. COL / Matrigel**

Se preparó el hidrogel con colágeno tipo I 3mg/ml (4 mg/ml, Opticol Collagen, Cell. Saint Louis, EEUU) y Matrigel (Corning Matrigel® U.S., 5ml) 2.5mg/ml. Se usó una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL de la línea L6 y se cultivaron durante 4 semanas.

#### **3.4.3. MEC**

La biotinta simplificada como MEC consiste en una solución de a base de colágeno tipo I 3mg/ml (4 mg/ml, Opticol Collagen, Cell. Saint Louis, EEUU), Matrigel 0.3125mg/ml, fibrinógeno 12.5mg/ml (MP Biomedicals LLC® Solon, Ohio, pH 6.6, Purity 100%, 1400 cfu/g), BSA o albúmina de suero bovino 12.5mg/ml (Sigma-Aldrich® Bovine Serum Albumine, New Zealand, pH 7, Purity>95%, 40mg/ml). Se usó una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL de la línea L6 y se cultivaron durante 4 semanas.

#### **3.4.4. Colágeno y alginato**

Se creó una tinta a base de medio de crecimiento (DMEM/High Glucose, HyClone™ Dulbecco's, Nuevo Hampshire, EEUU) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (F7524, SigmaAldrich, Misuri, EEUU) y penicilina-estreptomicina al 1% (15140-

122, Gibco, Nuevo Hampshire, EEUU) donde se disolvió alginato sódico de viscosidad baja (A1112, Sigma Aldrich, Nuevo Hampshire, EEUU) a una proporción de 2% y 4% (w/v). Finalmente se añadió colágeno (4 mg/ml, Opticol Collagen, Cell. Saint Louis, EEUU) para conseguir diferentes concentraciones.

Las concentraciones empleadas en las biotintas fueron las siguientes:

- 1) CA1: 0.8 mg/ml de Colágeno y 16 mg/ml de Alginato (Alg. 2%). Se usó una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL,  $40 \times 10^6$  células/mL y  $80 \times 10^6$  células/mL de las líneas L6 y se cultivaron durante 3 semanas.
- 2) CA2: 0.8 mg/ml de y 32 mg/ml de Alginato (Alg. 4%). Se usó una densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL,  $80 \times 10^6$  células/mL y  $160 \times 10^6$  células/mL de las líneas L6 y C2C12. Se mantuvieron en cultivo durante 2 semanas.
- 3) CA3: 3 mg/ml de Colágeno.  
10 mg/ml de Alginato (Alg. 4%).
- 4) CA4: 3.5 mg/ml de Colágeno.  
5 mg/ml de Alginato (Alg. 4%).
- 5) CA5: 1 mg/ml de Colágeno.  
30 mg/ml de Alginato (Alg.4%)
- 6) CA6: 0.5 mg/ml de Colágeno  
35 mg/ml de Alginato (Alg. 4%)

Para las biotintas CA3, CA4, CA5 y CA6 se resuspendieron las células C2C12 en una densidad de  $20 \times 10^6$  células/mL. Se mantuvieron en cultivo durante 1 semana y el DM diferenciación se cambió a las 24 horas tras la siembra.

### 3.4.5. Gelatina

La gelatina fue utilizada como soporte para mantener la estructura de los andamios de colágeno, colágeno y Matrigel y MEC en el momento de la bioimpresión hasta la reticulación de los mismos. Se empleó este material ya que a bajas temperaturas, este material está gelificado, mientras que a  $37^\circ\text{C}$  se disuelve.

Se disolvió la gelatina al 4.5% w/v en 150 mL 11mM de  $\text{CaCl}_2$  (21059, Sigma Aldrich, Nuevo Hampshire, EEUU) en un vaso agitador y se gelificó durante 12h a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez gelificado, se añadieron 350 mL de 11 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La mezcla se removió

durante 120s con el emulsionador Unguator (Microcaya S.L., Bilbao, España). Una vez mezclado, se cargó el contenido en los falcon necesarios y se centrifugó durante 2 minutos a 4200 rpm (revoluciones por minuto), para posteriormente reemplazar el sobrenadante por 11mM CaCl<sub>2</sub> a 4 °C. Esto se repitió hasta que no se observaron burbujas en la parte superior del sobrenadante. Finalmente, se almacenó la gelatina a 4 °C hasta su uso en la bioimpresión.

### 3.5. Bioimpresión 3D

Previo a la bioimpresión, fue imprescindible mantener, todo el espacio de trabajo en condiciones asépticas. Para ello, se esterilizó de forma previa el espacio que comprende toda la cabina junto con la bioimpresora de Regemat V1 (Regemat 3D, Granada, España), utilizando el método de radiación UV durante 40 minutos como mínimo. Con ello, se procura que la impresión se realizase bajo condiciones estériles en una cabina de flujo laminar (N-BioTek AEMA ®, Korea del Norte) (Figura 23).



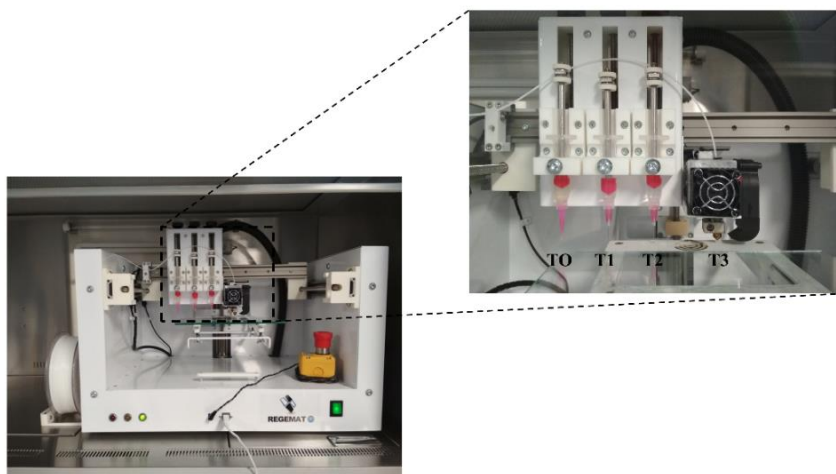
*Figura 23: Campana de flujo laminar.*

La biotinta fue incluida en la jeringa T1 como se muestra en la figura 24. Para la reticulación de las biotintas se usaron diferentes agentes, en función del hidrogel que se usó. En los casos de los hidrogeles de colágeno y colágeno y Matrigel se usó un corrector

de pH para neutralizar la solución y un cambio de temperatura a 37°C. En el caso de MEC, se usó el corrector de pH, trombina 0.01 U/ml (T7326, Sigma-Aldrich, Misuri, EEUU), necesaria para regular la coagulación de la fibrina y cambio de temperatura. Finalmente para los hidrogeles de colágeno y alginato, se usó cloruro cálcico al 10%. El agente reticulante se incluyó en la jeringa T2.

Se prepararon las jeringas y extrusores y la impresión se realizó en el siguiente orden:

- 1) Con el extrusor T3 se depositó el filamento de PCL (50,000 g/mol; 750 g; 1.75 mm; 3D4Makers, Haarlem, The Netherlands), encargado de imprimir el andamio de PCL construyendo la forma previamente establecida y diseñada.
- 2) La jeringa T0 fue rellena con la gelatina en los casos que fueran necesarios.
- 3) La jeringa T1 se cargó con la biotinta y las células de tejido musculo-esquelético. Se utilizaron 500, 250 o 100  $\mu$ L del hidrogel, en función del andamio usado.
- 4) La jeringa T2 se rellenó con el reticulador de los hidrogeles según correspondieran a cada uno.



*Figura 24: Bioimpresora y cabezal de bioimpresión.*

### **3.6. Fabricación de andamios de electrospinning**

Los andamios fabricados mediante electrospinning (Figura 25) fueron diseñados y proporcionados por el grupo de Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes de la Universidad de Sevilla, en colaboración con la Universidad de Maastricht en Holanda



(MERLN Institute of Regenerative Medicine). Su fabricación fue detallada en el trabajo de Pérez-Puyana et al. (159).



*Figura 25: Andamio fabricado mediante electrospinning.*

Brevemente, la PCL y la gelatina se disolvieron en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) durante el proceso de fabricación por electrospinning, la concentración del PCL era de 16% w/v y la de la gelatina de 4% w/v. La solución fue preparada a temperatura ambiente y estuvo en agitación durante 24 horas. Las condiciones de procesamiento fueron establecidas de la siguiente forma: el voltaje fue de 14kV; la velocidad de flujo fue 0.4 ml/h; distancia desde la aguja al colector de 14 cm; la temperatura fue de 25°C y humedad de 40%. Se usaron 3 tipos de andamios, los cuales variaron en la velocidad angular al colector, esto derivó en el grado de alineamiento de las nanofibras. Así se obtuvieron andamios de PCL/Gelatina random cuya velocidad angular fue 0 rpm y un alineamiento de  $0.13 \pm 0.03$ ; andamios de PCL/Gelatina semialineados con velocidad angular de 300 rpm y un alineamiento de  $0.40 \pm 0.04$ ; y andamios de PCL/Gelatina fabricados con una velocidad angular de 600 rpm y un alineamiento de las fibras de  $0.75 \pm 0.02$ . Los andamios fueron esterilizados mediante radiación ultravioleta como paso previo a la siembra con  $10 \times 10^6$  células de la línea C2C12.

### **3.7. Determinación de condiciones ideales de cultivo**

En la tabla 1 se indican las diferentes combinaciones de experimentos que se realizaron de los diferentes biomateriales usados para esclarecer las combinaciones que se mantuvieron:



BIOTINTA	LÍNEA CELULAR	TIEMPO DE CULTIVO	VOL	DENSIDAD CELULAR	Nº CÉLULAS POR ANDAMIO	ESTIMULACIÓN	ENSAYOS
COLÁGENO	L6	4 SEM	500	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	10 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	IHQ PROP MECANICAS
COLÁGENO MATRIGEL	L6	4 SEM	500	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	10 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	IHQ PROP MECANICAS
MEC	L6	4 SEM	500	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	10 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	IHQ PROP MECANICAS
COLÁGENO ALGINATO 1	L6	2 SEM	500	20 x 10 <sup>6</sup> cell/mL 40 x 10 <sup>6</sup> cell/mL 80 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	10 x 10 <sup>6</sup> cell/mL 20 x 10 <sup>6</sup> cell/mL 40 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	CONTROL ELÉCTRICA	IHQ VIABILIDAD
COLÁGENO ALGINATO 2	L6	24H 2 SEM	250	40 x 10 <sup>6</sup> cell/ml 80 x 10 <sup>6</sup> cell/mL 160 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	10 x 10 <sup>6</sup> cell/ml 20 x 10 <sup>6</sup> cell/mL 40 x 10 <sup>6</sup> cell/mL	CONTROL ELÉCTRICA MECÁNICA	VIABILIDAD
COLÁGENO ALGINATO 2	C2C12	24H 2 SEM	250	160 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	40 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL ELÉCTRICA MECÁNICA	VIABILIDAD IF
COLÁGENO ALGINATO 3	C2C12	1 SEM	100	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	2 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	VIABILIDAD IF
COLÁGENO ALGINATO 4	C2C12	1 SEM	100	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	2 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	VIABILIDAD IF

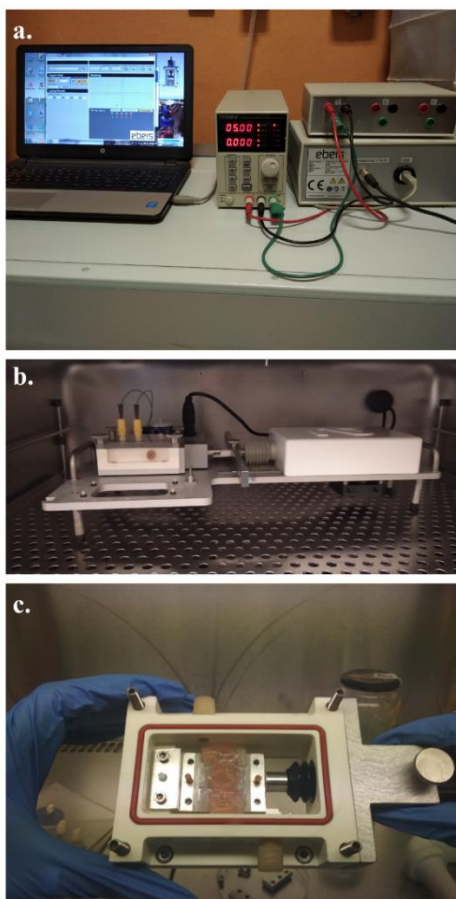
Tabla 1: Tipos de andamios y ensayos realizados.

BIOTINTA	LÍNEA CELULAR	TIEMPO DE CULTIVO	VOL	DENSIDAD CELULAR	Nº DE CÉLULAS EN ANDAMIO	ESTIMULACIÓN	ENSAYOS
<b>COLÁGENO ALGINATO 5</b>	C2C12	1 SEM	100	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	2 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	VIABILIDAD IF
<b>COLÁGENO ALGINATO 6</b>	C2C12	1 SEM	100	20 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	2 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	CONTROL	VIABILIDAD IF
<b>RANDOM</b>	C2C12	2 SEM	-	10 x 10 <sup>6</sup>	10 x 10 <sup>6</sup>	CONTROL	VIABILIDAD IF TEST CALCIO
<b>SEMI ALINEADOS</b>	C2C12	2 SEM	-	10 x 10 <sup>6</sup>	10 x 10 <sup>6</sup>	CONTROL	VIABILIDAD IF TEST CALCIO
<b>ALINEADOS</b>	C2C12	2 SEM	-	10 x 10 <sup>6</sup>	10 x 10 <sup>6</sup>	CONTROL ELÉCTRICA MECÁNICA	VIABILIDAD IF TEST CALCIO

Continuación tabla 1: Tipos de andamios y ensayos realizados.

### 3.8. Estimulación de los andamios con biorreactor

Los andamios que presentaron un mayor alineamiento y viabilidad celular en estático fueron además estimulados mediante biorreactor. El biorreactor que se usó fue el biorreactor TC3 (EBERS Medical Technology SL, Zaragoza, España) (Figura 26). Este modelo permite la estimulación de los cultivos tanto mecánica como eléctricamente. Para ello, el sistema cuenta con un módulo de control, un sistema accionamiento para la generación de la estimulación mecánica, un sistema de control para la estimulación eléctrica y un generador de corriente. El biorreactor EBERS TC3 es controlado por ordenador diseñado para garantizar una actuación adecuada y fiable. El software de control permite una fácil programación, control y monitoreo de condiciones que serán aplicadas sobre los andamios y cultivos, tales como grado de estiramiento, la velocidad de deformación y el ciclo específico de dicha deformación.



*Figura 26: Biorreactor TC-3. a. Ordenador, generador de corriente, módulo de control y sistema de control para la estimulación eléctrica. b. Sistema de accionamiento para la generación de la estimulación mecánica. c. Capsula hermética con andamios.*

El sistema TC-3 está diseñado para contener muestras de tejido o andamios en los cuales las células son cultivadas mientras que son sometidas a estímulos de cargas mecánicas de tensión o de compresión o señales eléctricas. Para su uso, el biorreactor se encuentra dentro del incubador New Brunswick (CO<sub>2</sub> Incubator Shaker S41i, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) que permite emplear un atmosfera propicia para el cultivo celular.

La cámara de cultivo (Figura 26 c) es hermética y puede montarse y desmontarse de forma sencilla. Los materiales de las cámaras son biocompatibles, no citotóxicos y han sido esterilizados a través de autoclave. El intercambio de gas entre la atmósfera del incubador y la parte interna de la cámara se consigue a través de membranas gaseosas permeables.

Para la estimulación mecánica se usaron unas mordazas planas que permiten transferir la carga de compresión a los andamios a través de un actuador lineal controlado por ordenador para impulsar las mordazas, transmitiendo las cargas a las muestras. El módulo de estimulación eléctrica permite la aplicación de estímulos eléctricos de forma coordinada con los estímulos mecánicos a través de electrodos de **platino**.

Los andamios se cultivaron durante 15 días desde su siembra. La figura 27 muestra el diseño del experimento. Se generaron 3 grupos en función de la estimulación que recibieron:



*Figura 27: Esquema temporal de ensayos.*

- Grupo control: Grupo sin estimulación.
- Grupo estimulación mecánica. Transcurridas 48 h desde la siembra de los andamios, los andamios fueron estimulados mecánicamente a lo largo del eje longitudinal de los andamios. La estimulación varió en las dos semanas de cultivo:
  - 1) Semana 1: Estimulación mecánica con una amplitud del 5% (0.9 mm) a una frecuencia de 0.5Hz durante 55 min y 5 min de reposo en relajación (figura 28 a).
  - 2) Semana 2: Estimulación mecánica con una amplitud del 10% (1.8 mm) a una frecuencia de 0.5Hz durante 55 min y 5 min de reposo en relajación (figura 28 b).



*Figura 28: Configuración estimulación mecánica. a. Semana 1. b. Semana 2.*

- Grupo estimulación eléctrica. A las 48 h de la celularización de los andamios, fueron electro-estimulados durante 2 semanas. La estimulación eléctrica se dio de dos formas diferentes que sirvió para comparar la efectividad de ambos métodos con andamios alineados de PCL y gelatina con células C2C12 sembradas. El primero fue mediante el uso de la cámara del biorreactor ebers, y la segunda a través de la placa diseñada (Figura 29). Los pulsos eléctricos se sincronizaron para que el pulso eléctrico fuera generado en el momento que las mordazas del biorreactor estuvieran en el momento más próximo (Figura 30 c). Los pulsos eléctricos fueron:

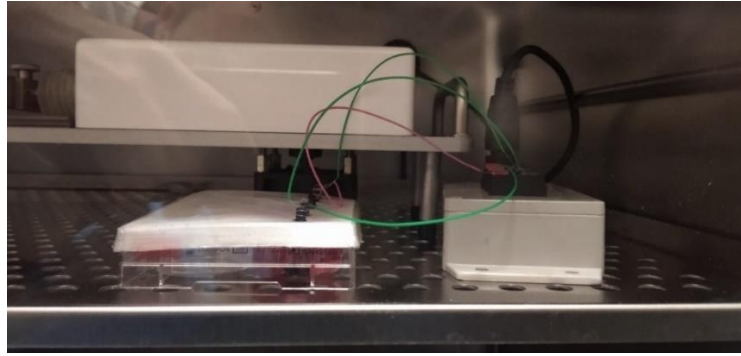


Figura 29: Estimulación eléctrica mediante tapadera de placa diseñada.

- 1) Semana 1 (Figura 30 a): Estimulación eléctrica con pulsos de 1V a una amplitud de 1ms y una frecuencia de 0.5Hz durante 55 min y 5 min de reposo en relajación.
- 2) Semana 2 (Figura 30 b): Estimulación eléctrica con pulsos de 5V a una amplitud de 1ms y una frecuencia de 0.5Hz durante 55 min y 5 min de reposo en relajación.

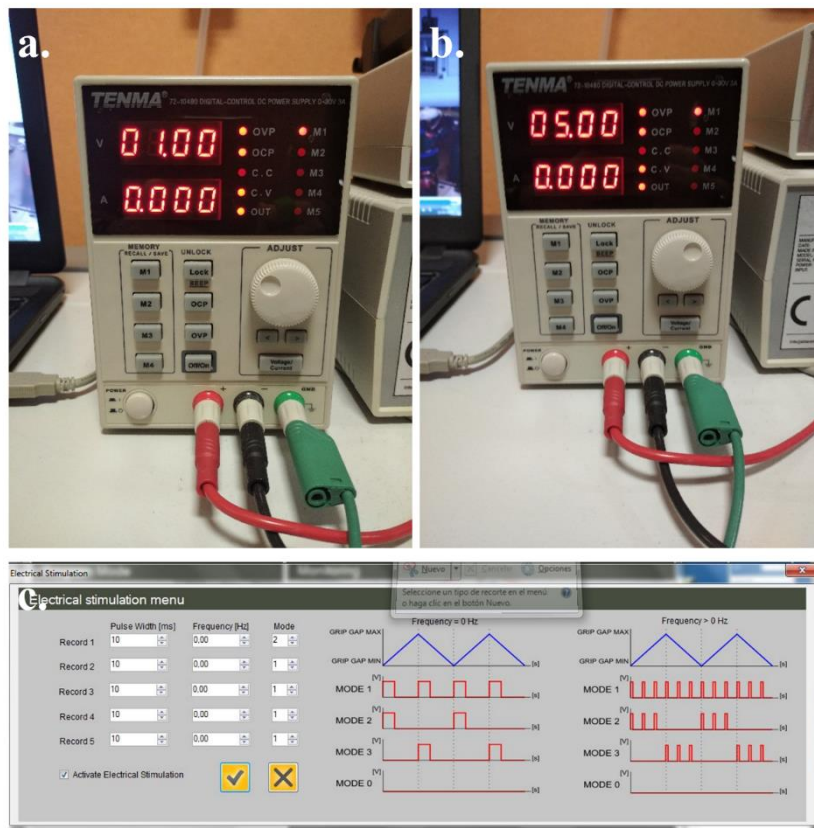


Figura 30: Estimulación eléctrica. a. Generador durante semana 1. b. Generador durante semana 2. c. Sincronización con estimulador mecánico.

### 3.9. Pruebas reológicas

Para obtener parámetros de interés únicamente del andamio de PCL, se realizó un ensayo de tracción para obtener el módulo de Young y así caracterizar su comportamiento elástico. Para el estudio completo, se aplicó un ensayo de tres puntos, dividido en el test de barrido de deformación y en el test de barrido de frecuencia, con el que se obtendrán parámetros de interés como el módulo elástico y viscoso, además de comprobar la funcionalidad a un esfuerzo dinámico a 5Hz de frecuencia, que es concretamente la condición dinámica del biorreactor en el que se incubará el andamio.

Para aplicarlo correctamente, hubo que introducir los sensores reservados para el ensayo de tres puntos en la máquina. A continuación se colocó el andamio en posición equidistante en el sensor, y se calibró la fuerza aplicada ajustando los sensores y acercándolos al máximo hacia el andamio, hasta llegar al punto más próximo al andamio y aplicar el cero indicador.

Finalmente, bastó con personalizar la geometría del ensayo de tres puntos (añadiendo la longitud, la anchura y el espesor del andamio) para poder realizar el primer test de este ensayo, denominado como "Dynamic Strain Sweep Test" o test de deformación, en el que se averiguó el parámetro necesario para el test de frecuencia, la deformación crítica, además de otros parámetros de interés, como el módulo elástico o viscoso del material, junto con la tangente delta. Con la deformación crítica se conoce la fuerza que destruiría internamente la estructura del andamio, necesaria para realizar el test de frecuencia.

Una vez obtenida la deformación crítica, se realizó a otro andamio del mismo tipo (ya que el anterior quedó deformado debido al ensayo) el ensayo de frecuencia de 0 a 20Hz, aplicando por convenio el 65% del valor obtenido como deformación crítica, para asegurar la permanencia o la no rotura del andamio. De esta forma, se pudo obtener los módulos elásticos y viscosos, entre otras propiedades de interés, y comprobar si a 5Hz el andamio se comporta elásticamente para poder ser tratado en un biorreactor de estimulación mecánica longitudinal. Estos estudios reológicos se realizaron tanto para conocer las propiedades del andamio de PCL como para comprender el comportamiento de las propias láminas de los distintos hidrogeles depositados en el mismo.

### 3.10. Ensayo de viabilidad celular

Se usó el kit LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells (L3224) (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para el estudio de viabilidad celular. Este kit está compuesto por dos componentes, la calceína y el EthD-1. Las células vivas se distinguen por la presencia de una actividad esterasa intracelular ubicua, determinada por la conversión enzimática de la calceína AM, prácticamente no fluorescente, en calceína intensamente fluorescente. La calceína permite teñir el citoplasma celular de verdes ya que se trata un tinte polianiónico que es retenido por las células vivas produciendo una fluorescencia verde intensa y uniforme en las células vivas (ex/em ~495 nm/~515 nm). EthD-1 entra en las células con membranas dañadas y aumenta su fluorescencia al unirse a los ácidos nucleicos, produciendo así una fluorescencia roja brillante en las células muertas (ex/em ~495 nm/~635 nm). El EthD-1 es excluido por la membrana plasmática intacta de las células vivas.

El medio de los andamios fue retirado y los andamios fueron lavados con PBS. Diluimos en PBS la solución de EthD-1 2 mM y calceína AM 4 mM en PBS hasta obtener una dilución de 4  $\mu$ M y 2  $\mu$ M, respectivamente y agitamos hasta homogeneizar el reactivo. Teñimos cada andamio con uno 200  $\mu$ L de la solución preparada e incubamos durante unos 30 min. Finalmente, visualizamos mediante microscopía confocal Nikon A1R+ con láser 488 nm. Las imágenes fueron tomadas con el aumento 10X. Las células vivas fueron contabilizadas como citoplasmáticas verdes mientras que las células muertas como núcleos teñidos de rojo.

### 3.11. Estudio del citoesqueleto de los microtubos

Una vez finalizados los experimentos, el medio de los andamios fue retirado. Se realizaron 3 lavados con PBS. Después, permeabilizamos con 0.1% Tritón en PBS durante 30 segundos. Fijamos los andamios durante 15 minutos con paraformaldehído (PFA). Pasado ese tiempo, lavamos con PBS 3 veces de nuevo.

Permeabilizamos con Tritón al 0.5% en PBS durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y aplicamos la solución bloqueo (BS) (1% BSA, 0.1% Tween 20 en PBS) durante 10 minutos. A continuación teñimos los andamios con una concentración 1:1000 de Phalloidin-iFluor 647 Reagent (ab176759, Abcam™, Cambridge, Reino Unido) en



solución bloqueo durante 1 hora en cámara húmeda y oscura con agitación a temperatura ambiente. Retiramos y lavamos con BS durante 2 minutos tres veces. Montamos los andamios sobre portaobjetos y añadimos medio de montaje con Dapi (PROLONG, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Mediante microscopía confocal Nikon A1R+ con los láseres 405 y 638 nm visualizamos los núcleos teñido y la actina del citoesqueleto formado, respectivamente. Las imágenes fueron tomadas con el aumento 10X para la medición del alineamiento celular y longitud de las fibras, mientras que con el aumento 40X se midió el grosor de las fibras, el número de núcleos que poseían las fibras, la morfología de los núcleos y la densidad de actina.

### **3.12. Estudio de funcionalidad celular**

Las células fueron teñidas con el kit Fluo-4 AM (Invitrogen TM, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para medir la funcionalidad y capacidad contráctil de los andamios cultivados. Este ensayo se realizó mediante microscopía confocal. Fueron necesarias dos soluciones buffer, una como control, caracterizada por una solución baja en potasio; y otra con niveles altos de potasio que estimulan la contracción celular. Ambas soluciones estaban compuestas de cloruro cálcico (C1016, sigma Aldrich, San Luis, EEUU) al 2.5 mM, cloruro de magnesio (M8266, sigma Aldrich, San Luis, EEUU) al 2 mM; Hepes (A3724, Panreac Química, España) al 10mM y glucosa (G8270, sigma Aldrich, San Luis, EEUU) al 10 mM. Ambas diferían en el cloruro sódico (S9888, sigma Aldrich, San Luis, EEUU) al 140 mM y al 30 mM, en la solución control y en la solución no control, respectivamente; y en el cloruro potásico (P3911, sigma Aldrich, San Luis, EEUU) 2.5 mM y 110 mM, en la solución control y en la solución no control, respectivamente. Las soluciones fueron neutralizadas a pH 7.4.

Las alícuotas de Fluo-4 fueron diluidas en DMSO a 1-5 mM como solución de stock, para finalmente usarlas en una dilución 1-5  $\mu$ M en medio de cultivo, los andamios fueron incubados con la solución durante 20 min, hasta comenzar el ensayo.

Durante el estudio, se usaron dos jeringas, una con cada solución. Cada jeringa tiene una llave de paso, la de la solución control estuvo siempre abierta durante todo el experimento, mientras que la de la solución no control fue abierta en momentos puntuales

para evaluar la respuesta celular ante el estímulo. Se usó el aumento 10X para este estudio del microscopio confocal Nikon A1R+ con láser 488 nm.

El resultado de estos test fue una gráfica que mide la luminiscencia de la muestra en función del tiempo. El nivel de la luminiscencia varía al entrar calcio en las células debido a la influencia de solución “No control”, el calcio se une al Fluo-4 y provoca picos de luminiscencia. La solución “No control” tiene la capacidad de impedir la salida de potasio, lo que despolariza la célula y fuerza la apertura de canales de calcio.

### **3.12.1. Estimulación eléctrica**

Para conocer la respuesta de las células ante diferentes estímulos, los andamios fueron estimulados eléctricamente con el generador de señal del biorreactor TC3 (EBERS Medical Technology SL, Zaragoza, España). Los andamios fueron estimulados a diferentes frecuencias y visualizados bajo microscopia confocal con la tinción de Fluo-4. Las frecuencias que se cogieron fueron 0.2, 0.5, 1, 1.5 y 2 Hz.

### **3.13. Estudio inmunohistoquímico**

Los andamios fueron fijados en PFA al 4% para su inmediata inclusión en bloques de parafina y se realizaron cortes utilizando el micrótomo de 4µm de grosor para su posterior tinción con hematoxilina (GHS316 500ML: Hematoxylin Solution, Gill No. 3, Sigma Aldrich, Misuri, EEUU) y eosina (HT110116 500ML: Eosin Y Solution, Sigma Aldrich, Misuri, EEUU). Se realizó una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo actina de músculo liso (SMA) (Actin, Smooth Muscle (1A4) Mouse Monoclonal Antibody, Cell Marque) para identificar la proteína que se ha unido específicamente al anticuerpo y ver el grado de diferenciación de las células musculares. Las muestras fueron analizadas con el microscopio óptico Olympus BX-61, con los aumentos "10X" para obtener una imagen global y "20X" para obtener una imagen más específica tanto de la periferia como del centro de los andamios.

## 3.14. Variables de estudio

### 3.14.1. Variables independientes

Las variables independientes de este estudio son:

- Tipo de fabricación de andamio.
- Composición del andamio.
- Tipo de andamio.
- Número de células.
- Densidad celular.
- Tiempo de cultivo.
- Tipo de estimulación.

### 3.14.2. Variables dependientes

Al tratarse de un experimento *in vitro* las variables dependientes serán aquella que nosotros hemos decidido medir para evaluar la creación de tejido tanto a partir de variables mecánicas como variables histológicas:

- Módulo de Young, medida en Megapascales (MPa).
- Módulo de elasticidad, se evaluó en Megapascales (MPa).
- Módulo viscoso, que fue medido en Megapascales (MPa).
- Deformación, medida en % de estiramiento sobre la longitud basal de los andamios:

$$\text{Deformación} = \frac{\text{Elongación}}{\text{Longitud basal}} \times 100$$

- Viabilidad celular, se midió en porcentaje (%) de células vivas sobre las células totales (células vivas y células muertas):

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totales}} \times 100$$

- Morfología celular, basada en 3 variables adimensional:
  - Circularidad, definida como:

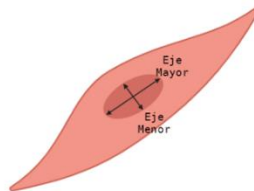
$$\text{Circularidad} = 4\pi \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$$

- Redondez:

$$\text{Redondez} = 4 \frac{\text{Área}}{\pi \text{ Eje Mayor}^2}$$

- Ratio del aspecto (Figura 31):

$$\text{Ratio del aspecto} = \frac{\text{Eje Mayor}}{\text{Eje Menor}}$$



*Figura 31: Explicación ratio del aspecto.*

- Ancho de las fibras, medido en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).
- Morfología nuclear, basada en las mismas 3 variables adimensionales definidas en las líneas anteriores:
  - Circularidad.
  - Redondez
  - Ratio del aspecto.
- Grado de fusión, que fue evaluado en % de núcleos en fibras de actina sobre los núcleos totales, tanto en fibras como aislados en el andamio:

$$\text{Grado de fusión} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de núcleos en fibras de actina}}{\text{N}^{\circ} \text{ de núcleos totales}} \times 100$$

- Densidad de actina en fibras, medida en % de área de actina fluorescente sobre el área total de miotubos en el andamio:

$$\text{Densidad de actina} = \frac{\text{Área actina fluorescente}}{\text{Área total miotubos}} \times 100$$

- Grado de alineación de las fibras, calculada en % de fibras con una orientación entre  $-10^\circ$  y  $10^\circ$  sobre el número total de fibras en el andamio:

$$\text{Grado de alineación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de fibras con orientación entre } -10^\circ \text{ y } 10^\circ}{\text{N}^\circ \text{ Total de fibras}} \times 100$$

- Luminiscencia, medida adimensional ya que se ha normalizado sobre el valor mayor de luminiscencia detectado, siendo las de mayor importancia las que se detectaron:
  - Tras el primer estímulo.
  - Tras el segundo estímulo.
- Molaridad de calcio evaluada en nanomolar (nM):
  - Tras el primer estímulo.
  - Tras el segundo estímulo.
- Incremento de molaridad: Diferencia de molaridad de Calcio entre el pico del estímulo y molaridad media de la célula en reposo medida en nM.
- Incremento de luminiscencia: Diferencia de luminiscencia entre el pico del estímulo y luminiscencia media de la célula en reposo. Se trata de una variable adimensional por lo que no tiene unidades.
- Diferencia de molaridad entre picos de cada estímulo, calculada en nM.
- Diferencia de luminiscencia entre picos de cada estímulo, siendo una variable adimensional.

### 3.15. Estudio estadístico

Para las variables cuantitativas, dependiendo si seguían o no una distribución simétrica), se resumieron mediante media y desviación estándar ( $M \pm DS$ ) o mediante y rango intercuartílico (P50 [P25-75]) respectivamente. Se calculó además la normalidad de la muestra por los test Shapiro-Wilk si  $n < 50$  o test de Kolmogorov-Smirnov  $n > 50$ .

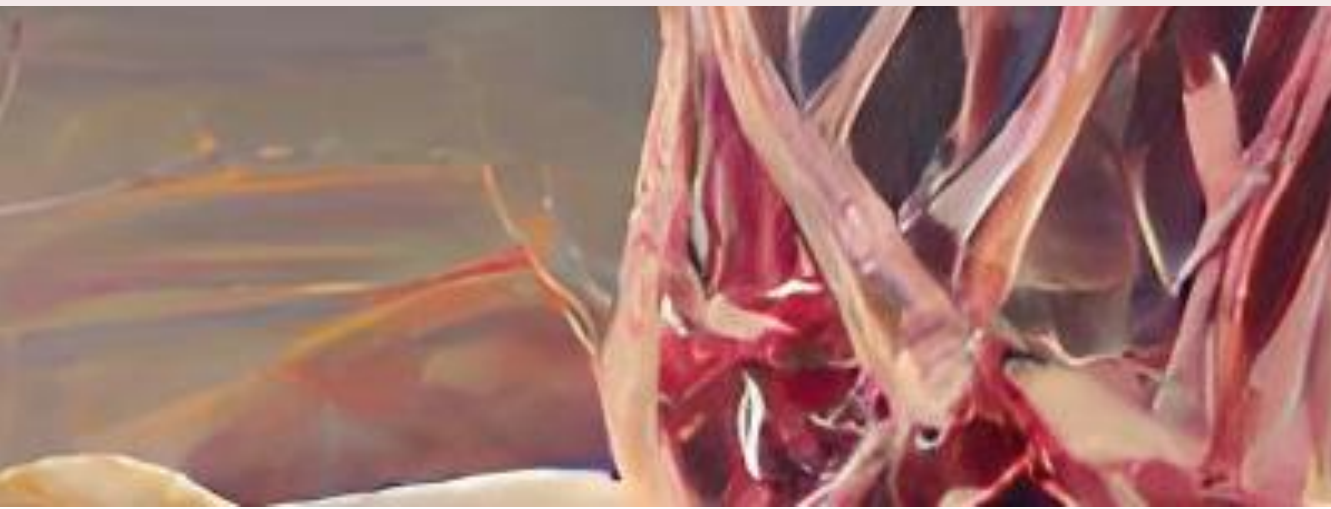
- Para las variables cuantitativas se utilizaron la U de Mann-Whitney cuando las muestras no mostraron una distribución normal. Para las variables cuantitativas que presentaron una distribución normal se usó la prueba T de student.

- Para la comparación de más de dos muestras con una distribución normal se usó la prueba de ANOVA para medidas independientes y el test de Kruskal Wallis cuando no existía una distribución normal. Se empleará el test del análisis de la varianza para las variables cuantitativas cuando la variable independiente ofrezca más de dos valores, empleando el test de Tukey si se hallaron diferencias y las varianzas fueron iguales, en el caso en que las varianzas fueron distintas se usó el test de Tamhane. Para el análisis por pares de las muestras que no tenían una distribución normal se usó la U de Mann-Whitney.
- Se estableció como valor estadísticamente significativo una  $p < 0.05$ ; significativo  $0.01 < p < 0.05$ ; muy significativo  $0.001 < p < 0.01$  y extremadamente significativo  $p < 0.001$ .
- Se utilizó el paquete IBM® SPSS® Statistics 19 para el análisis estadístico. Para las gráficas se usó el software GraphPad Prism 9 y OriginPro 2022.





**RESULTADOS**



**CAPÍTULO 4**





## 4.1. Propiedades mecánicas de los hidrogeles

Se realizó un ensayo de tres puntos dividido en dos test, tanto para el andamio de PCL como para los hidrogeles. Se optó por un estudio de deformación para obtener la deformación crítica, indispensable para el desarrollo del test de barrido de frecuencias, que sería el estudio de principal interés. Finalmente se incluyó un test de tracción para obtener el Módulo de Young.

### 4.1.1. Resultados reológicos: Andamio de PCL

Se estableció la relación **tensión-deformación** del andamio de PCL (n=3) a través de su Módulo de Young, resultando en 26.1MPa. Tras aplicar el primer estudio de deformación se obtuvo el valor de deformación crítica del andamio (Figura 32 a), siendo la deformación del 0.1%.

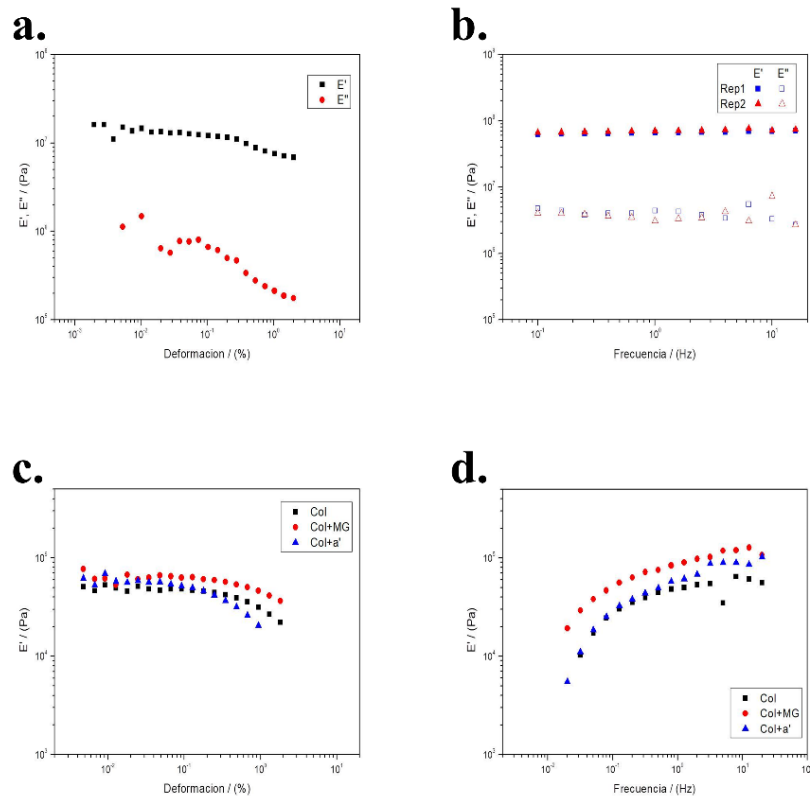


Figura 32: Propiedades reológicas. a. Estudio de deformación de andamios de PCL. b. Estudio de frecuencias de andamios de PCL. c. Barrido de deformación de hidrogeles. d. Test de frecuencias de hidrogeles.

Como se observa en la figura 32 a, a partir del valor  $10^{-1}$  % de deformación, el material alcanza el punto de no retorno respecto a su posición basal, produciéndose su rotura y mayor deformación. También se comprobó que el módulo elástico  $E'$  es mayor que el módulo viscoso  $E''$ , caracterizando así el comportamiento elástico del andamio de PCL.

A continuación se completó el test de frecuencias con la **deformación crítica** obtenida anteriormente, para considerar si el dispositivo de PCL era apto para su cultivo en biorreactores, que trabajan a una frecuencia de 5Hz ( $n=3$ ). Como resultado, se obtiene una gráfica (Figura 32 b) con el módulo elástico y viscoso como parámetros que varían según la frecuencia. Concretamente en esta figura se presentan dos andamios de PCL, el utilizado en este trabajo (Rep1) y otro más estrecho (Rep2) con un tamaño establecido de  $2 \times 0.5$ cm, verificando que el utilizado presenta aparentemente una mayor elasticidad y consecuentemente una mayor capacidad de deformación.

### 4.1.2. Resultados reológicos: Hidrogeles

Por otro lado, realizando el mismo barrido de deformación a los hidrogeles se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 32 c ( $n=3$ ). Tras ello se determinó su barrido de frecuencia, en todos se obtuvo un valor de deformación crítica menor de 0.1%.

En condiciones iniciales, el hidrogel de colágeno y matrigel es el que presenta un mayor módulo elástico, seguido del hidrogel MEC (col + a' en la figura 32). El hidrogel de colágeno tiene un módulo elástico menor. A medida que aumentan los esfuerzos y la deformación, los módulos elásticos de cada hidrogel disminuyen. De forma más notable en el hidrogel MEC es el que obtuvo un mayor descenso de módulo elástico, seguido del hidrogel colágeno y colágeno y matrigel, respectivamente. Tras aplicar el barrido de frecuencias a las biotintas, se analizó su comportamiento ante la variación de frecuencia.

Observando la gráfica (figura 32 d), se vuelve a corroborar una vez más que el hidrogel constituido por colágeno y matrigel contiene las mejores propiedades reológicas en comparación al resto de hidrogeles, y que todos los hidrogeles mantienen cierta continuidad a lo largo de la variación de frecuencias ( $n=3$ ). Esto se explica por la continuidad que mantiene el módulo elástico  $E'$  al aumentar el porcentaje de deformación del andamio, siendo el hidrogel colágeno y matrigel el que mayor módulo elástico presenta ante las deformaciones, y también ante las variaciones de frecuencia. En cambio,

observamos que los hidrogeles colágeno y MEC presentan resultados muy similares, por debajo del hidrogel colágeno y matrigel tanto en el inicio con frecuencias bajas como al final con frecuencias altas.

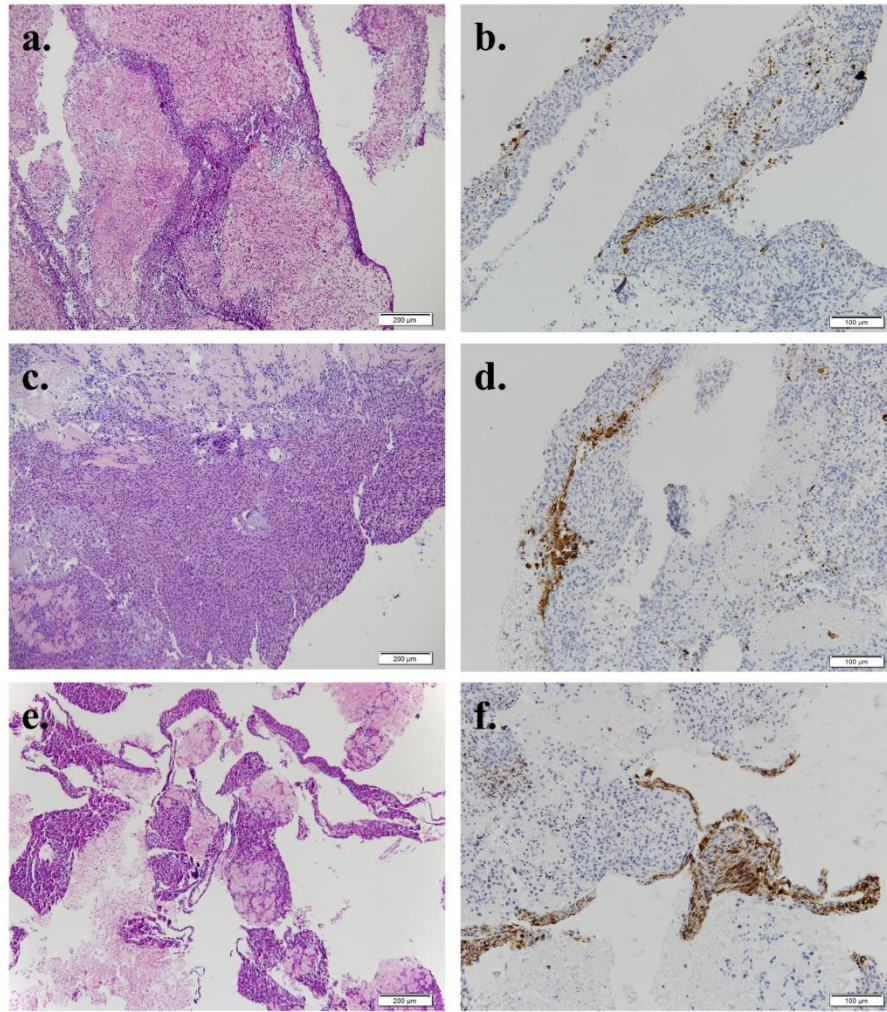
## 4.2. Testeo inicial de viabilidad celular y diferenciación

### 4.2.1. Viabilidad

Para el testeo de las biotintas colágeno, colágeno y Matrigel y MEC se usaron mioblastos de la línea celular L6, resuspendidos en una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL y para cada andamio se usó 500  $\mu$ L de biotinta ( $n=7$ ) (figura 33 a, c y e). Mientras que para los ensayos de la biotinta CA1 se usaron 3 densidades celulares diferentes  $20 \times 10^6$  células/mL;  $40 \times 10^6$  células/mL;  $80 \times 10^6$  células/mL y para cada andamio se emplearon 500  $\mu$ L de biotinta ( $n=3$ ) (figura 34 a, c y e). Se usó el andamio 1 para la impresión de estas biotintas.

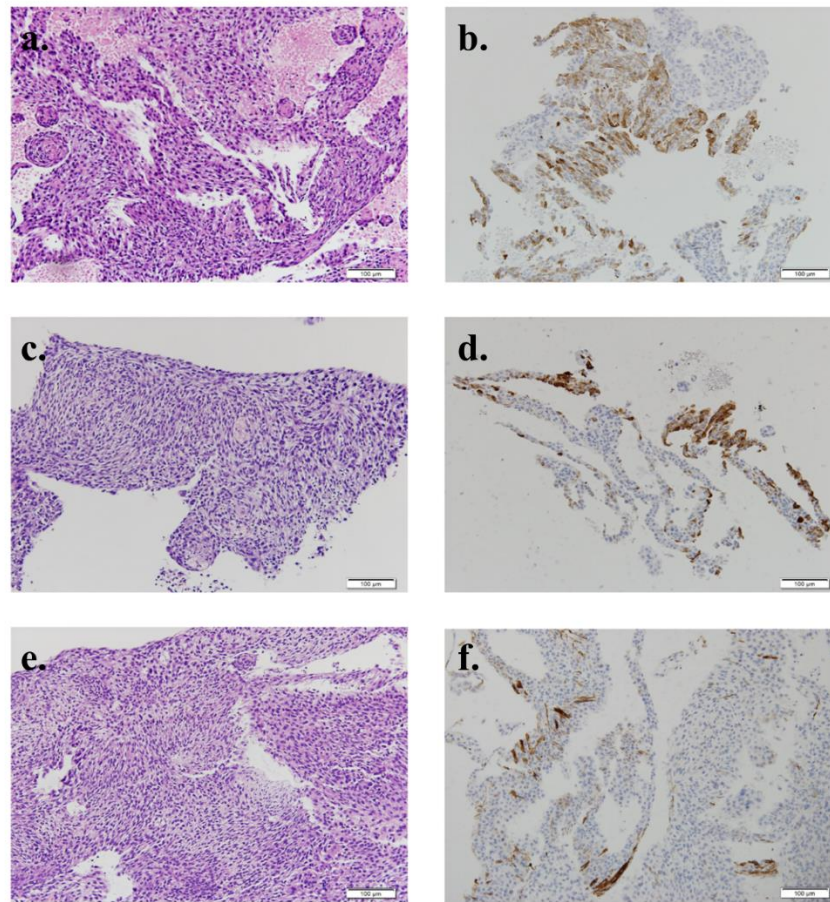
Primero se testaron todas las biotintas con la misma densidad celular, para conocer cuál es la idónea para usar en bioimpresión (figura 35 a). La biotinta colágeno mostró una viabilidad celular de  $20.29 \pm 5.21$  % (figura 33 a) y la de la biotinta colágeno y matrigel fue de  $25.68 \pm 12.05$  % (figura 33 c). La biotinta MEC mostró una viabilidad de  $34.62 \pm 31.90$  % (figura 33 e) y CA1  $82.33 \pm 13.14$  % (figura 34 a). Se evidenció diferencia estadística entre las biotintas ( $P=0.001$ ). Concretamente, la inferencia estadística la presentó la biotinta CA1 frente a la biotinta de colágeno ( $P=0.001$ ), de colágeno y matrigel ( $P=0.002$ ) y MEC ( $P=0.009$ ). Entre las otras no se evidenció diferencia significativa ( $P>0.05$ ).

Los andamios producidos con la biotinta CA1 y una densidad de  $20 \times 10^6$  células/mL mostraron una viabilidad del  $82.33 \pm 13.14$  % (figura 34 a). En estos andamios, la viabilidad celular era predominante en las esferas formadas por las células y en el interior de los filamentos. Los andamios con una densidad de  $40 \times 10^6$  células/mL (Figura 34 c) tuvieron una viabilidad de  $74,74 \pm 13,20$  %, mientras que los andamios con la densidad de  $80 \times 10^6$  células/mL (Figura 34 e) presentaron una viabilidad del  $93,23 \pm 6,64$  %. En estos andamios, la viabilidad celular era predominante en las estructuras grandes. La viabilidad celular (figura 35 b) de las 3 densidades celulares fue estadísticamente idéntica ( $P=0,442$ ).

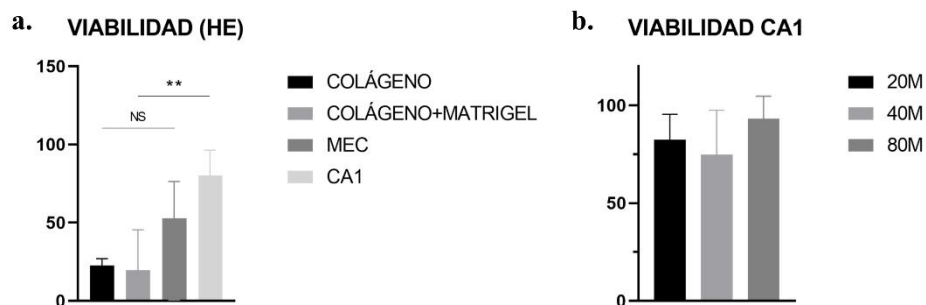


**Figura 33: Hematoxilina-Eosina e Inmunohistoquímicas de hidrogeles. a. Hematoxilina-Eosina de hidrogel de colágeno. b. Inmunohistoquímica de hidrogel de colágeno. c. Hematoxilina-Eosina de hidrogel de colágeno y matrigel. d. Inmunohistoquímica de hidrogel de colágeno y matrigel. e. Hematoxilina-Eosina de hidrogel MEC. f. Inmunohistoquímica de hidrogel MEC.**





**Figura 34: Hematoxilina-Eosina e Inmunohistoquímicas de hidrogel CA1. a. Hematoxilina-Eosina de hidrogel CA1 con densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL. b. Inmunohistoquímica de hidrogel CA1 con densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL. c. Hematoxilina-Eosina de hidrogel CA1 con densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL. d. Inmunohistoquímica de hidrogel CA1 con densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL. e. Hematoxilina-Eosina de hidrogel CA1 con densidad celular de  $80 \times 10^6$  células/mL. f. Inmunohistoquímica de hidrogel CA1 con densidad celular de  $80 \times 10^6$  células/mL.**



**Figura 35: Viabilidad celular. a. Hidrogeles con densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL. b. Hidrogel CA1 con diferentes densidades celulares.**

### 4.2.2. Inmunohistoquímica

Para el análisis de las muestras, también se tiñó la SMA con un anticuerpo específico. Esta técnica permite identificar los componentes proteicos que se unen a la actina y, por tanto, permite detectar las células musculares y su grado de diferenciación.

Los andamios que presentaron una viabilidad celular menor al 10% no se le realizó el estudio inmunohistoquímico. Los andamios de colágeno (n=4) (figura 33 b) mostraron un marcaje leve, de un 5% de las células viables en el 50% de los casos y el resto no mostró marcaje de SMA. El 50% de los andamios de colágeno y matrigel (n=4) (figura 33 d) no superaron el 10% de las células viables marcadas con SMA, siendo nulo el marcaje en el resto de los andamios. El 50% de los andamios fabricados con la biotinta denominada MEC (n=4) (figura 33 f) presentaron un marcado leve de entorno al 10% del andamio. Este marcaje fue mayoritario en las zonas filamentosas y bordes del andamio. En el resto de los andamios el marcaje fue nulo.

La SMA se marcó en el  $15,08 \pm 6,28\%$  de la población celular para los andamios con la biotinta CA1 que se produjeron con células a una densidad de  $20 \times 10^6$  células/mL (n=3). El marcaje era predominante en las zonas periféricas y en los filamentos delgados (figura 34 b). Observamos que apenas un 10% de las células estaban marcadas con el anticuerpo SMA en los andamios producidos con células a una densidad de  $40 \times 10^6$  células/mL (n=3) (figura 34 d). El marcaje no se observó en el 33,33% de los andamios teñidos, y la mayor parte de la tinción se observó en los bordes del andamio. La expresión de actina se observó en el  $7,08 \pm 6,49\%$  de la población celular para los andamios que se produjeron con células a una densidad de  $80 \times 10^6$  células/mL (n=3) (figura 34 f). En todos los casos, la mayor parte de la expresión de actina se observó en los bordes de los andamios o en los pequeños filamentos de los andamios. Los resultados demostraron que la expresión de actina en los andamios producidos a partir de células cultivadas a 3 densidades diferentes era estadísticamente idéntica ( $P = 0,269$ ).

### 4.3. Viabilidad celular

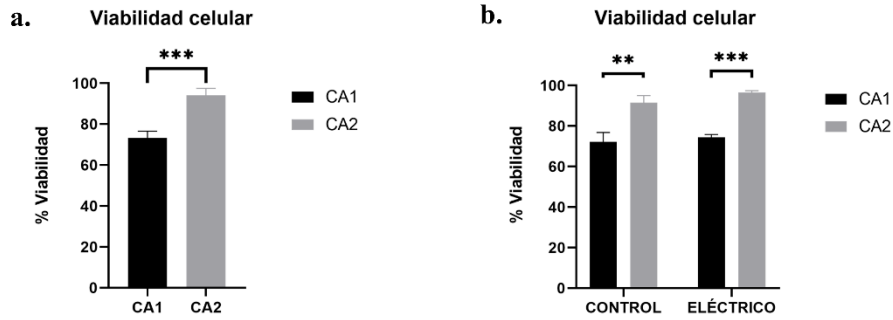
#### 4.3.1. Andamios bioimpresos

##### 4.3.1.1. CA1 vs CA2.

Primeramente se analizaron 2 tipos de biotintas diferentes, CA1 y CA2, y con una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL y  $40 \times 10^6$  células/mL, respectivamente, o lo que sería lo mismo una densidad de  $10 \times 10^6$  células/andamio, para estudiar la viabilidad y morfología de la bioimpresión de ambas tintas ( $n=6$ ) que fueron impresas sobre el diseño del andamio 1. La viabilidad de CA1 fue de  $73.26 \pm 3.33$  % mientras que la de CA2 es de  $94.08 \pm 3.50$  % (figura 36 a). Se evidenció diferencia significativa entre la viabilidad de ambas biotintas ( $P=0.000$ ). En el estudio de la morfología se analizaron la circularidad, la redondez, cuanto más similar a 1, la célula estará más redondeada y tiene una tendencia estar menos madurada, mientras que la ratio del aspecto de la célula debe de ser mayor que 1 para indicar la mayor maduración de la célula. La tabla 2 muestra la descripción de estas variables, en el grupo CA1 la circularidad fue de 0.81 [0.72, 0.87], mientras que en la biotinta CA2 fue de 0.83 [0.74, 0.89], se encontró diferencia significativa entre ambas biotintas ( $P=0.000$ ), la redondez en la biotinta CA1 fue de 0.76 [0.66, 0.86] y la de CA2 fue de 0.78 [0.67, 0.87], hallándose diferencia entre los dos grupos ( $P=0.000$ ). Finalmente, el ratio del aspecto de las células fue de 1.31 [1.17, 1.52] y 1.29 [1.15, 1.48], en los grupos CA1 y CA2, respectivamente. La diferencia significativa entre ambas biotintas fue de  $P=0.000$ .

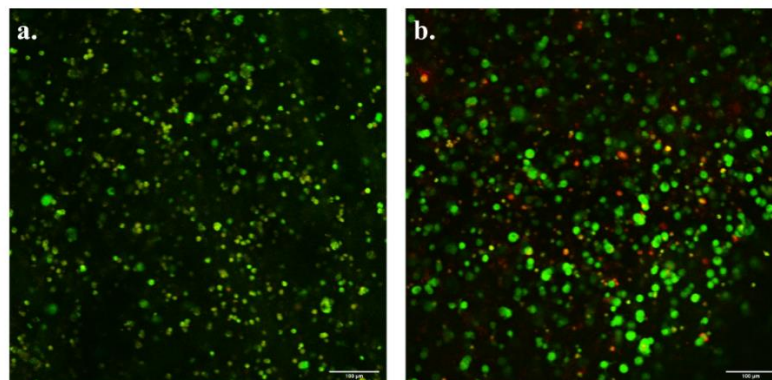
	CA1	CA2	P
<b>VIABILIDAD</b>	$73.26 \pm 3.33$ %	$94.08 \pm 3.50$ %	$P=0.000$
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.81 [0.72, 0.87]	0.83 [0.74, 0.89]	$P=0.000$
<b>REDONDEZ</b>	0.76 [0.66, 0.85]	0.78 [0.67, 0.87]	$P=0.000$
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.31 [1.17, 1.52]	1.29 [1.15, 1.48]	$P=0.000$

*Tabla 2: Viabilidad celular y morfología celular de CA1 y CA2.*



**Figura 36: Viabilidad celular. a. CA1 frente a CA2. b. CA1 frente a CA2 tanto control como estimulada eléctricamente.**

Los andamios fabricados con ambas tintas fueron estimulados eléctricamente. La media del grupo sin estimulación de CA1 (n=3) (figura 37 a) fue de  $72.18 \pm 4.68 \%$ , mientras que la media del grupo electroestimulado (n=3) con la misma biotinta fue de  $74.33 \pm 2.36 \%$  (figura 37 b), en el estudio de inferencia estadística no se pudo demostrar que la estimulación eléctrica promoviera un aumento de la viabilidad celular de la biotinta ( $P=0.49$ ) (figura 36 b). La circularidad, redondez y ratio del aspecto de la biotinta CA1 sin estimular fueron 0.81 [0.73, 0.88], 0.76 [0.66, 0.85] y 1.31 [1.17, 1.51], respectivamente y en el grupo electroestimulado fueron 0.81 [0.72, 0.87], 0.76 [0.65, 0.86] y 1.31 [1.16, 1.53]. Se evidenció diferencia significativa en la variable circularidad ( $P=0.000$ ) pero no en las variables redondez ( $P=0.708$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.710$ ). El estudio descriptivo y el estudio estadístico de la biotinta CA2 (n=3) se describe en el apartado 4.3.1.2.1 dentro de la densidad celular  $40 \times 10^6$  células/mL.



**Figura 37: Test viabilidad celular de CA1 con una densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL. a. Grupo control. b. Grupo electroestimulado.**



Además se estudió si existía diferencia significativa entre los grupos controles de ambas biotintas y la viabilidad de ambos grupos electroestimulados. Se evidenció diferencia entre los grupos controles ( $P=0.004$ ) y los grupos electroestimulados ( $P=0.000$ ). También se demostró diferencia significativa en los grupos controles de ambas biotintas entre las 3 variables morfológicas, circularidad, redondez y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ;  $P=0.002$ ;  $P=0.002$ , respectivamente) y en las variables morfológicas entre los grupos estimulados ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ , respectivamente).

#### 4.3.1.2. Variación de la densidad celular en CA2

Nos centramos en estudiar en profundidad la biotinta CA2, la cual fue impresa sobre el andamio 1. Se compararon 3 densidades celulares diferentes, 2 estimulaciones (mecánica y eléctrica) y 2 líneas celulares, como se ha detallado previamente en el capítulo de materiales y métodos.

##### 4.3.1.2.1. Línea celular L6

La densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/mL ( $n=9$ ) tuvo una viabilidad celular de  $93.11 \pm 4.19$  %, una circularidad de 0.83 [0.74, 0.89], una redondez de 0.78 [0.67, 0.87] y un ratio del aspecto de 1.29 [1.15, 1.48]; la densidad celular de  $80 \times 10^6$  células/mL ( $n=9$ ) mostró una viabilidad de  $84.38 \pm 10.16$  %, la circularidad fue de 0.84 [0.76, 0.90], la redondez fue de 0.78 [0.67, 0.87] y la ratio del aspecto fue de 1.28 [1.15, 1.78]; y de  $84.65 \pm 12.28$  % fue la viabilidad de la densidad de  $160 \times 10^6$  células/mL ( $n=9$ ), la circularidad de 0.76 [0.64, 0.86], la redondez fue de 0.72 [0.60, 0.83] y la ratio del aspecto fue de 1.39 [1.21, 1.66] (tabla 3). No se demostró diferencia significativa entre la viabilidad de las 3 densidades ( $P=0.117$ ) (figura 38), por lo que la viabilidad de las 3 densidades es estadísticamente igual, sin embargo, se demostró inferencia estadística en las 3 variables morfológicas, circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ). El estudio por pares demostró que las densidades  $40 \times 10^6$  células/mL y  $160 \times 10^6$  células/mL;  $80 \times 10^6$  células/mL y  $160 \times 10^6$  células/mL, presentaron diferencias significativas en las 3 variables expuestas; redondez ( $P=0.000$ ), circularidad ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ), mientras que  $40 \times 10^6$  células/mL y  $80 \times 10^6$  células/mL presentaron solamente diferencia significativa en la circularidad ( $P=0.000$ ). No se pudo demostrar que existiera inferencia estadística entre la redondez ( $P=0.124$ ) y la ratio del aspecto ( $P=0.123$ ).

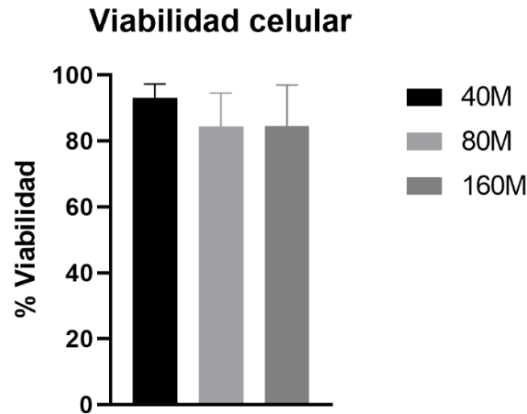


Figura 38: Viabilidad celular por densidad celular de L6 en biotinta CA2.

	40 x 10 <sup>6</sup> células/mL	80 x 10 <sup>6</sup> células/mL	160 x 10 <sup>6</sup> células/mL	P
<b>VIABILIDAD</b>	93.11 ± 4.19 %	84.38 ± 10.16 %	84.65 ± 12.28 %	P=0.117
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.83 [0.74, 0.89]	0.84 [0.76, 0.90]	0.76 [0.64, 0.86]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.78 [0.67, 0.87]	0.78 [0.67, 0.87]	0.72 [0.60, 0.83]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.29 [1.15, 1.48]	1.28 [1.15, 1.78]	1.39 [1.21, 1.66]	P=0.000

Tabla 3: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en diferentes densidades celulares en la biotinta CA2.

Se analizó el efecto que tuvo la estimulación tanto mecánica como eléctrica entre los andamios con esta biotinta (figura 39) (n=9). Los andamios controles tuvieron una viabilidad del  $93.09 \pm 2.44$  %, la circularidad de las células de estos andamios fue de 0.83 [0.73, 0.89], la redondez de 0.77 [0.66, 0.86] y la ratio del aspecto fue 1.30 [1.12, 1.51]. Los andamios electroestimulados presentaron una viabilidad del  $84.96 \pm 12.66$  %, una circularidad de 0.78 [0.67, 0.86], la redondez fue de 0.74 [0.62, 0.85] y la ratio del aspecto de 1.35 [1.18, 1.60]. Mientras que los estimulados mecánicamente tenían una viabilidad del  $84.23 \pm 10.94$  %, la circularidad de estos andamios fue de 0.82 [0.71, 0.88], presentaron una redondez de 0.77 [0.65, 0.87] y una ratio del aspecto de 1.30 [1.16, 1.53]. La tabla 4 resume la viabilidad y la morfología de cada uno de los tipos de estimulación. No se demostró que existiera diferencia significativa en la viabilidad entre las estimulaciones y el grupo control (P=0.060), pero sí se vio inferencia estadística en la circularidad (P=0.000), redondez (P=0.000) y ratio del aspecto (P=0.000). Por pares se observó que todos los pares tenían diferencia significativa en las 3 variables morfológicas,

excepto entre el grupo control y el grupo estimulado mecánicamente, que la redondez (P=0.624) y la ratio del aspecto (P=0.628) fueron estadísticamente iguales.

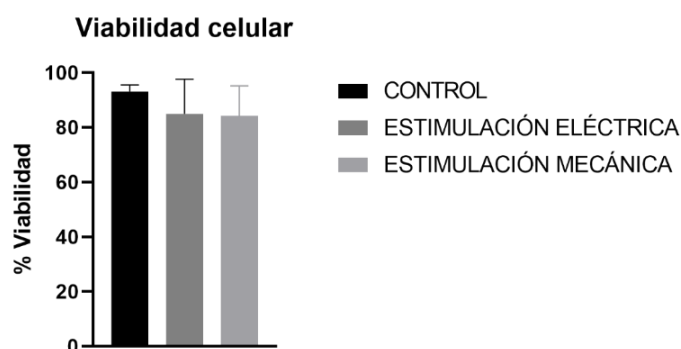


Figura 39: Viabilidad celular por estimulación de L6 en biotinta CA2.

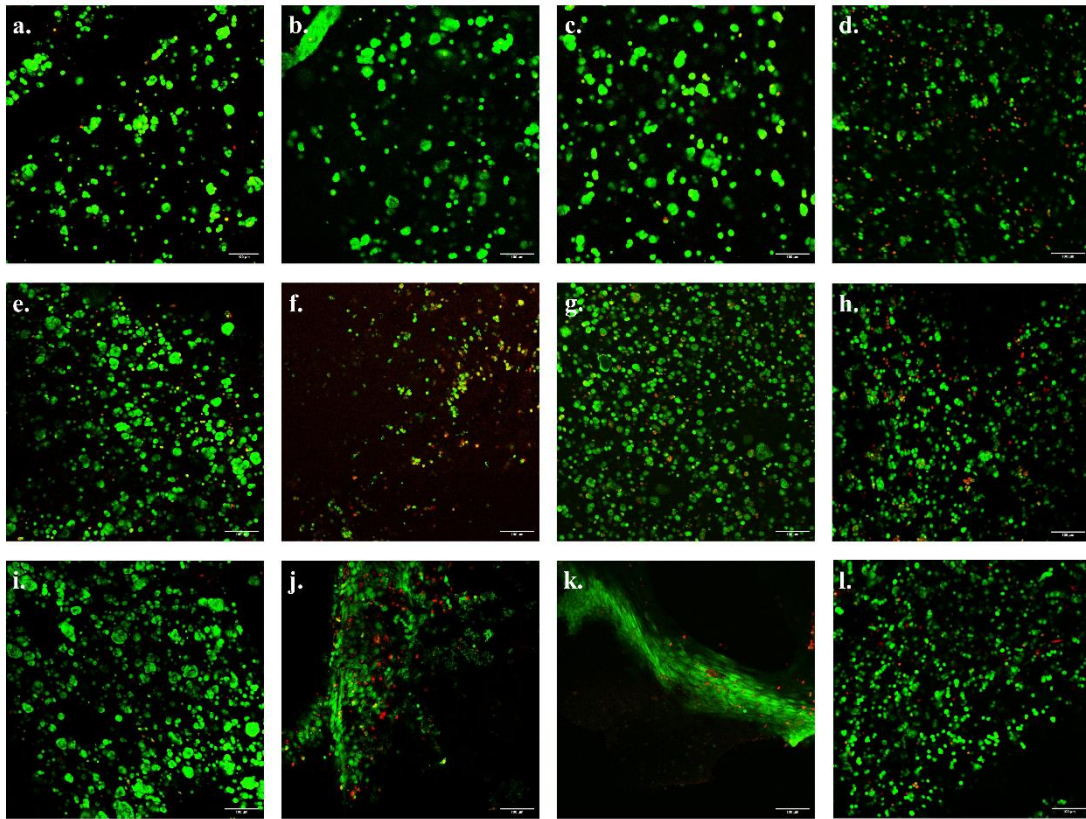
	CONTROL	ELÉCTRICA	MECÁNICA	P
<b>VIABILIDAD</b>	93.09 ± 2.44 %	84.23 ± 10.94 %	84.96 ± 12.66 %	P=0.060
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.83 [0.73, 0.89]	0.78 [0.67, 0.86]	0.82 [0.71, 0.88]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.77 [0.66, 0.86]	0.74 [0.62, 0.85]	0.77 [0.65, 0.87]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.30 [1.12, 1.51]	1.35 [1.18, 1.60]	1.30 [1.16, 1.53]	P=0.000

Tabla 4: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.

Por cada densidad celular se estudió el efecto que causaba la estimulación mecánica y eléctrica (n=3). En la densidad de  $40 \times 10^6$  células/mL, se demostró una viabilidad celular de  $91.63 \pm 3.43$  % en el grupo control (figura 40 a); en el grupo electroestimulado la viabilidad fue del  $96.73 \pm 0.90$  % (figura 40 b) y de  $91.17 \pm 5.59$  % en el grupo estimulado mecánicamente (figura 40 c). No se pudo demostrar evidencia significativa entre los 3 grupos en la densidad menor estudiada (P=0.241) (figura 41). Las variables de morfología circularidad, redondez y ratio del aspecto fueron 0.84 [0.76, 0.90], 0.77 [0.67, 0.87], 1.29 [1.15, 1.48] respectivamente en el grupo control; en el grupo electroestimulado fueron de 0.81 [0.70, 0.88], 0.77 [0.67, 0.87], 1.29 [1.14, 1.50]; y en el grupo estimulado mecánicamente de 0.83 [0.75, 0.88], 0.79 [0.68, 0.88] y 1.27 [1.15, 1.47] (tabla 5). Se encontró diferencia significativa en la circularidad (P=0.000), redondez (P=0.004) y ratio del aspecto (P=0.004). En el estudio por pares, la circularidad fue diferente en cada uno de los pares estudiados (P=0.000), mientras que la ratio del aspecto y la redondez fue estadísticamente igual entre los grupos controles y electroestimulados

## RESULTADOS

( $P=0.579$ ,  $P=0.580$ , respectivamente). Se demostró diferencia significativa en la ratio del aspecto y redondez entre los grupos controles y estimulados mecánicamente ( $P=0.004$ ,  $P=0.004$ , respectivamente) y entre los grupos estimulados ( $P=0.004$ ,  $P=0.004$ , respectivamente).



*Figura 40: Test de viabilidad celular. a. Densidad celular  $40 \times 10^6$  células/mL sin estimulación. b. Densidad celular  $40 \times 10^6$  células/mL electroestimulado. c. Densidad celular  $40 \times 10^6$  células/mL estimulado mecánicamente. d. Densidad celular  $40 \times 10^6$  células/mL tras 24 horas. e. Densidad celular  $80 \times 10^6$  células/mL sin estimulación. f. Densidad celular  $80 \times 10^6$  células/mL electroestimulado. g. Densidad celular  $80 \times 10^6$  células/mL estimulado mecánicamente. h. Densidad celular  $80 \times 10^6$  células/mL tras 24 horas. i. Densidad celular  $160 \times 10^6$  células/mL sin estimulación. j. Densidad celular  $160 \times 10^6$  células/mL electroestimulado. k. Densidad celular  $160 \times 10^6$  células/mL estimulado mecánicamente. l. Densidad celular  $160 \times 10^6$  células/mL tras 24 horas.*

	CONTROL	ELÉCTRICA	MECÁNICA	P
<b>VIABILIDAD</b>	91.63 ±3.43 %	96.73 ± 0.90 %	91.17 ± 5.59 %	P=0.241
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.84 [0.76, 0.90]	0.81 [0.70, 0.88]	0.83 [0.75, 0.88]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.77 [0.67, 0.87]	0.77 [0.67, 0.87]	0.79 [0.68, 0.88]	P=0.004
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.29 [1.15, 1.48]	1.29 [1.14, 1.50]	1.27 [1.15, 1.47]	P=0.004

*Tabla 5: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en densidad celular 40 x 10<sup>6</sup> células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.*

En el grupo de la densidad de 80 x 10<sup>6</sup> células/mL (n=3), la viabilidad celular fue de 93.33 ± 1.63 %, la circularidad 0.83 [0.74, 0.90], la redondez 0.77 [0.67, 0.87] y la ratio del aspecto 1.29 [1.16, 1.49] en el grupo control (figura 40 e) y en el grupo estimulado (figura 40 f) mecánicamente fue de 81.05 ± 5.34 %, 0.85 [0.78, 0.90], 0.79 [0.69, 0.88] y 1.27, [1.14, 1.46], respectivamente. De los andamios estimulados eléctricamente, solamente se realizó una réplica cuya viabilidad fue de 67.54, por lo que no se pudo comparar estadísticamente con el resto de grupos (tabla 6). Existe diferencia significativa entre la viabilidad del grupo control y del grupo estimulado mecánicamente (P=0.019) (figura 41), circularidad (P=0.000), redondez (P=0.000) y ratio del aspecto (P=0.000). Se demostró diferencia significativa en todas las variables morfológicas entre todos los pares de estimulación (P=0.000) salvo en la redondez y la ratio del aspecto entre los grupos controles y electroestimulados (P=0.115, P=0.115, respectivamente).

	CONTROL	ELÉCTRICA	MECÁNICA	P
<b>VIABILIDAD</b>	93.33 ± 1.63 %	67.54 <sup>1</sup>	81.05 ± 5.34 %	P=0.019
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.83 [0.74, 0.90]	0.82 [0.72, 0.87]	0.85 [0.78, 0.90]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.77 [0.67, 0.87]	0.77 [0.65, 0.85]	0.79 [0.69, 0.88]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.29 [1.16, 1.49]	1.29 [1.17, 1.53]	1.27 [1.14, 1.46]	P=0.000

*Tabla 6: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en densidad celular 80 x 10<sup>6</sup> células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.*

<sup>1</sup> Solamente se realizó una réplica de esta condición.

## RESULTADOS

Finalmente, para la densidad  $160 \times 10^6$  células/mL ( $n=3$ ) y sin estimulación la viabilidad fue de  $94.31 \pm 1.99$  % (figura 40 i), la circularidad de 0.81 [0.71, 0.89], la redondez de 0.76 [0.65, 0.85], y la ratio del aspecto de 1.33 [1.18, 1.54]; en la viabilidad del grupo electroestimulado fue de  $79.19 \pm 8.80$  % (figura 40 j), la circularidad de 0.70 [0.60, 0.80], la redondez de 0.66 [0.55, 0.77], y la ratio del aspecto de 1.51 [1.30, 1.81]; y el grupo estimulado mecánicamente presentó una viabilidad de  $80.46 \pm 17.63$  % (figura 40 k), una circularidad de 0.67 [0.55, 0.79], una redondez de 0.67 [0.55, 0.79] y una ratio del aspecto de 1.49 [1.27, 1.83] (tabla 7). No se encontró diferencia significativa en la viabilidad entre los 3 grupos ( $P=0.184$ ) (figura 41), sin embargo, sí se encontró diferencia significativa entre los 3 grupos en las 3 variables morfológicas; circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ). Se evidenció inferencia estadística en todas las variables morfológicas entre todos los pares de estimulación ( $P=0.000$ ) excepto en la redondez y la ratio del aspecto entre los grupos estimulados ( $P=0.115$ ,  $P=0.115$ , respectivamente).

	CONTROL	ELÉCTRICA	MECÁNICA	P
<b>VIABILIDAD</b>	$94.31 \pm 1.99$ %	$79.19 \pm 8.80$ %	$80.46 \pm 17.63$ %	$P=0.117$
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.81 [0.71, 0.89]	0.70 [0.60, 0.80]	0.67 [0.55, 0.79]	$P=0.000$
<b>REDONDEZ</b>	0.76 [0.65, 0.85]	0.66 [0.55, 0.77]	0.67 [0.55, 0.79]	$P=0.000$
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.33 [1.18, 1.54]	1.51 [1.30, 1.81]	1.49 [1.27, 1.83]	$P=0.000$

*Tabla 7: Viabilidad celular y morfología celular de L6 en densidad celular  $160 \times 10^6$  células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.*

Se estudió la inferencia estadística entre las diferentes densidades para cada grupo de estimulación. En cuanto a la viabilidad no se encontraron inferencias estadísticas entre cada uno de los grupos estudiados, grupo control ( $P=0.494$ ), grupo estimulado mecánicamente ( $P=0.462$ ) y electroestimulado ( $P=0.076$ ). Se evidenció diferencia significativa entre las 3 densidades en los grupos sin estimulación en la circularidad ( $P=0.000$ ), en la redondez ( $P=0.000$ ) y en la ratio del aspecto ( $P=0.000$ ), el estudio por pares desveló que existía diferencia significativa en todas las variables morfológica entre todos los pares estudiados ( $P=0.000$ ), salvo entre las densidades  $40 \times 10^6$  células/mL y  $80 \times 10^6$  células/mL, que solamente demostraron tener diferencia significativa en la circularidad ( $P=0.001$ ), pero no en la redondez ( $P=0.716$ ) ni en la ratio del aspecto ( $P=0.719$ ). En el grupo estimulado eléctricamente se demostró diferencia significativa



entre las 3 variables morfológicas ( $P=0.000$ ), concretamente en las 3 variables morfológicas entre las densidades  $40 \times 10^6$  células/mL y  $160 \times 10^6$  células/mL ( $P=0.000$ ); y entre las densidades  $80 \times 10^6$  células/mL y  $160 \times 10^6$  células/mL ( $P=0.000$ ); pero no entre la circularidad ( $P=0.409$ ), la redondez ( $P=0.204$ ) y la ratio del aspecto ( $P=0.203$ ) de  $40 \times 10^6$  células/mL y  $80 \times 10^6$  células/mL. Se demostró inferencia estadística en la circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ) de los andamios estimulados mecánicamente, al igual que en las estimulaciones anteriores, la diferencia significativa se vio entre todos los pares de densidades ( $P=0.000$ ), sin embargo, entre los pares  $40 \times 10^6$  células/mL y  $80 \times 10^6$  células/mL, solamente se vio inferencia estadística en la circularidad ( $P=0.000$ ), pero no en la redondez ( $P=0.142$ ) y la ratio del aspecto ( $P=0.142$ ).

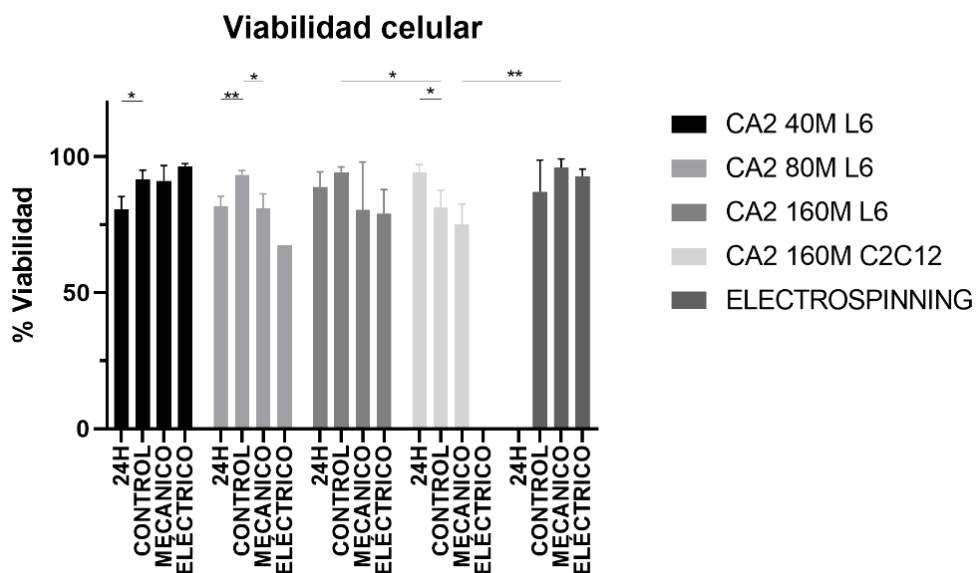


Figura 41: Viabilidad celular de CA2 y electrospinning.

#### 4.3.1.2.1.1. Variación de la viabilidad 24 horas y 2 semanas

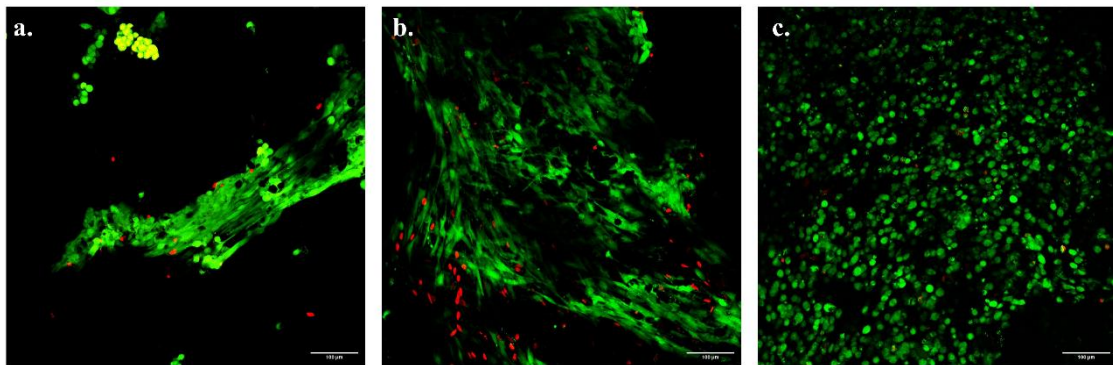
Se estudió si existía diferencia entre la viabilidad a las 24 horas ( $n=9$ ) y a las 2 semanas tras el proceso de bioimpresión. La viabilidad a las 24 horas fue de  $83.49 \pm 5.62$  %, mientras que a las 2 semanas fue de  $93.09 \pm 2.44$  %, evidenciándose diferencia significativa entre la viabilidad a las 24 horas y a las 2 semanas ( $P=0.000$ ) (figura 41).

También realizamos un estudio inferencial de las distintas densidades. A las 24 horas la densidad de  $40 \times 10^6$  células/mL ( $n=3$ ) fue de  $80.64 \pm 4.73$  % (figura 40 d), mientras que a las 2 semanas fue de  $91.63 \pm 3.43$  % (figura 40 a). Se encontró diferencia

significativa entre ambos tiempos de medida ( $P= 0.020$ ). La densidad de  $80 \times 10^6$  células/mL ( $n=3$ ) tuvo una viabilidad de  $81.81 \pm 3.59 \%$  a las 24 horas (figura 40 h) y a las 2 semanas fue del  $93.33 \pm 1.63 \%$  (figura 40 e). Se pudo demostrar que hay diferencia significativa entre la viabilidad a las 24 horas y a las 2 semanas ( $P=0.007$ ). Finalmente la densidad celular de  $160 \times 10^6$  células/mL ( $n=3$ ) presentó una viabilidad inicial del  $88.98 \pm 5.46\%$  (figura 40 l) y una viabilidad a las 2 semanas de  $94.31 \pm 1.99 \%$  (figura 40 i). No se demostró que existiera diferencia estadística en la viabilidad entre estos dos tiempos ( $P=0.188$ ).

### 4.3.1.2.2. Línea celular C2C12

En el caso de la línea celular C2C12 ( $n=3$ ), la viabilidad celular en el grupo control fue de  $81.22 \pm 6.38 \%$  (figura 42 a), y la viabilidad celular del grupo estimulado fue del  $75.20 \pm 7.39 \%$  (figura 42 b). Entre ambos grupos no se demostró diferencia significativa ( $P=0.341$ ) (figura 41). La circularidad, redondez y ratio del aspecto del grupo sin estimulación fueron  $0.59 [0.41, 0.74]$ ,  $0.63 [0.50, 0.75]$  y  $1.59 [1.33, 2.01]$ , respectivamente, mientras que en el grupo estimulado mecánicamente fue de  $0.56 [0.39, 0.69]$ ,  $0.56 [0.41, 0.75]$ ,  $1.78 [1.40, 2.46]$  (tabla 8). Se encontró diferencia significativa en todas las variables morfológicas; circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ).



**Figura 42: Test de viabilidad celular C2C12. a. Grupo control. b. Grupo estimulado mecánicamente. c. Tras 24 horas de cultivo.**



	CONTROL	MECÁNICA	P
<b>VIABILIDAD</b>	81.22 ± 6.38 %	75.20 ± 7.39 %	P=0.341
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.59 [0.41, 0.74]	0.56 [0.39, 0.69]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.63 [0.50, 0.75]	0.56 [0.41, 0.75]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.59 [1.33, 2.01]	1.78 [1.40, 2.46]	P=0.000

*Tabla 8: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en densidad celular  $160 \times 10^6$  células/mL por cada grupo de estimulación en la biotinta CA2.*

#### 4.3.1.2.2.1. Variación de la viabilidad 24 horas y 2 semanas

La viabilidad a las 24 horas de la bioimpresión de la biotinta CA2 con la línea celular C2C12 fue de  $94.37 \pm 2.74$  % (figura 42 c) y a las 2 semanas se produjo una reducción a  $81.22 \pm 6.38$  % siendo evidente que la viabilidad de esta línea celular se ve reducida a las 2 semanas (P=0.031) (figura 41). Además se comparó la viabilidad a las 24 horas entre ambas líneas celulares, no se demostró la existencia de diferencia significativa entre la viabilidad de ambas líneas a las 24 horas (P=0.352).

#### 4.3.1.2.2.2. L6 frente a C2C12

Las dos líneas celulares fueron analizadas, L6 y C2C12, con una densidad celular de  $160 \times 10^6$  células/mL para comparar la viabilidad y morfología de la bioimpresión de ambas líneas celulares (n=6) (figura 43). La viabilidad de L6 fue del  $87.38 \pm 13.54$  % mientras que la de C2C12 es del  $78.18 \pm 7.02$  %. No se evidenció diferencia significativa entre las medias de ambas líneas celulares (P=0.132). La tabla 9 muestra la descripción de las variables a través de las cuales se han medido la morfología celular, circularidad, redondez y ratio el aspecto. En la línea L6 la circularidad fue de 0.76 [0.64, 0.86], mientras que en la biotinta C2C12 fue de 0.57 [0.40, 0.72], se encontró diferencia significativa entre ambas biotintas (P=0.000), la redondez en de las células L6 fue de 0.72 [0.60, 0.83] y la de C2C12 fue de 0.60 [0.47, 0.73], hallándose diferencia entre las dos líneas (P=0.000). Finalmente, el ratio del aspecto de las células fue de 1.39 [1.21, 1.66] y 1.68 [1.36, 2.24], en las células L6 y C2C12, respectivamente. La diferencia significativa entre ambas biotintas fue de P=0.000.

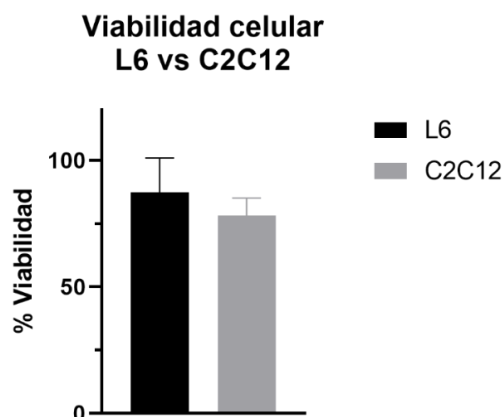


Figura 43: Viabilidad celular de L6 y C2C12.

	L6	C2C12	P
<b>VIABILIDAD</b>	87.38 ± 13.54 %	78.18 ± 7.02 %	0.132
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.76 [0.64, 0.86]	0.57 [0.40, 0.72]	0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.72 [0.60, 0.83]	0.60 [0.47, 0.73]	0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.39 [1.21, 1.66]	1.68 [1.36, 2.24]	0.000

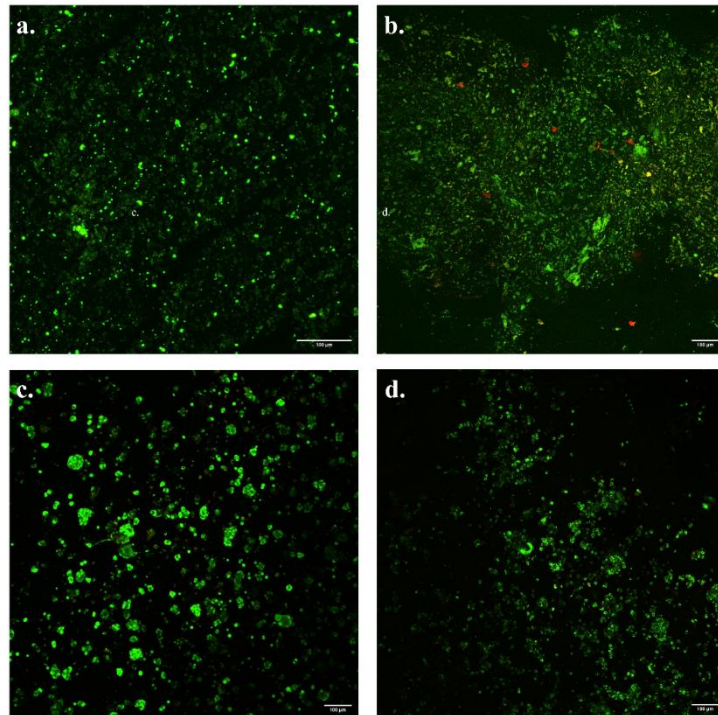
Tabla 9: Viabilidad celular y morfología celular de L6 y C2C12.

Además se estudió si existía diferencia significativa entre los grupos controles de ambas línea celular y la viabilidad de ambos grupos estimulados mecánicamente. Se evidenció diferencia entre los grupos controles ( $P=0.027$ ) y los grupos estimulados ( $P=0.655$ ) (figura 41) y entre los grupos controles de ambas biotintas entre las 3 variables morfológicas, circularidad, redondez y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ , respectivamente), al igual que entre las 3 variables morfológicas de los grupos estimulados ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ , respectivamente).

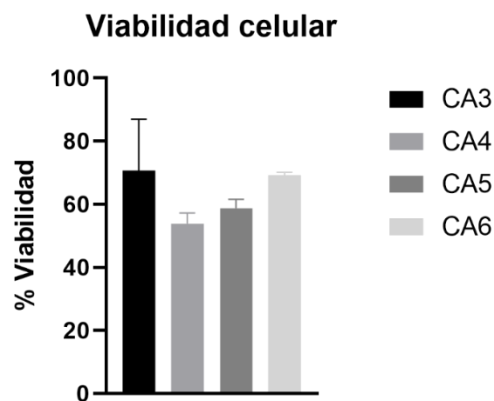
#### 4.3.1.3. Efecto de la variación de concentración de alginato y colágeno en las biotintas y reducción de tiempo de cultivo

Se midió el efecto que produjo la variación de colágeno y alginato ( $n=3$ ) sobre la línea C2C12 durante 1 semana, estas biotintas fueron impresas sobre el andamio 3. La biotinta CA3 (figura 44 a) presentó una viabilidad celular de  $70.62 \pm 16.32$  %, la biotinta CA4 tuvo una viabilidad celular de  $53.85 \pm 3.34$  % (figura 44 b). La viabilidad de la biotinta CA5 fue  $58.69 \pm 2.88$ % (figura 44 c), mientras que la de CA6 fue del  $69.12 \pm 1.04$ %

(figura 44 d). No se evidenció diferencia significativa entre cada una de las biotintas de estudio ( $P=0.218$ ) (figura 45).



*Figura 44: Test de viabilidad celular. a. biotinta CA3. b. Biotinta CA4. c. Biotinta CA5. d. Biotinta CA6.*



*Figura 45: Viabilidad celular entre biotintas con diferente concentración de colágeno y alginato.*

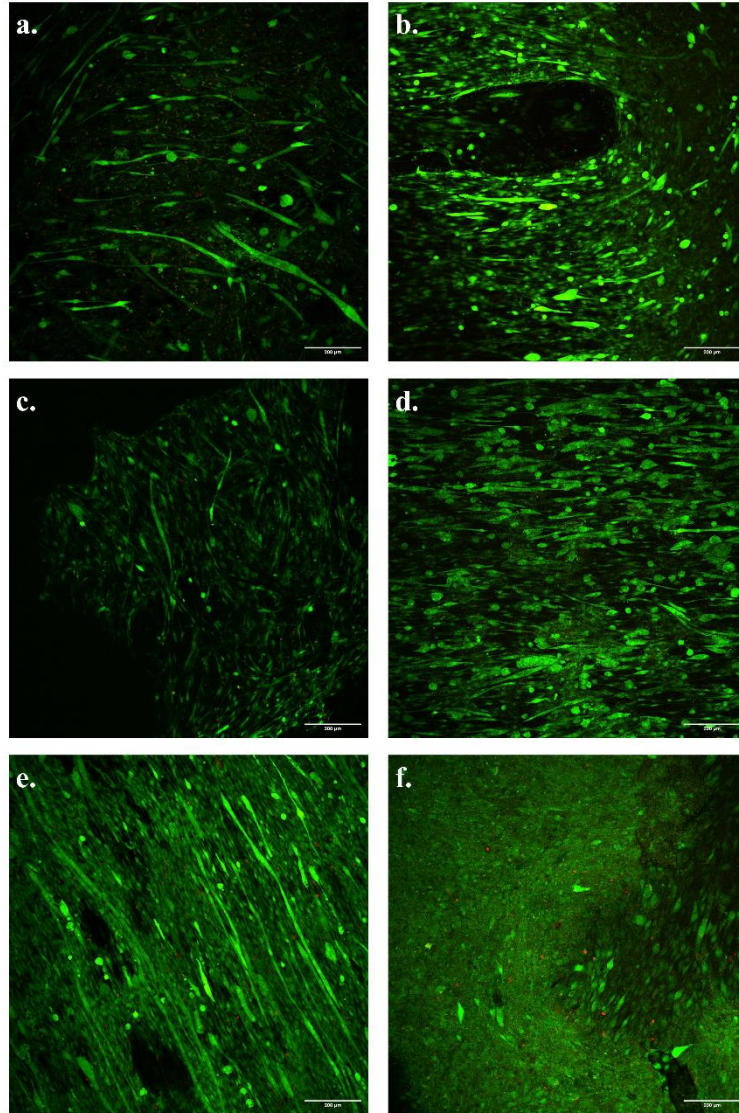
### 4.3.2. Andamios de nanofibras

Los andamios de nanofibras ( $n=3$ ) fueron cultivados con  $10 \times 10^6$  células de la línea C2C12. Los andamios random tuvieron una viabilidad de  $80.14 \pm 9.36$  % (figura 46 a),

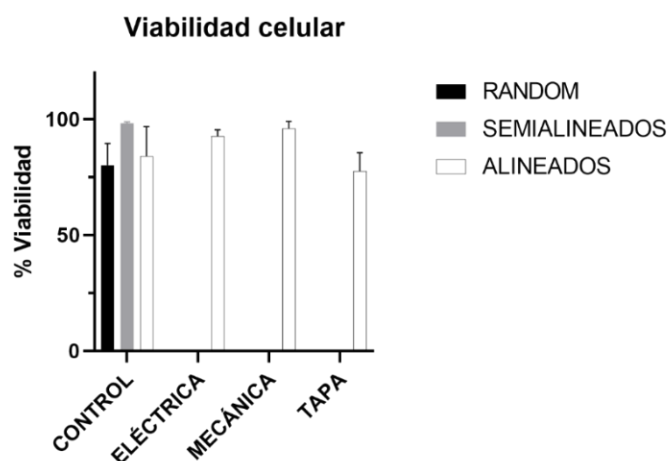
## RESULTADOS

---

los andamios semialineados presentaron una viabilidad de  $98.28 \pm 0.64$  % (figura 46 b), mientras que la de los andamios alineados fue de  $84.12 \pm 12.69$  % (figura 46 c). No se hallaron inferencias significativas entre ninguno de los 3 grupos ( $P= 0.071$ ) (figura 47).



**Figura 46:** Test de viabilidad celular de andamios fabricados mediante electrospinning. *a. Andamios random. b. Andamios semialineados. c. Andamios alineados. d. Andamios alineados estimulados mecánicamente. e. Andamios alineados estimulados eléctricamente en biorreactor. f. Andamios alineados estimulados eléctricamente con tapadera de impresión 3D.*



*Figura 47: Viabilidad celular de andamios fabricados mediante electrospinning.*

Atendiendo ahora a la morfología citoplasmática de los andamios random, se halló que las células tenían una circularidad de 0.31 [0.17, 0.48], la redondez fue de 0.38 [0.23, 0.56] y la ratio del aspecto de 2.61 [1.78, 4.37]. En los andamios semialineados, la circularidad fue de 0.61 [0.43, 0.77] y la redondez fue de 0.54 [0.38, 0.71] y la ratio del aspecto fue de 1.86 [1.42, 2.61]. Los andamios alineados mostraron una circularidad de 0.44 [0.30, 0.61] y una redondez de 0.41 [0.27, 0.58] y una ratio del aspecto de 2.43 [1.73, 3.77] (tabla 10). Se hallaron diferencias significativas entre los 3 grupos para cada una de las variables morfológicas medidas circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ), el estudio por pares desveló que existía inferencia significativa entre cada uno de los pares analizados para las 3 variables morfológicas, circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ).

	RANDOM	SEMIALINEADOS	ALINEADOS	P
<b>VIABILIDAD</b>	80.14 ± 9.36 %	98.28 ± 0.64 %	84.12 ± 12.69 %	P=0.171
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.31 [0.17, 0.48]	0.61 [0.43, 0.77]	0.44 [0.30, 0.61]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.38 [0.23, 0.56]	0.54 [0.38, 0.71]	0.41 [0.27, 0.58]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	2.61 [1.78, 4.37]	1.86 [1.42, 2.61]	2.43 [1.73, 3.77]	P=0.000

*Tabla 10: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados por electrospinning.*

#### 4.3.2.1. Efecto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre la viabilidad

Los andamios alineados además fueron sometidos a estimulación mecánica (n=3) y a estimulación eléctrica (n=3). Los andamios estimulados mecánicamente presentaron una viabilidad del  $96.00 \pm 3.13$  % (figura 46 d), mientras que la de los andamios electroestimulados fue del  $92.76 \pm 2.66$  % (figura 46 e). No se pudo demostrar que la estimulación conllevara un aumento en la viabilidad celular en estos andamios (P=0.256) (figura 47).

Los andamios estimulados mecánicamente presentaron una circularidad de 0.45 [0.29, 0.65] una redondez de 0.42 [0.26, 0.64] y una ratio del aspecto de 2.37 [1.58, 3.84], mientras que la circularidad fue 0.45 [0.28, 0.61] y de 0.40 [0.27, 0.56] fue la redondez y la ratio del aspecto de los andamios electroestimulados fue de 2.52 [1.79, 3.77] (tabla 11). Se demostró que existe diferencia significativa entre cada una de las variables morfológicas medidas; circularidad (P=0.000), redondez (P=0.000) y ratio del aspecto (P=0.000). Se estudió por pares y se comprobó que entre los grupos sin estimulación y estimulados mecánicamente existe diferencia significativa en la circularidad (P=0.015), en la ratio del aspecto (P=0.005) y en la redondez (P=0.005); entre los andamios estimulados mecánicamente y electroestimulados se halló inferencia estadística en las variables circularidad (P=0.001), ratio del aspecto (P=0.000) y redondez (P=0.000). Sin embargo, entre los grupos no estimulados y electroestimulados no se encontró diferencia significativa en la circularidad (P=0.993), ratio del aspecto (P=0.130) y redondez (P=0.130).

	CONTROL	ELÉCTRICA	MECÁNICA	PLACA	P
<b>VIABILIDAD</b>	84.12 ± 12.69%	92.76 ± 2.66%	96.00 ± 3.13%	77.69 ± 7.82%	P=0.256
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.44 [0.30, 0.61]	0.45 [0.28, 0.61]	0.45 [0.29, 0.65]	0.51 [0.38, 0.66]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.41 [0.27, 0.58]	0.40 [0.27, 0.56]	0.42 [0.26, 0.64]	0.57 [0.42, 0.70]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	2.43 [1.73, 3.77]	2.52 [1.79, 3.77]	2.37 [1.58, 3.84]	1.77 [1.43, 2.38]	P=0.000

Tabla 11: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios alineados estimulados.



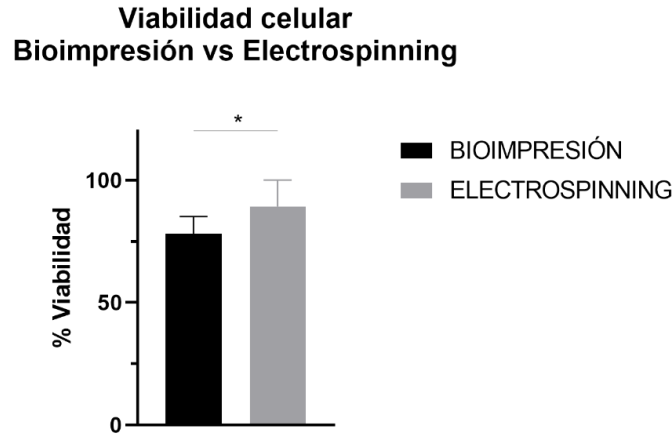
#### 4.3.2.2. Estimulación eléctrica mediante placa vs biorreactor

Para testar el efecto que genera la estimulación eléctrica (n=3) mediante las placas fabricadas con impresión 3D de polímero conductor, lo comparamos frente a los grupos controles y a los grupos de estimulación eléctrica. Los andamios a testar fueron los andamios alineados fabricados mediante electrospinning. Estos andamios estimulados mediante esta placa tuvieron una viabilidad del  $77.69 \pm 7.82$  % (figura 46 f), la circularidad fue de 0.51 [0.38, 0.66] y la redondez de 0.57 [0.42, 0.70] y la ratio del aspecto fue de 1.77 [1.43, 2.38] (tabla 11). Se hallaron diferencias significativas en la ratio del aspecto (P=0.000), circularidad (P=0.000) y redondez (P=0.000) con los andamios controles y con los andamios electroestimulados en la ratio del aspecto (P=0.000), circularidad (P=0.000) y redondez (P=0.000), pero no se encontró diferencia significativa en la viabilidad entre esta nueva estimulación y la de los andamios controles (P=0.971) y los electroestimulados con el biorreactor (P=0.339).

#### 4.3.3. Bioimpresión vs Electrospinning

Se comparó la viabilidad celular y la morfología de las células usadas en ambas técnicas (n=6). Para poder comparar ambas técnicas escogimos los andamios sembrados con la línea celular C2C12.

Los andamios bioimpresos tuvieron una viabilidad media del  $78.18 \pm 7.02$ %, mientras que la de los andamios fabricados mediante electrospinning fue de  $89.88 \pm 9.86$ % (figura 48). Se evidenció diferencia significativa en la viabilidad celular entre ambas técnicas (P=0.013). Centrándonos en la morfología de las células en estos andamios, los andamios bioimpresos presentaron una circularidad de 0.57 [0.40, 0.72], una redondez de 0.60 [0.45, 0.73] y una ratio del aspecto de 1.68 [1.36, 2.24] mientras que los andamios de electrospinning mostraron que la circularidad fue de 0.46 [0.29, 0.65], de 0.44 [0.29, 0.63] fue la redondez y la ratio del aspecto de 2.25 [1.59, 3.48]. Se evidenciaron diferencia significativa en las 3 variables morfológicas; circularidad (P=0.000), redondez (P=0.000) y ratio del aspecto (P=0.000) (tabla 12).



*Figura 48: Viabilidad celular de andamios fabricados mediante bioimpresión vs electrospinning.*

	BIOIMPRESIÓN	ELECTROSPINNING	P
<b>VIABILIDAD</b>	78.18 ± 7.02 %	89.88 ± 9.86 %	P=0.013
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.57 [0.40, 0.72]	0.46 [0.29, 0.65]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.60 [0.45, 0.73]	0.44 [0.29, 0.63]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.68 [1.36, 2.24]	2.25 [1.59, 3.48]	P=0.000

*Tabla 12: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning.*

Además se estudió la viabilidad en función de la estimulación que recibieron (n=3). Los valores descriptivos sobre los andamios bioimpresos sin estimulación y con estimulación se detallan en el apartado 4.3.1.2.2, los valores de los andamios de electrospinning sin estimulación se detallaron en el apartado 4.3.2 y los estimulados en el 4.3.2.1. Las tablas 13 y 14 recogen brevemente los resultados descriptivos de los andamios sin estimulación y estimulados mecánicamente, respectivamente.

	BIOIMPRESIÓN	ELECTROSPINNING	P
<b>VIABILIDAD</b>	81.22 ± 6.38 %	87.17 ± 11.62 %	P=0.423
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.59 [0.41, 0.74]	0.47 [0.27, 0.68]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.63 [0.50, 0.75]	0.46 [0.30, 0.65]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.59 [1.33, 2.01]	2.16 [1.55, 3.33]	P=0.000

*Tabla 13: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning sin estimulación.*



	BIOIMPRESIÓN	ELECTROSPINNING	P
<b>VIABILIDAD</b>	75.13 ± 7.39 %	96.00 ± 3.13 %	P=0.013
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.56 [0.39, 0.69]	0.45 [0.29, 0.65]	P=0.000
<b>REDONDEZ</b>	0.56 [0.41, 0.71]	0.42 [0.26, 0.64]	P=0.000
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.78 [1.40, 2.46]	2.37 [1.58, 3.84]	P=0.000

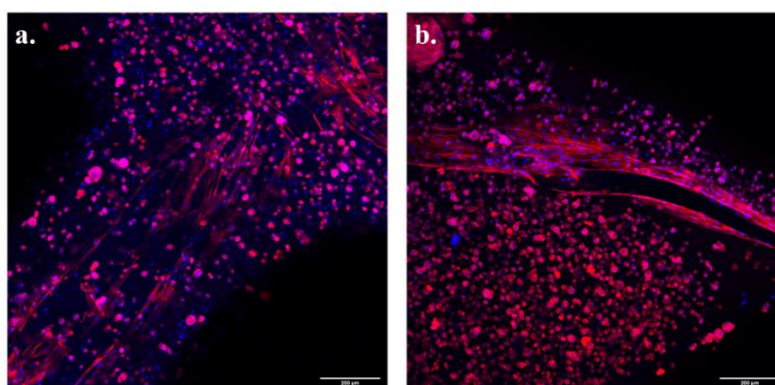
*Tabla 14: Viabilidad celular y morfología celular de C2C12 en andamios fabricados mediante bioimpresión y electrospinning estimulados mecánicamente.*

## 4.4. Morfología del citoesqueleto

### 4.4.1. Andamios bioimpresos

#### 4.4.1.1. Citoesqueleto en biotinta CA2

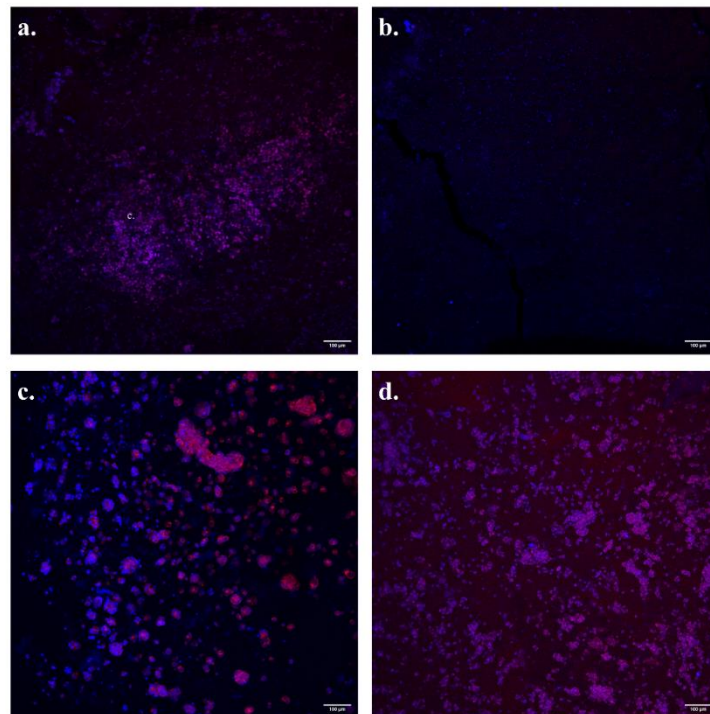
Se realizó inmunofluorescencia de los andamios de la biotinta CA2 (n=3) con la línea celular C2C12, tanto sin estimulación como estimulados mecánicamente. Estos andamios presentaron una elevada inmaduración y un bajo alineamiento entre sus células como se puede ver en la figura 49. A pesar de la presencia de actina, la formación de microtubulos y alineamiento es escasa tanto en andamios con estimulación como sin estimulación. El mayor grado de alineamiento encontrado se da en las células depositadas sobre los filamentos de PCL, la cual ha promovido el alineamiento entre las células. Sin embargo, este alineamiento puede darse entre células que no se encuentre encapsuladas en la biotinta.



*Figura 49: Inmunofluorescencia de CA2 con C2C12.*

#### 4.4.1.2. Citoesqueleto celular en andamios con variación de concentración de colágeno y alginato

Las biotintas (n=3) CA3, CA4, CA5 y CA6 mostraron un gran número de núcleos teñidos de color azul con DAPI, presentando formas muy dispares, que varían desde núcleos grandes, redondeados y definidos en los cúmulos celulares, hasta núcleos pequeños y deformados en las células de alrededor de los cúmulos. Asimismo, vemos baja expresión de actina generalizada entre las 4 biotintas (figura 50). La actina visualizada se encuentra alrededor de núcleos pero nunca llegando a rodear a más de dos núcleos a la vez o direccionar más de dos núcleos en forma de miofibra.

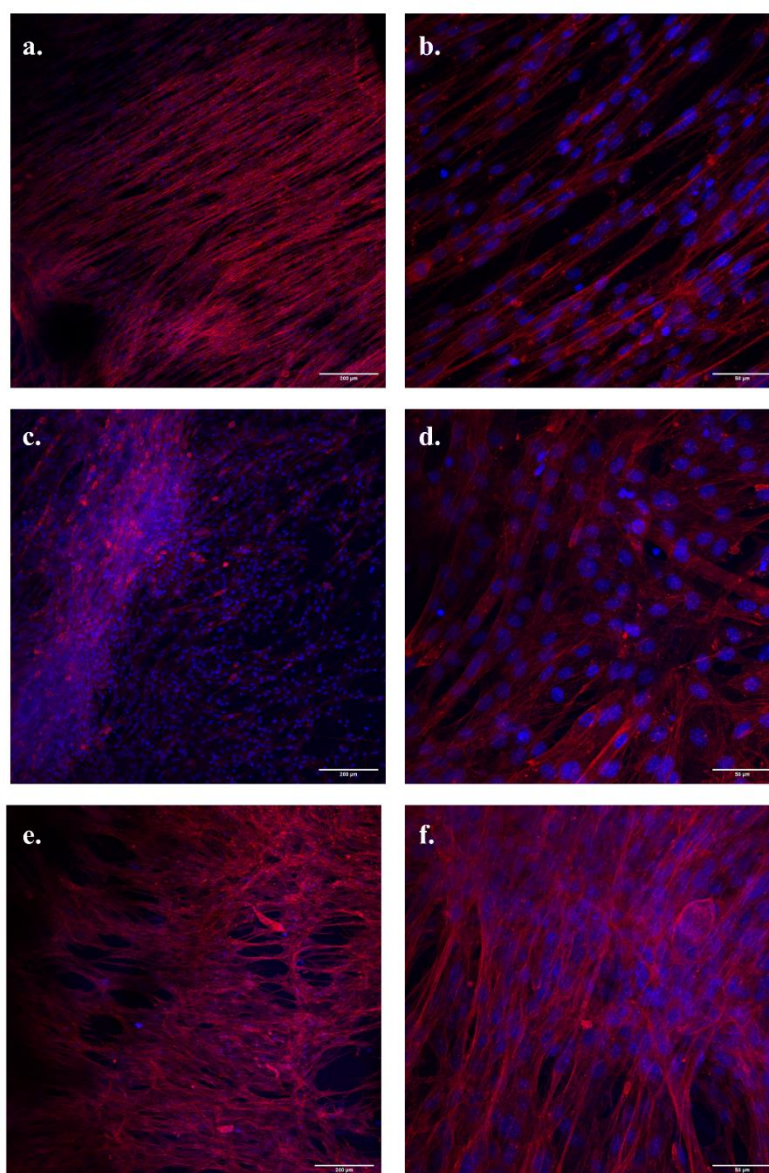


*Figura 50: Inmunofluorescencia de andamios de colágeno y alginato. a. CA3. b. CA4. c. CA5. d. CA6.*

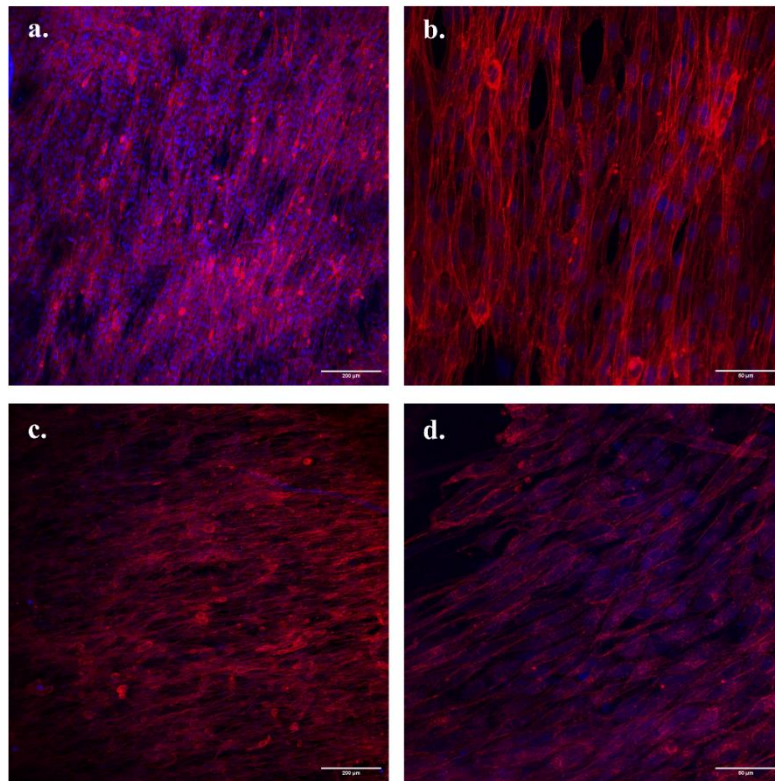
#### 4.4.2. Andamios de nanofibras

Con la presencia de actina, se ha intentado medir la diferenciación miogénica y la morfología del citoesqueleto. Se ha observado la presencia de actina en la totalidad de los andamios de nanofibras. La figura 51 muestra la estructura de los cultivos en estos andamios (n=3). Podemos observar los andamios alineados (figura 51 a y b) se componen casi totalmente de fibras polinucleadas y que la existencia de células que no forman parte

de las fibras es escasa o cuanto menos no evidente. Los andamios semialineados (figura 51 c y d) y random (figura 51 e y f) han mostrado no tener un orden tan claro en las fibras, además se puede apreciar especialmente la presencia de células inmaduras que no se alinean con el resto en los andamios semialineados. En cuanto a los andamios estimulados, los andamios estimulados mecánicamente (figura 52 a y b) presentaron una mayor maduración y orientación de las fibras, mientras que los andamios electroestimulados (figura 52 c y d) tenían una orientación más irregular de las fibras.



**Figura 51: Inmunofluorescencia de andamios fabricados con electrospinning. a. Andamios alineados 10X. b. Andamios alineados 40X. c. Andamios semialineados 10X. d. Andamios semialineados 40X. e. Andamios random 10X. f. Andamios random 40X.**

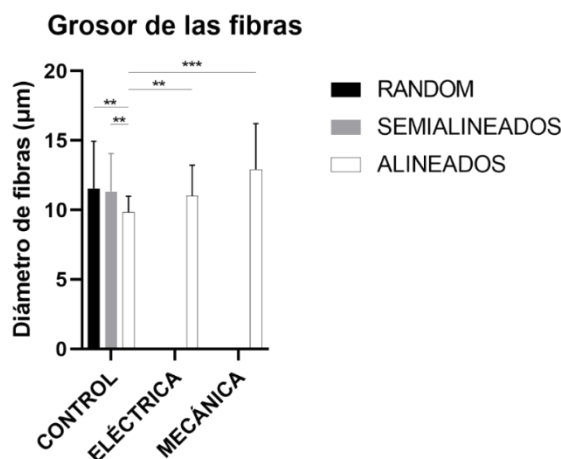


**Figura 52:** Inmunofluorescencia de andamios alineados fabricados con electrospinning. *a. Andamios alineados estimulados mecánicamente 10X. b. Andamios alineados estimulados mecánicamente 40X. c. Andamios alineados estimulados eléctricamente 10X. d. Andamios alineados estimulados eléctricamente 40X.*

#### 4.4.2.1. Grosor de las fibras

El grosor de las fibras creadas con los andamios random (n=3) fue de  $11.55 \pm 3.39$   $\mu\text{m}$ . Los andamios semialineados (n=3) presentaron un grosor de  $11.32 \pm 2.73$   $\mu\text{m}$  mientras que el de los andamios alineados (n=3) fue de  $9.84 \pm 1.15$   $\mu\text{m}$ . Se demostró la existencia de diferencia significativa entre los 3 grupos (P=0.000) (figura 53). Se hizo un estudio por pares para conocer entre que tipos de andamios había diferencia. Entre los andamios random y semialineados no se evidenció que hubiera diferencia estadísticamente significativa (P=0.973), mientras que sí se pudo demostrar entre los andamios alineados y random (P=0.001) y alineados y semialineados (P=0.003).





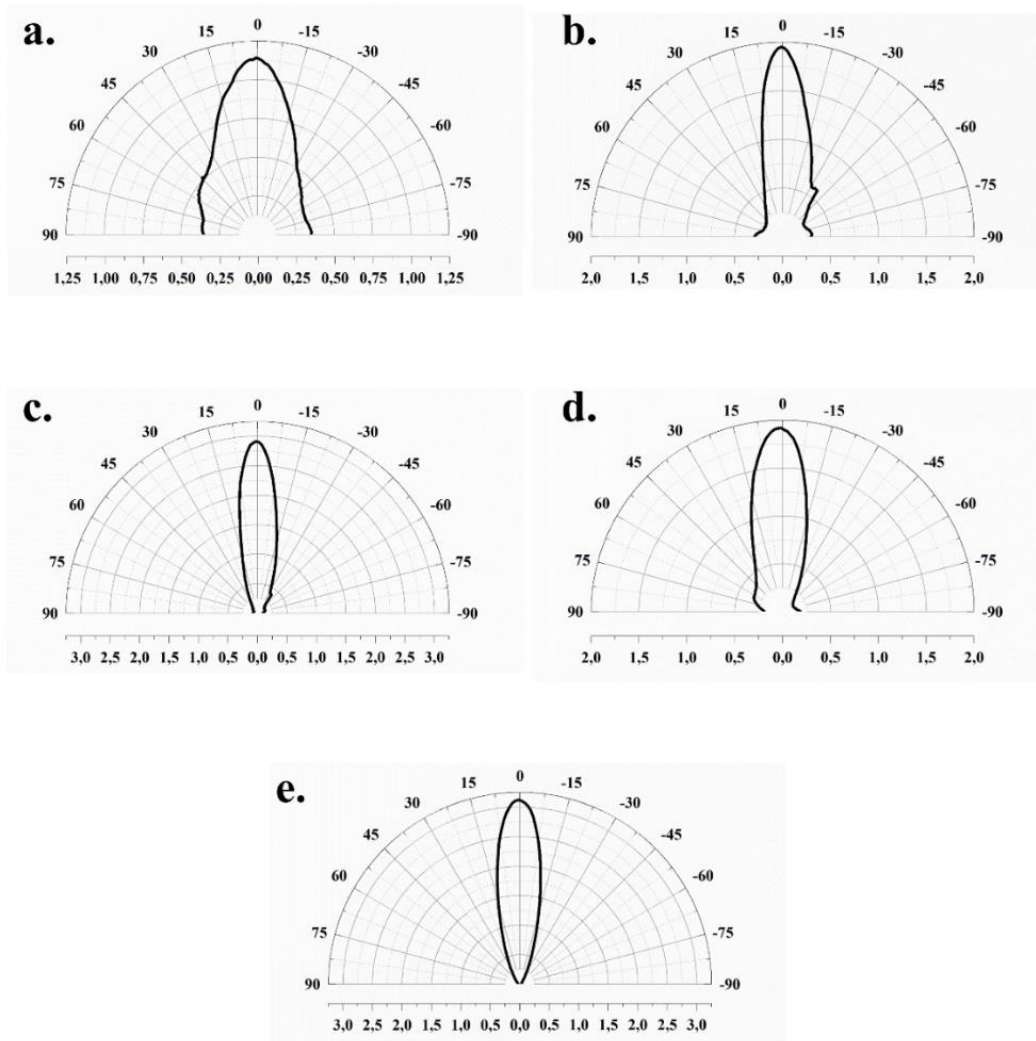
*Figura 53: Grosor de las fibras.*

#### 4.4.2.1.1. Efecto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre la viabilidad

A continuación se estudió el efecto de la estimulación de los andamios alineados. Los andamios estimulados mecánicamente ( $n=3$ ) presentaron un grosor de  $12.92 \pm 3.29 \mu\text{m}$ . y las fibras electroestimuladas ( $n=3$ ) mostraron un grosor de  $11.01 \pm 2.22 \mu\text{m}$ . Se evidenció diferencia significativa entre las 3 estimulaciones ( $P=0.000$ ) (figura 53). Se evidenció diferencia significativa entre todos los pares de estimulaciones; entre los andamios no estimulados y los electroestimulados fue de  $P=0.002$ , entre los andamios sin estimulación y estimulación mecánica ( $P=0.000$ ), y finalmente entre los andamios estimulados mecánicamente y eléctricamente ( $P=0.002$ ).

#### 4.4.2.2. Alineamiento de las fibras

La figura 54 muestra la distribución de las fibras según cada tipo de andamios utilizado ( $n=3$ ). De esta forma vemos como la orientación de las fibras sufre un mayor ordenamiento a la vez que las nanofibras del andamio aumentan su orientación. Además la estimulación mecánica incrementa el ordenamiento de las fibras en los andamios alineados.



**Figura 54:** Distribución de los microtubulos. *a. Andamios random. b. Andamios semialineados. c. Andamios alineados. d. Andamios alineados estimulados eléctricamente. e. Andamios alineados estimulados mecánicamente.*

El alineamiento de las fibras de los andamios random fue del  $21.44 \pm 3.71$  %, los andamios semialineados mostraron una alineación del  $33.82 \pm 13.87$  % y los andamios alineados presentaron una alineación del  $49.51 \pm 2.03$  % (figura 55). Se encontró inferencia estadística entre la alineación de los 3 grupos ( $P=0.018$ ). El estudio por pares demostró que solamente había diferencia significativa entre los andamios alineados y random ( $P=0.015$ ) y no entre los andamios random y semialineados ( $P=0.244$ ) y entre los andamios semialineados y alineados ( $P=0.132$ ).

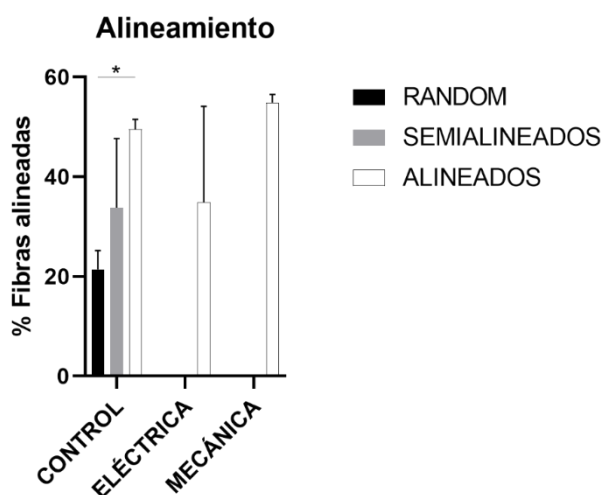


Figura 55: Alineamiento de las fibras.

#### 4.4.2.2.1. Efecto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre la viabilidad

Los andamios alineados estimulados mecánicamente (n=3) mostraron una alineación de las fibras del  $54.89 \pm 1.63$  %. Las fibras de los andamios electroestimulados (n=3) presentaron una alineación del  $34.93 \pm 19.18$  %. Dentro de la alineación de los andamios alineados, no se demostró que la estimulación de los mismos promoviera un aumento de la alineación de las fibras (P=0.157) (figura 54).

#### 4.4.2.3. Maduración de los núcleos – circularidad y ratio del aspecto

Para medir la maduración de las células utilizamos 3 parámetros; el ratio del aspecto del núcleo, la circularidad y la redondez. Comenzando con los andamios random (n=3), estos tuvieron un aspecto del ratio del núcleo de 1.49 [1.30, 1.75], la circularidad fue de 0.59 [0.50, 0.74] y la redondez de 0.67 [0.57, 0.77]. Los andamios semialineados (n=3) presentaron una ratio del aspecto de 1.51 [1.30, 1.83], la circularidad fue de 0.65 [0.49, 0.77] y la redondez de 0.66 [0.55, 0.77]; mientras que el ratio del aspecto fue de 1.76 [1.50, 2.10] en los andamios alineados (n=3), la circularidad 0.65 [0.52, 0.75] y la redondez 0.57 [0.48, 0.67] (tabla 15). Se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos en la ratio del aspecto (P=0.000), la circularidad (P=0.000) y la redondez (P=0.000). Entre los andamios random y semialineados solamente se evidenció diferencia significativa en la variable circularidad (P=0.000), mientras que en la ratio del aspecto (P=0.136) y redondez no se hallaron diferencias significativas (P=0.136). Entre los

## RESULTADOS

andamios random y alineados se vieron diferencias significativas en las 3 variables estudiadas ( $P=0.000$ ). Los andamios semialineados y alineados tuvieron diferencia significativa en las variables ratio del aspecto ( $P=0.000$ ) y redondez ( $P=0.000$ ), sin embargo no se hallaron diferencias significativas en la circularidad ( $P=0.937$ ).

	<b>RANDOM</b>	<b>SEMIALINEADOS</b>	<b>ALINEADOS</b>	<b>P</b>
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.49 [1.30, 1.75]	1.51 [1.30, 1.83]	1.76 [1.50, 2.10]	$P=0.000$
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.59 [0.50, 0.74]	0.65 [0.48, 0.67]	0.65 [0.52, 0.75]	$P=0.000$
<b>REDONDEZ</b>	0.67 [0.57, 0.77]	0.66 [0.55, 0.77]	0.57 [0.48, 0.67]	$P=0.000$

*Tabla 15: Morfología nuclear de andamios de electrospinning.*

#### 4.4.2.3.1. Efecto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre la viabilidad

Los andamios alineados estimulados mecánicamente ( $n=3$ ) presentaron una ratio del aspecto de 1.60 [1.40, 1.88], la circularidad fue de 0.50 [0.39, 0.60] y la redondez de 0.63 [0.53, 0.71]. Los núcleos de las células electroestimuladas ( $n=3$ ) presentaron una ratio del aspecto de 1.96 [1.55, 2.57], una circularidad de 0.39 [0.22, 0.55], y una redondez de 0.51 [0.39, 0.64] (tabla 16). Se evidenció diferencia significativa en todas las variables morfológicas entre todos los pares de estimulaciones ( $P=0.000$ ).

	<b>CONTROL</b>	<b>ELÉCTRICA</b>	<b>MECÁNICA</b>	<b>P</b>
<b>RATIO DEL ASPECTO</b>	1.76 [1.50, 2.10]	1.96 [1.55, 2.57]	1.60 [1.40, 1.88]	$P=0.000$
<b>CIRCULARIDAD</b>	0.65 [0.52, 0.75]	0.39 [0.22, 0.55]	0.50 [0.39, 0.60]	$P=0.000$
<b>REDONDEZ</b>	0.57 [0.48, 0.67]	0.51 [0.39, 0.64]	0.63 [0.53, 0.71]	$P=0.000$

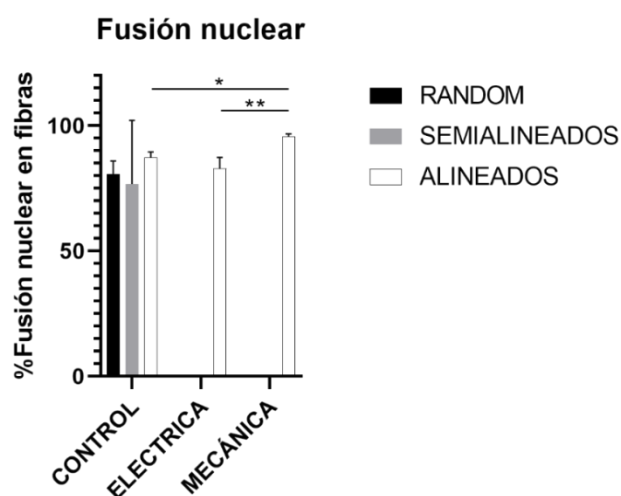
*Tabla 16: Morfología nuclear de andamios alineados estimulados.*

#### 4.4.2.4. Densidad nuclear en fibras

Se analizaron los núcleos que estaban dentro de las fibras sobre el total de núcleos detectados en cada tipo de andamio ( $n=3$ ). Así, encontramos que en los andamios random el  $80.73 \pm 5.21$  % de los núcleos estaban dentro de las fibras, en los andamios semialineados la densidad nuclear se vio levemente reducida al  $76.74 \pm 25.37$  % mientras que en los andamios alineados la densidad sufrió un ascenso al  $87.28 \pm 2.22$  %. No se



evidenció diferencia significativa entre la densidad nuclear de los 3 tipos de andamios ( $P=0.301$ ) (figura 56).



*Figura 56: Fusión nuclear.*

#### 4.4.2.4.1. Efecto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre la viabilidad

La estimulación eléctrica ( $n=3$ ) mostró una disminución de los núcleos dentro de las fibras, siendo esta del  $82.91 \pm 4.41$  %, mientras que los andamios estimulados mecánicamente ( $n=3$ ) promovieron un aumento de la densidad nuclear de hasta el  $95.73 \pm 1.05$  %. Se demostró la existencia de diferencia significativa entre los 3 grupos de estimulación estudiados ( $P=0.005$ ) (figura 56). El estudio por pares demostró que los andamios alineados estimulados mecánicamente presentaron diferencia significativa respecto a los andamios sin estimulación ( $P=0.028$ ) y los andamios con estimulación eléctrica ( $P=0.004$ ), sin embargo, no se pudo demostrar que existiera diferencia significativa entre los andamios electroestimulados y los controles ( $P=0.238$ ).

#### 4.4.2.5. Densidad de actina en fibras

La densidad de actina en los andamios random ( $n=3$ ) fue del  $76.18 \pm 10.55$  %, en los andamios semialineados ( $n=3$ ) la densidad fue del  $79.87 \pm 2.36$  %, mientras que en los andamios alineados ( $n=3$ )  $74.56 \pm 2.63$  %. No se demostró que existiera diferencia significativa entre los 3 tipos de andamios testados ( $P=0.179$ ) (figura 57).

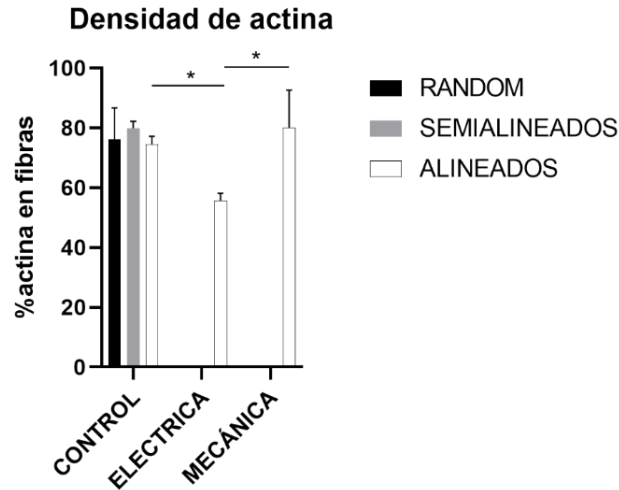


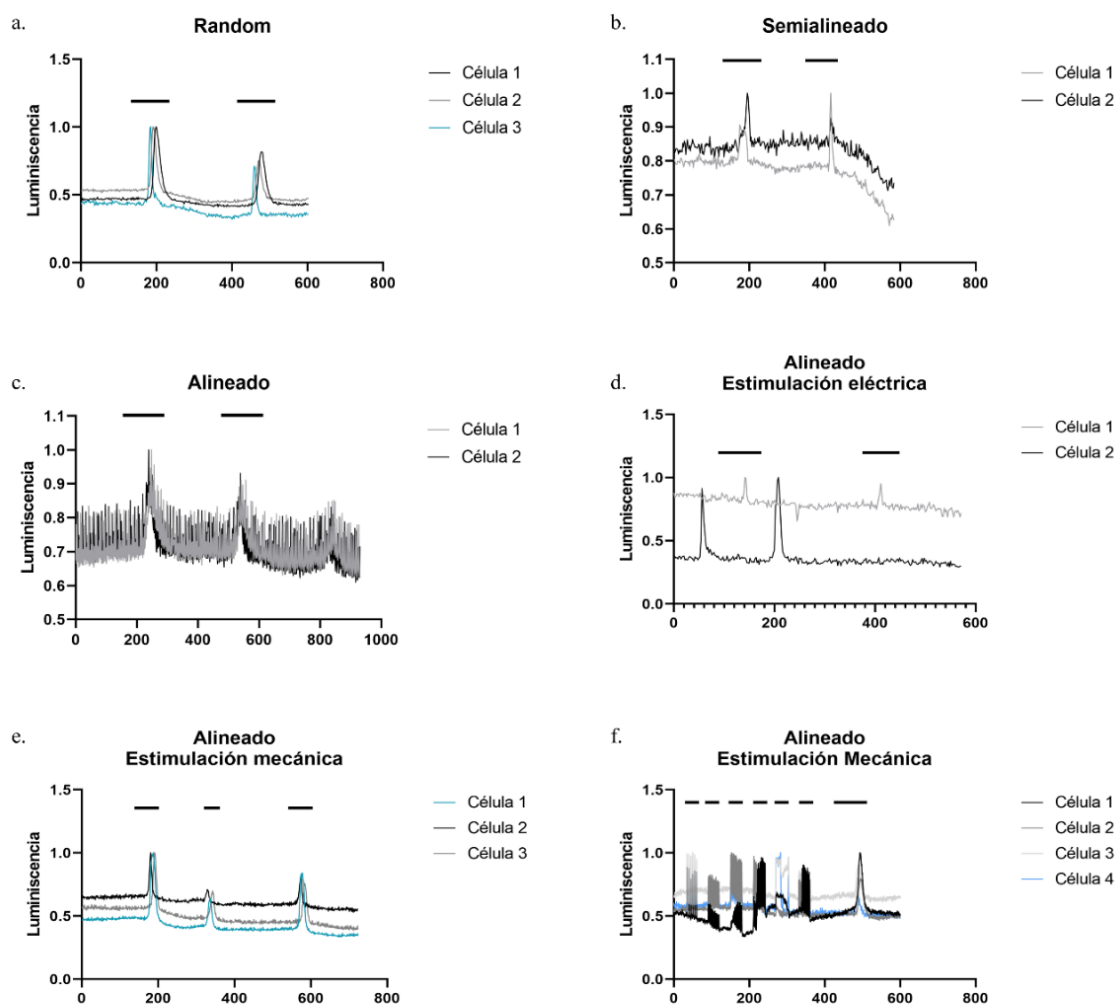
Figura 57: Densidad de actina.

#### 4.4.2.5.1. Efecto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre la viabilidad

El efecto de la estimulación eléctrica (n=3) sobre la densidad de actina en los andamios alineados se tradujo en una reducción de la expresión de actina al  $55.62 \pm 2.47$  %. Por el contrario, el efecto mecánico sobre los andamios alineados (n=3) fue un aumento al  $80.13 \pm 12.52$  %. Se demostró diferencia significativa entre los 3 grupos de los andamios alineados (P=0.004) (figura 57). En el estudio por pares, se vio que la estimulación eléctrica presentó diferencia significativa frente a los andamios sin estimulación (P=0.049) y los andamios estimulados mecánicamente (P=0.017). No obstante, no se pudo demostrar que existiera diferencia significativa entre la estimulación mecánica y el grupo control (P=0.656).

## 4.5. Actividad funcional de los tejidos

Los andamios fabricados mediante electrospinning (n=3) fueron sometidos a estudio de funcionalidad, ya que mostraron una morfología más similar a la del músculo estriado. Todos los grupos y todas las estimulaciones mostraron funcionalidad, aunque no toda esta funcionalidad fue ante la respuesta a un estímulo de iones  $K^+$  o de pulsos eléctricos como se puede ver en la figura 58, donde se muestra la luminiscencia normalizada de grupos de células. A partir de estos datos obtuvimos la molaridad de calcio intracelular tras ser expuestos a soluciones altas en iones  $K^+$  el incremento de luminiscencia tras el estímulo.



**Figura 58: Luminiscencia de las células ante soluciones altas en  $K^+$ . a. Andamios random. b. Andamios semialineados. c. Andamios alineados. d. Andamios alineados estimulados eléctricamente. e. Andamios alineados estimulados mecánicamente. f. Andamios alineados estimulados mecánicamente estimulados con pulsos eléctricos y soluciones altas en  $K^+$ .**

En los andamios random (figura 58 a), alineados (figura 58 c), alineados con estimulación eléctrica (figura 58 d) y mecánica (figura 58 e) podemos ver picos de luminiscencia tras aproximadamente minuto y medio tras el cambio de concentración. En los andamios semialineados (figura 58 b) podemos ver ligeras oscilaciones del valor de luminiscencia en los intervalos que aumenta la concentración de  $K^+$ . Esto nos habla de una capacidad de contracción muy pobre del tejido y dependiente de la densidad celular de la muestra.



*QR 1: Video andamio random*

A través de la luminiscencia se hizo una estimación del calcio intracelular, en el primer pico y en el segundo como se puede ver en la tabla 17. De este modo pudimos ver la reacción a estos estímulos por parte de las células y además la fatiga celular en el tren de estímulos, calculando la diferencia entre ambos picos tanto de luminiscencia como de calcio. Así vimos que en los andamios random, tras el primer estímulo, la luminiscencia se incrementó 34.39 [23.15, 46.20] y la concentración de calcio en el primer pico se aumentó en 87.75 nM [45.81, 257.30], llegando a tener una concentración de 178.96 nM [99.95, 393.77]. Tras el segundo estímulo, la luminiscencia se incrementó 16.15 [4.50, 22.14] y la concentración de calcio intracelular en 36.58 nM [4.96, 106.09], con una concentración total de 102.49 nM [48.93, 224.37]. Así la diferencia de calcio entre ambos estímulos fue de 49.46 nM [23.96, 154.63] y la diferencia de luminiscencia de 16.71 [12.34, 25.67]. Escaneando el código QR1 se puede visualizar un breve video de la reacción que sufren las células cultivadas en el andamio random.



*QR 2: Video andamio semialineado*

En el caso de los andamios semialineados el incremento de la luminiscencia fue de 1.99 [1.27, 3.29] y la concentración se incrementó 40.24 nM [18.82, 86.08], resultando en una concentración de calcio de 271.88 nM [148.29, 510.89]. Tras el segundo estímulo la luminiscencia se incrementó 1.38 [0.96, 2.17], la concentración de calcio se redujo 9.32 [-34.29, -1.44], dejando así la concentración de calcio intracelular en 219.61 nM [126.46, 406.76]. Las diferencias de calcio y luminiscencia fueron de 49.65 nM [10.73, 121.78] y 0.52 [0.06, 1.38], respectivamente. Como se puede observar, no hay subida de luminiscencia tras los estímulos. El código QR2 nos lleva a un vídeo donde se puede ver la reacción celular de estos andamios.

	PICO 1			PICO 2				
	PICO DE CALCIO	SUBIDA DE CACIO	LUM	PICO DE CALCIO	SUBIDA DE CACIO	LUM	DIFERENCIA DE CALCIO	
							DIFERENCIA DE LUMINISCENCIA	
<b>RANDOM</b>	178.96 nM [99.95, 393.77]	87.75 nM [45.81, 257.30]	34.39 [23.15, 46.20]	102.49 nM [48.93, 224.37]	36.58 nM [4.96, 106.09]	16.15 [4.50, 22.14]	49.46 nM [23.96, 154.63]	16.71 [12.34, 25.67]
<b>SEMI-ALINEADOS</b>	271.88 nM [148.29, 510.89]	40.24 nM [18.82, 86.08]	1.99 [1.27, 3.29]	219.61 nM [126.46, 406.76]	-9.32 nM [-34.29, -1.44]	1.38 [0.96, 2.17]	49.65 nM [10.73, 121.78]	0.52 [0.06, 1.38]
<b>ALINEADOS (CONTROL)</b>	1268.37 nM [198.93, 4292.50]	1111.58 nM [83.61, 3822.46]	22.51 [14.86, 29.74]	745.80 nM [134.94, 2029.51]	589.00 nM [19.62, 1559.47]	13.73 [5.30, 22.25]	522.58 nM [63.99, 2262.99]	8.50 [7.18, 10.15]
<b>ALINEADOS (EÉCTRICA)</b>	280.32 nM [119.27, 635.22]	94.83 nM [27.93, 289.53]	12.86 [7.67, 17.49]	200.90 nM [92.29, 454.82]	8.34 nM [-17.30, 76.31]	2.48 [-2.65, 8.69]	67.52 nM [10.96, 196.36]	6.49 [3.13, 17.54]
<b>ALINEADOS (MECÁNCIA)</b>	193.81 nM [125.20, 420.02]	98.87 nM [37.85, 232.33]	32.21 [17.32, 39.87]	115.31 nM [77.66, 176.13]	-1.61 nM [-10.15, 2.02]	0.43 [-1.68, 1.58]	100.68 nM [38.37, 237.96]	31.51 [18.98, 40.39]

Tabla 17: Concentraciones de calcio intracelular y luminiscencias tras estímulos de soluciones altas en K<sub>+</sub>.



*QR 3: Video andamio alineado*

Los andamios alineados presentaron un incremento de luminiscencia de 22.51 [14.86, 29.74] y un incremento de la concentración de calcio de 1111.58 nM [83.61, 3822.46], con una concentración de calcio total de 1268.37 nM [198.93, 4292.50]. Tras el segundo la luminiscencia y la concentración de calcio se incrementaron 13.73 [5.30, 22.25] y 589.00 nM [19.62, 1559.47], respectivamente. La concentración total de calcio intracelular tras el segundo estímulo fue de 745.80 nM [134.94, 2029.51], así la diferencia de concentraciones de calcio fue 522.58 nM [63.99, 2262.99] y la diferencia de luminiscencia de 8.50 [7.18, 10.15] entre ambos picos. Escaneando el código QR3, podremos ver la respuesta de los andamios alineados ante los estímulos.

Se demostraron diferencias significativas en los incrementos de calcio tras el primer estímulo ( $P=0.007$ ) y tras el segundo ( $P=0.000$ ), así como en los incrementos de las luminiscencias tras el primer ( $P=0.000$ ) y el segundo estímulo ( $P=0.000$ ). Finalmente se evidenció diferencia en la concentración total de calcio intracelular tras el segundo estímulo ( $P=0.015$ ) y en la diferencia de luminiscencia entre ambos estímulos ( $P=0.000$ ). Revisando por pares los andamios random y semialineados presentaron diferencias en los incrementos de calcio tras el primer estímulo ( $P=0.006$ ) y tras el segundo ( $P=0.000$ ), en los incrementos de las luminiscencias tras el primer ( $P=0.000$ ) y el segundo estímulo ( $P=0.000$ ) y en la concentración total de calcio tras el segundo estímulo ( $P=0.021$ ) y en la diferencia de luminiscencia entre ambos estímulos ( $P=0.000$ ). Entre los andamios semialineados y alineados se demostraron diferencias solamente en los incrementos de calcio intracelular tras el primer estímulo ( $P=0.047$ ) y tras el segundo estímulo ( $P=0.002$ ) y en los incrementos de luminiscencia ( $P=0.000$ ) y ( $P=0.002$ ), respectivamente y en la diferencia de luminiscencia entre ambos picos ( $P=0.000$ ). Finalmente, los andamios alineados y random presentaron diferencias significativas solamente en la diferencia de luminiscencia entre ambos picos ( $P=0.004$ ).

Atendiendo a los andamios alineados, la estimulación eléctrica ( $n=3$ ) produjo un incremento de la luminiscencia en 12.86 [7.67, 17.49] y un incremento de la concentración de calcio tras el primer estímulo de 94.83 nM [27.93, 289.53], con un concentración total de 280.32 nM [119.27, 635.22]. Tras el segundo estímulo, el incremento de la luminiscencia fue de 2.48 [-2.65, 8.69] y el aumento de la concentración



*QR 4: Vídeo andamio alineado con estimulación eléctrica*



*QR 5: Vídeo andamio alineado con estimulación mecánica*

fue de 8.34 nM [-17.30, 76.31] con una concentración total de 200.90 nM [92.29, 454.82], mientras que las diferencias de la concentración de calcio y de luminiscencia fueron de 67.52 nM [10.96, 196.36] y 6.49 [3.13, 17.54], respectivamente. Con el código QR 4 podremos observar la respuesta de las células cultivadas en estos andamios.

En los andamios estimulados mecánicamente (n=3), la luminiscencia se incrementó 32.21 [17.32, 39.87] y el calcio 98.87 nM [37.85, 232.33], así la concentración de calcio tras el primer estímulo en los andamios estimulados mecánicamente fue de 193.81 nM [125.20, 420.02]. Tras el segundo estímulo, el incremento de la luminiscencia fue de 0.43 [-1.68, 1.58] mientras que la concentración de calcio se redujo 1.61 nM [-10.15, 2.02]. Esta baja respuesta puede ser debida al poco tiempo de exposición al estímulo o bien a la fatiga del anterior estímulo. La concentración de calcio fue de 115.31 nM [77.66, 176.13], la diferencia de calcio fue de 100.68 nM [38.37, 237.96] y la diferencia de luminiscencia fue de 31.51 [18.98, 40.39]. A través del código QR 5, es posible la visualización de la respuesta de las células cultivadas en estos andamios ante los estímulos.

Se evidenciaron diferencias en la concentración de calcio tras el segundo estímulo (P=0.028), el incremento de calcio tras el segundo estímulo (P=0.025), en el incremento de luminiscencia tras el primer (P=0.000) y segundo estímulo (P=0.009) y en la diferencia de luminiscencia entre ambos estímulos (P=0.000). Entre los andamios sin estimulación y estimulados eléctricamente se vio diferencia significativa en el incremento de calcio tras el segundo estímulo (P=0.049). Entre los andamios sin estimulación y estimulados mecánicamente se vio diferencia en el incremento de calcio tras el segundo estímulo (P=0.006) y en el incremento de luminiscencia tras el segundo estímulo (P=0.000). Entre los grupos estimulados se demostró diferencia en el incremento de la luminiscencia tras el primer estímulo (P=0.000), en la concentración de calcio tras el segundo estímulo (P=0.020) y en la diferencia de luminiscencia entre ambos estímulos (P=0.000).

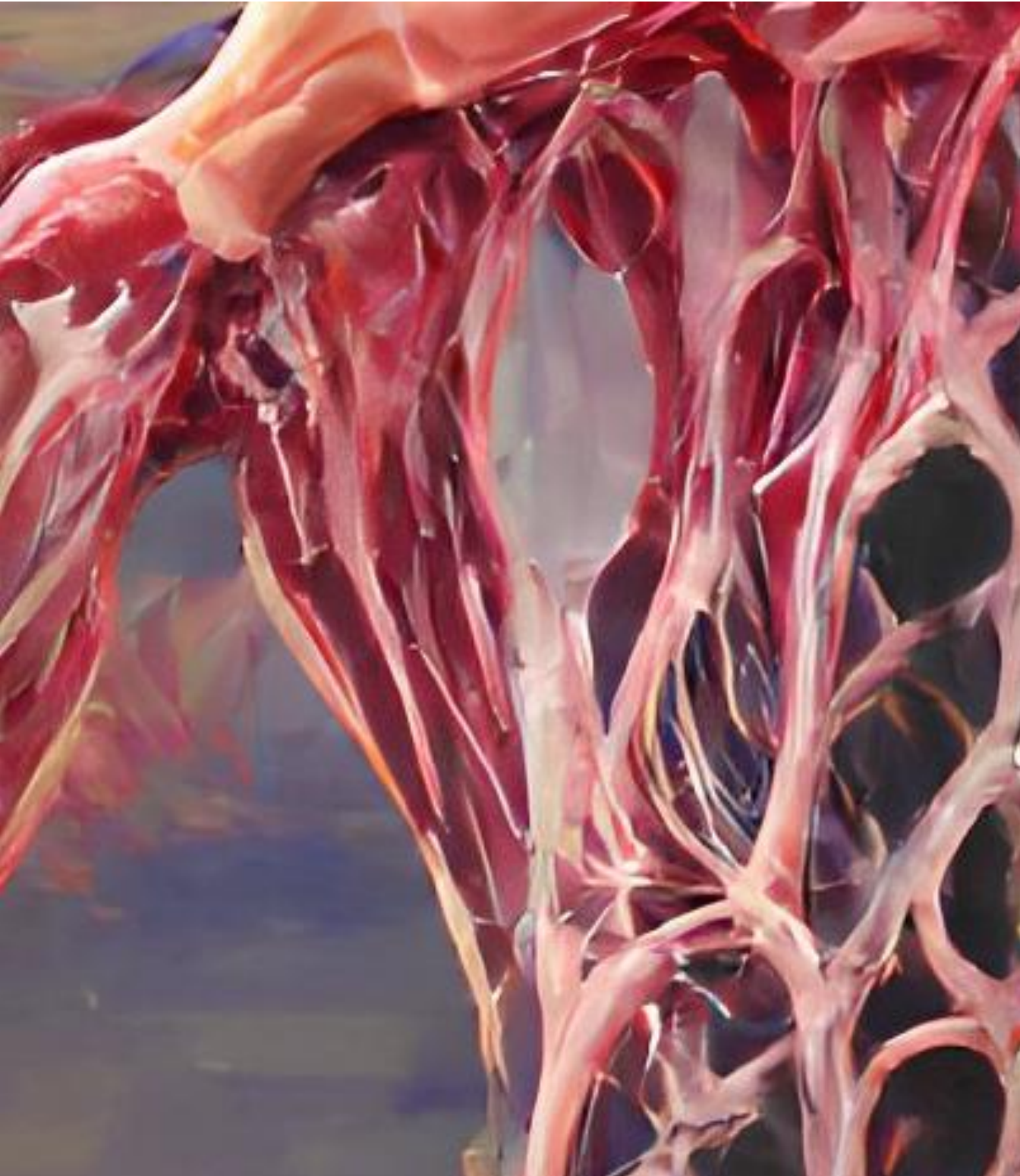
En resumen, hemos observado que la capacidad de contracción del tejido es superior en andamios alineados tanto con estimulación mecánica como sin estimulación y los andamios random de la misma manera que el grado de formación de músculo esquelético.





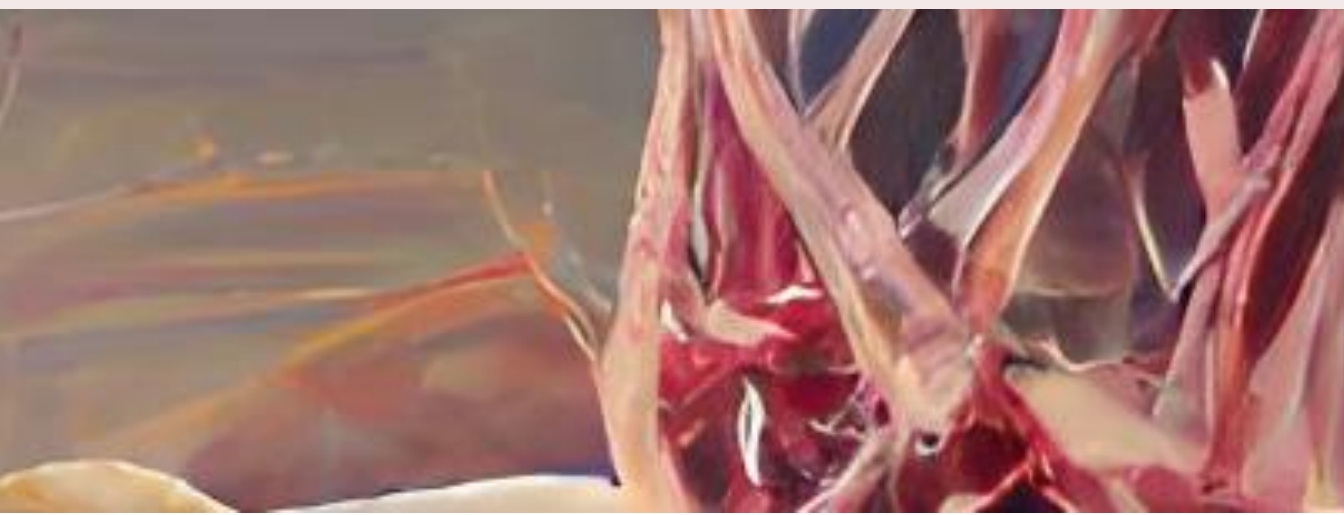
*QR 6: Andamio  
respondiendo a  
pulsos eléctricos y  
solución alta en  
potasio*

Finalmente, los andamios estimulados mecánicamente, al presentar una contracción evidente y una orientación de las fibras, fueron sometidos a estimulación eléctrica para conocer su respuesta antes este nuevo estímulo. Como podemos ver en la figura 58 f, primero se sometió a una frecuencia de 0.2 Hz, después a 0.5 Hz, 1 Hz y 2 Hz, cada tren de descargas duró 30 segundos. Además, el código QR 6, nos permite visualizar un breve vídeo de la respuesta de las células de este grupo ante los estímulos a los que fueron expuestas. Pudimos ver la respuesta de las células a bajas frecuencias, sin embargo a la frecuencia de 2 Hz la respuesta no fue tan evidente como la presentaron a bajas. Esto se puede deber al tiempo de despolarización de las membranas celulares, puede que sea más lento que la velocidad a la que cambian los estímulos y no permite que el calcio entre dentro de las células. Aun así, los cultivos fueron estimulados de nuevo a 1 Hz y a soluciones altas en K<sup>+</sup> y pudimos comprobar que volvían a ser funcionales.



# CAPÍTULO 5

## DISCUSIÓN





La IT ha surgido recientemente con el objeto de poder satisfacer la demanda de injertos de tejido. Como se ha descrito anteriormente, una de las ramas de las IT se centra en el desarrollo de tejido *in vitro*, la cual permite la selección y cultivo de células en los andamios tisulares para recrear el entorno biológico (81).

La creación de tejido muscular esquelético funcional *ex vivo* es uno de los objetivos que siempre ha estado presente en el campo de la MR. Esta línea es en la que se centra nuestro estudio. Este tipo de músculo se encuentra en infinidad de sistemas, aparatos y órganos cumpliendo funciones muy relevantes.

Para la discusión de los resultados obtenidos nos centraremos en los 3 factores claves que tiene la IT *in vitro*:

1. La elección de las células.
2. El uso de andamios tisulares como ECM.
3. Las señales que estimulan las interacciones célula-andamio y célula-célula.

### **5.1. Estudio comparativo de líneas celular L6 y C2C12**

La elección de una fuente celular adecuada es fundamental para generar músculo funcional *in vitro*. Estudios previos como el de Fishman et al. (308), establecieron unos criterios que deberían cumplir las células para ser usadas en IT muscular:

1. Fuente accesible que genere un gran número de células.
2. Capacidad proliferativa homogénea *in vitro* sin pérdida de diferenciación en tiempos longevos.
3. Posibilidad de transducción *in vitro* con vectores que codifiquen genes terapéuticos.
4. Capacidad de llegar a los tejidos a regenerar a través de una vía de administración sistémica y en respuesta a las citoquinas liberadas por el músculo dañado.
5. Capacidad de diferenciación en fibras musculares eficientes *in situ*.

En la actualidad se emplean predominantemente cuatro tipos celulares en la creación de tejido muscular, a decir: la línea celular de mioblastos C2C12 de ratón, las células satélite derivadas de mioblastos primarios, los mioblastos primarios de diferentes especies y las MSC. Las células satélite son una solución atractiva ya que son

relativamente fáciles de aislar y además son las precursoras directas de los mioblastos. Sin embargo, el uso de líneas celulares como la línea celular C2C12 o la L6 consigue disminuir la variabilidad del aislamiento de células primarias. Además, el uso de la línea celular C2C12 para estudios de regeneración muscular hace posible un análisis comparativo objetivo con los trabajos publicados ya que es uno de los tipos de células más usados (274).

En nuestro estudio nos hemos centrado en el uso de las líneas celulares para la creación de tejido muscular *ex vivo* tales como la línea C2C12 (ratón) y la línea L6 (rata). La literatura actual carece de trabajos de regeneración muscular con la línea L6. Nuestro grupo por el contrario, sí tiene diferentes trabajos publicados que nos servirán para comparar el presente estudio con trabajos previos de nuestro grupo relacionados con esta línea celular (159,292,309,310).

Como hemos indicado, la línea L6 fue sembrada en 4 biotintas diferentes, colágeno; colágeno y Matrigel; MEC, CA1 y CA2. Podemos afirmar a la vista de lo actualmente publicado que es la primera vez que se usa la línea L6 en bioimpresión 3D.

Por otro lado hemos podido comprobar como la biotinta de colágeno y alginato tenía una mayor viabilidad celular medida mediante Hematoxilina-Eosina respecto al resto de biotintas testadas. No obstante, la expresión de proteínas del citoesqueleto celular no fue vista en abundancia en ninguna de las 4 biotintas testadas.

Cabe destacar algunos estudios que utilizan esta línea celular, los cuales han demostrado una tasa de viabilidad celular mediada mediante Hematoxilina-Eosina con un amplio rango (159,292,309,310). Todos estos ensayos utilizaron andamios porosos a diferencia de nuestros andamios que encapsulaban las células en hidrogeles. Si comparamos nuestros andamios con los anteriormente descritos, la viabilidad de la línea celular L6 en la biotinta CA1 presenta valores de viabilidad ( $74,74 \pm 13,20\%$ ), similares a los descritos por Perez-Puyana et al. (71.97%) (159) y Perez (292,309) en su Trabajo de Fin de Grado. Todos los trabajos coinciden en la misma conclusión de que el mayor grado de alineamiento de las células es observado en la periferia y bordes de los andamios tisulares. Esto podrá deberse a la mayor facilidad que presentan estas células para el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos.

Prestemos atención ahora en la **expresión de actina**, en mayor o menor grado, todos los trabajos exceptuando el de Serrano (310), presentaron expresión de  $\alpha$ -SMA, siendo esta en mayor grado en el trabajo de Perez-Puyana et. al (159). Pensamos que puede deberse a los biomateriales usados y a las estimulaciones a las que se sometieron los andamios. Por el contrario, nuestro trabajo presentó escasas zonas de expresión sin superar el  $15.08 \pm 6.28$  % de la población viable, siendo nula para algunos de los casos de los andamios de colágeno, colágeno y Matrigel y MEC. Al igual que comentamos en el párrafo anterior sobre el alineamiento celular, el marcaje de esta proteína fue abundante en zonas de filamentos delgados y zonas periféricas.

Con el fin de comparar ambas líneas celulares utilizamos la biotinta CA2 con una densidad celular de  $160 \times 10^6$  células/mL. De forma genérica, no se ha demostrado que el uso de una línea celular u otra conlleve un aumento significativo en la viabilidad celular, no obstante, al diferenciar los andamios sembrados con cada línea celular y estimulación, se ha podido comprobar que la viabilidad celular es estadísticamente mayor ( $P=0.027$ ) en la línea celular L6 ( $94.31 \pm 1.99$  %) que en la línea C2C12 ( $81.22 \pm 6.38$  %) cuando los andamios no son expuestos a ningún estímulo. Sin embargo, la estimulación mecánica con el biorreactor ocasionó una reducción de la viabilidad celular a tal punto que ambas son estadísticamente iguales (L6  $80.46 \pm 17.63$  %; C2C12  $75.20 \pm 7.39$  %) ( $P=0.655$ ).

Finalmente, otra variable que se tuvo en cuenta para la comparación de ambas líneas fue la **morfología celular**. Comparando ambas líneas, hemos podido comprobar que la maduración celular se consigue con mayor facilidad en los andamios que fueron sembrados con la línea C2C12, la circularidad ( $P=0.000$ ) y la redondez ( $P=0.000$ ) eran significativamente menores en esta línea, mientras que la ratio del aspecto era mayor ( $P=0.000$ ). Esto nos indica que las células C2C12 tendían a alargarse con mayor facilidad que las células L6 y conseguían una mayor maduración celular. Al distinguir los andamios estimulados mecánicamente y controles, pudimos corroborar la teoría que estábamos analizando. Los andamios controles con C2C12 tenían una maduración mayor que los andamios cultivados con L6, demostrado a través de la redondez ( $P=0.000$ ), circularidad ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ) de las células. Al estimular mecánicamente ambas líneas celulares, la maduración de ambas líneas se incrementaba, pero siempre siendo estadísticamente mayor en la línea C2C12, en las variables redondez ( $P=0.000$ ), circularidad ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ).



## 5.2. Determinación de la densidad celular ideal

Uno de los objetivos de estudio de este trabajo es determinar la densidad celular a usar en la siembra de los andamios. Los diferentes estudios que se han publicado utilizan densidades celulares muy variables debido a la heterogeneidad de los andamios utilizados.

Efectivamente, se ha utilizado un amplio espectro de densidades celulares, siendo siempre de mayor predominancia las densidades menores de  $10 \times 10^6$  células/mL (130,282–285,287,289,311,312). Estos trabajos han permitido tener resultados prometedores con unas bajas densidades celulares. Kim et al. (285) estudiaron el efecto de las densidades celulares dentro de la bioimpresión de músculo esquelético. No demostraron que existiera diferencia significativa entre las diferentes densidades estudiadas. Se basaron en la formación de las miofibras y su grosor para determinar que una densidad óptima para la bioimpresión de células era de  $30 \times 10^6$  células/mL. Alave et al. (311) usaron una densidad de  $20 \times 10^6$  células/mL con resultados prometedores a partir de células de cultivo primario de músculo esquelético humano.

Estudiamos la variación de la **densidad celular** L6 dentro de la biotinta CA1. No se evidenció que las tres densidades celulares estudiadas ( $20 \times 10^6$  células/mL;  $40 \times 10^6$  células/mL;  $80 \times 10^6$  células/mL), promovieran un aumento en la viabilidad celular ( $P=0.442$ ), en la expresión de  $\alpha$ -SMA o en la maduración celular. Como se viene comentando a lo largo de este trabajo, esta línea celular no es de las más empleadas para la regeneración músculo-esquelética (274). Aun así, hemos querido comparar esta línea celular con la línea celular C2C12 ya que puede proliferar indefinidamente y diferenciarse en miotubos multinucleados y además se ha utilizado para fabricar construcciones de músculo esquelético mediante bioimpresión (27).

Además, hemos usado 3 densidades celulares diferentes con la línea celular L6 dentro de la biotinta CA2;  $40 \times 10^6$  células/mL,  $80 \times 10^6$  células/mL y  $160 \times 10^6$  células/mL. Hemos visto que se produce una reducción de la viabilidad celular al aumentar la densidad celular, sin diferencia estadística ( $P=0.117$ ). Esta disminución se ha dado en los andamios estimulados, pensamos que este descenso puede ser debida a una inducción de la apoptosis por un aumento del consumo de oxígeno por parte de las células y la



disminución de la difusión de oxígeno y porque la propia estimulación provoca per se una reducción de la viabilidad.

La morfología de las células de las 3 densidades presentó diferencias a través de las 3 variables medidas circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ). La densidad de  $160 \times 10^6$  presentó morfologías de mayor madurez celular, igualmente, esta morfología de mayor madurez ha sido visualizada en los andamios cuando fueron estimulados tanto mecánica como eléctricamente. Posiblemente, esta madurez pueda deberse a que al aumentar la densidad, el intercambio de señales célula-célula pueda ser más fácil que cuando las células están más diluidas y no encuentran células en sus proximidades con las que interaccionar. Estos resultados no refrendan lo publicado en la literatura actual ya que según esta, a bajas densidades empleadas y se ha llegado a la regeneración muscular.

Al igual que en la bioimpresión, en los andamios fabricados por electrospinning, el número de células empleadas en los estudios publicados es muy variable (313–317). Hay estudios que emplean densidades entre  $10 \times 10^5$  células/andamio y  $50 \times 10^5$  células/andamio, mientras que otros usaron  $10 \times 10^6$  células/andamio (159) y  $20 \times 10^6$  células/andamio (292). Los que usaron densidades más bajas usaron la línea celular C2C12, mientras que el segundo grupo empleó la línea L6. La densidad que hemos usado ha sido basándonos en los resultados previos de nuestro grupo, variando la línea celular (159) con resultados bastante satisfactorios como veremos en los próximos epígrafes.

### **5.3. Análisis de los andamios de bioimpresión**

Desde que se concedió la primera patente estadounidense para la bioimpresión en 3D, los avances en la ingeniería de tejidos y de la medicina regenerativa se han incrementado exponencialmente con el objeto de llegar a la biofabricación de tejido y órganos complejos. Es esencial que las células bioimpresas puedan expandirse y que sean capaces de conservar la capacidad de recobrar la función biológica del tejido nativo, pero no en exceso hasta el punto de provocar hiperplasia o muerte celular (318).

El proceso de bioimpresión 3D debe ser relativamente suave y liviano con las células, ya que se requiere que permita la deposición celular sometiéndolas a diferentes procesos. Este requisito limita el número de técnicas que son adecuadas para la bioimpresión. Es

importante señalar que la tecnología de fabricación aditiva va a determinar los materiales que se pueden emplear mediante los requisitos de imprimibilidad de cada material (319).

Uno de los componentes importantes en todo este proceso es la biotinta ya que es la solución que permite la impresión de células vivas. Esta debe ser altamente biocompatible, mecánicamente estable después de la impresión, y debe proporcionar una alta fidelidad al diseño inicial durante la impresión, generalmente los biomateriales usados son hidrogeles. Estos tienen una gran capacidad para alojar y retener las células; además tienen otros beneficios como es la posibilidad de modificar su estructura química, junto a sus propiedades mecánicas y de biodegradación fácilmente ajustables (134).

La imprimibilidad de la biotinta depende de diferentes parámetros como la viscosidad de la solución, la tensión superficial de la biotinta, la capacidad de reticulación por sí misma y las propiedades de la superficie de la boquilla de la impresora. Si la formulación de la biotinta es muy viscosa, la presión necesaria para la extrusión será mayor y el flujo de la solución polimérica desde el pequeño orificio de la boquilla puede verse afectado. Pero esta propiedad de mayor viscosidad posiblemente dará lugar a estructuras 3D con mayor estabilidad que sí se consideran las formulaciones de solución de menor viscosidad (134).

La encapsulación de células vivas depende en gran medida de la hidrofilia y la viscosidad de la solución de la biotinta. Como se ha mencionado anteriormente, la biodegradación del biomaterial seleccionado debe ser proporcional a la regeneración del tejido de interés, de modo que una vez que las células crezcan y proliferen, puedan reemplazar eventualmente los biomateriales del andamio con su propia MEC regenerada. Además, los productos finales de la degradación no deben crear ninguna respuesta inmunológica en el huésped cuando se implante *in vivo*. Los materiales de las biotintas deben facilitar la adhesión, el crecimiento y la proliferación de las células en el interior de los andamios y debe ser conveniente modificar los grupos funcionales de los biomateriales para incluir y entregar diferentes señales bioquímicas o biomoléculas (134).

En nuestro trabajo hemos empleado 9 biotintas diferentes para la regeneración de músculo esquelético, de las cuales 6 se han usado variando la concentración de los biomateriales. Los hidrogeles denominados como colágeno, colágeno y Matrigel y MEC han mostrado unos **resultados elásticos y mecánicos** suficientes para soportar las

tensiones a las que pueden ser sometidos, así como también su adecuación a la frecuencia de 5Hz. El hidrogel de COL/Matrigel ha sido específicamente el que mayor módulo elástico ha presentado ante variaciones de deformación y frecuencias. Los otros dos hidrogeles (colágeno y MEC) presentaron valores similares, aunque en la capacidad de deformación es preferible el hidrogel de COL, pero ante el comportamiento elástico frente a variaciones de frecuencia prevalece el hidrogel de MEC.

Los **resultados histológicos** de las biotintas colágeno, colágeno y Matrigel, MEC y CA1 han puesto de manifiesto que la biotinta CA1 (de colágeno y alginato) presentaba una viabilidad más elevada que el resto ( $P=0.001$ ). La baja viabilidad del colágeno puede ser debida a la mezcla de la solución a bajo pH con las células a sembrar. No se pudo hacer una rectificación del pH antes de la mezcla de la solución con las células debido a que el método de reticulación del colágeno es mediante un cambio de pH y la gelificación se realizaría en un momento previo a la bioimpresión, dificultando el proceso. Así podemos ver como asciende ligeramente la viabilidad al mezclar el colágeno con el Matrigel. Este al tener pH neutro y al ser mezclado con el colágeno a pH 2, se reduce la acidez del colágeno y no es tan perjudicial para las células. Finalmente, si comparamos nuestros resultados de viabilidad de la biotinta MEC con los obtenidos por Hinton (284) en su estudio podemos ver que la viabilidad celular a las 2 horas de la impresión es casi del 100%. Vemos que existe gran diferencia respecto a nuestros resultados. Creemos que puede ser debido a que la línea celular usada, la densidad celular empleada y el tiempo transcurrido para comprobar la viabilidad (en nuestro estudio 4 semanas vs 2 horas del estudio de Hinton).

La **expresión de proteínas del citoesqueleto** de los miotubos fue bastante baja, siendo inexistente en algunos de los andamios fabricados mediante bioimpresión con las biotintas colágeno, colágeno y Matrigel, MEC y CA1. La mayor expresión de SMA pudo verse en zonas periféricas y filamentos delgados. Esto nos puede indicar que los andamios con estructura delgados y alargados podría favorecer la diferenciación de las células, mejor que una lámina de hidrogel que actuaría como un agente encapsulador de las células. Además pensamos que esta estructura laminar permite el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos y así la proliferación y diferenciación de las células.

Prestamos atención ahora a los andamios de colágeno y alginato, concretamente CA1 y CA2. En ellos hemos podido comprobar que un aumento de la concentración de los

biomateriales ha llevado a una mayor viabilidad celular. Sin embargo, los indicadores de maduración estudiados, circularidad, redondez y ratio del aspecto han desvelado que CA1 posee mayor maduración celular; en las 3 variables analizadas ( $P=0.000$ ).

Al profundizar nuestro estudio en la biotinta CA2, debido a la mayor estabilidad que confería a los andamios, hemos podido comprobar que en determinadas condiciones, la maduración era mayor, como fue con los andamios con una densidad celular de  $160 \times 10^6$  células/mL y estimulados mecánicamente y eléctricamente, como se indicó anteriormente. Esta maduración fue visualizada con mayor asiduidad en la siembra con las células C2C12, a pesar de la leve disminución de la viabilidad, sobre todo tras la estimulación mecánica. No obstante, tras el estudio mediante inmunofluorescencia, la morfología del citoesqueleto no fue la esperada. Se trataba de una elevada inmaduración de las células que se encontraban en suspensión sin apreciarse ningún alineamiento. Consideramos que la biotinta CA2 permitió la liberación de células que pudieran ser sedimentadas sobre los filamentos de PCL del andamio. Estas células sedimentadas sí mostraron direccionamiento celular, sin embargo, no es el objetivo de este estudio la sedimentación celular, sino el de las células que están en suspensión dentro de la biotinta. Esto nos hace ver que además de medir la morfología por el kit Live/Dead se deben de realizar otros ensayos para el estudio morfológico y expresión proteica. Los resultados nos indicaron que la biotinta CA2 no era una buena elección para la regeneración del músculo esquelético y no se realizó el estudio de funcionalidad.

El experimento de la variación de la concentración de colágeno y alginato con las biotintas, CA3, CA4, CA5 y CA6, en una semana demostró que no existe diferencia en la viabilidad ( $P=0.218$ ) en las variaciones de las concentraciones de colágeno y alginato con una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL. El estudio de la morfología del citoesqueleto determinó que no se formó tejido muscular a la semana de cultivo.

A pesar de que el estudio de Yang et al. (130) presentó buenos resultados; y la fácil traslacionalidad a la clínica que presentan el colágeno y el alginato ya que cumplen la normativa ISO 13485, los resultados no eran los esperados. Nuestros hallazgos cuestionan el empleo de ambos biomateriales para la regeneración de músculo esquelético. Yang et al. (130) mostraron resultados prometedores con la biotinta de colágeno y alginato en la regeneración de cartílago. La viabilidad de la biotinta fue casi del 100%, y las células

expresaban genes del tejido cartilaginoso. En contraposición nuestros resultados no son iguales de satisfactorios para la regeneración de músculo-esquelético.

La elección de estos materiales estuvo basada en la posibilidad de una fácil traslacionalidad a la clínica, inicialmente como ensayos clínicos y en el futuro como productos sanitarios. Morais et al. (320) basaron su estudio de alginato en la normativa ISO 10993 para la evaluación biológica de productos sanitarios, de hecho ya existen en comercialización diferentes dispositivos médicos basados en alginato sódico como son Tirita Pharmapore® IV Algi, Tirita Pharma-Algi®, ORTHOLINE ALGINATO y Goldenwell®. Incluso nuestro grupo de trabajo llevó a cabo el pasado año un ensayo clínico fase I/IIa (321) sobre el uso de este hidrogel en el sellado de fístulas anales con resultados prometedores en su eficacia.

Diversos estudios (287,288,320–323) sobre el uso del alginato en la creación de tejido muscular-esquelético han sido publicados. Ansari et al. (323) usaron un hidrogel de alginato oxidado al 2% y FGF para encapsular células madre mesenquimales gingivales (GMSC), demostraron el potencial de las células para su uso en la reparación muscular. Pudieron ver la expresión de genes típicos de los mioblastos y de los miotubos musculares, expresando resultados prometedores en la IT de músculo. Sin embargo, no estudiaron la morfología de los tejidos puesto que el hidrogel estaba diseñado como vehículo de entrega de células y factores de crecimiento.

Zhang et al. (322) estudiaron el efecto de la concentración de alginato en los andamios celularizados, demostrando que al aumentar la concentración de alginato, la viabilidad se reducía y la morfología celular era menos específica de osteocitos. Estos resultados difieren con los presentados por nuestro trabajo, en los que al aumentar la concentración y estimular eléctricamente los andamios, han mostrado un aumento en la viabilidad y una morfología más similar a la del músculo estriado.

Otro estudio (287) desarrolló hidrogeles de alginato con nanofibras de PLA celularizados con células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASC) para la bioimpresión de menisco. Vieron que esta biotinta permitió la proliferación celular en mayor abundancia que hidrogeles de alginato sin nanofibras. La densidad celular fue mayor en las zonas externas que en las internas. También se observó la presencia de

colágeno y proteoglicanos en las zonas que rodean las hASC, lo que indica la secreción de ECM y la diferenciación condrogénica.

Baniasadi et al. (288) prepararon hidrogeles de alginato oxidado con gelatina para la regeneración de músculo esquelético en diferentes concentraciones y estudiar la concentración ideal. Demostraron que se podía obtener una biotinta biocompatible y biodegradable sin emplear ningún agente reticulante externo y que las propiedades de los hidrogeles podían mejorarse cambiando el grado de oxidación de alginato y la relación de peso de alginato y gelatina. Concretamente una relación de peso de 30/70 y un grado de oxidación del 30% podrían proponerse como un candidato adecuado en cuanto a biocompatibilidad celular y propiedades mecánicas para su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos musculares.

El empleo de polímeros sintéticos se ha incrementado en los últimos años, sin embargo, estos materiales no promueven la adhesión o la proliferación celular como los polímeros naturales, son candidatos prometedores para mejorar las propiedades mecánicas, la imprimibilidad, la reticulación, etc. Por ello, suelen ser mezclados con polímeros naturales que proporcionen el microambiente deseado, imitando la ECM nativa, para la adhesión y proliferación celular y ofrecer una bioactividad inherente (134,319).

Otra biotinta muy usada es la dECM. Esto implica la descellularización de un tejido mediante la eliminación de las células preservando la ECM. Para ello, estos materiales se solubilizaron inicialmente en un tampón ácido, y se ajusta el pH para la suspensión celular. Esta formulación suele ser soluble a 10°C y se gelificaba a 37°C (134). Diversos estudios han demostrado la buena compatibilidad de esta biotinta para su empleo en la regeneración tisular con resultados prometedores tanto en regeneración cardíaca (324) como en regeneración de músculo esquelético (282). En este último estudio citado, demostraron la expresión génica de los genes típicos del músculo esquelético (Myf5, MyoG, MyoD y MHC). La viabilidad fue mayor al 90% y los miotubos presentaban una orientación alineada con capacidad contráctil cuando fueron estimulados con estimulación eléctrica. Además compararon los resultados de dECM con los que presentaron la biotinta de colágeno. Observaron que la expresión génica, la longitud, el índice de fusión, y el área de los miotubos era menor en comparación que con el hidrogel de dECM. Aunque las biotintas dECM ofrecen nuevas oportunidades para fabricar

construcciones específicas de tejidos, el proceso de descelularización requiere múltiples pasos, incluida la cuantificación precisa del ADN y los componentes de la ECM, lo que hace que sea un método costoso (319). Además habría que tener en cuenta el tejido a descelularizar y si fuera de un animal que podría existir rechazo por infección.

El colágeno ha sido usado frecuentemente en combinación con otros materiales debido a sus escasas propiedades mecánicas. Hashimoto et al. (325) usaron el colágeno como biomaterial para cubrir el fondo de los pocillos para la estimulación eléctrica de los cultivos, vieron que las células proliferan bajo pulsos eléctricos continuos inferiores a 8 V, y que la diferenciación se acelera con la amplitud de los pulsos eléctricos de 0.1 V. Pennisi realizó un estudio similar pero para analizar la estimulación mecánica cíclica uniaxial. Se pudo ver que la estimulación conllevó una diferenciación y orientación mejor que en los cultivos controles (299).

En otro estudio se fabricaron precursores musculares altamente densos y orientados a partir de colágeno tipo I. Se observaron miotubos multinucleados y solo se vio necrosis en focos internos de los andamios (326).

Serena et al. (327) describieron un novedoso enfoque de IT que puede mejorar la eficacia de la proliferación celular de células precursoras de músculo *in vitro*. Se basa en el cultivo celular en un andamio de colágeno, que proporciona un entorno más similar al tejido *in vivo*, y en la estimulación eléctrica que imita parte de la actividad neuronal. Demostraron que la estimulación eléctrica no afectó a la viabilidad celular y aumentó la expresión de MyoD y desmina. La biocompatibilidad *in vivo* de los andamios sembrados reveló la formación de nuevas miofibras tanto en el interior del andamio como en la interfaz andamio/músculo.

Langelaan et al. (306) usaron unos andamios de colágeno y Matrigel para determinar las condiciones ideales para electroestimular los cultivos de células precursoras de músculo esquelético. Demostraron que la maduración era mayor en progenitores musculares de cultivo primario que en C2C12, modificando la isoforma de la proteína MHC del músculo esquelético. Estos andamios dieron lugar a una maduración más rápida de los miotubos que en 2D, como se pusieron de manifiesto por la presencia temprana de estrías cruzadas en la  $\alpha$ -actina.



Powell et al. (328) emplearon andamios de colágeno para estudiar el efecto de la estimulación mecánica frente a andamios sin estimulación. A pesar de las buenas características morfológicas presentadas los andamios estimulados, los andamios controles presentaron una leve reducción en el diámetro de las fibras y de la superficie ocupada por las miofibras. Estos resultados están en la misma línea que hemos presentado aquí con nuestros andamios de colágeno y alginato (CA2) y de electrospinning que comentaremos más adelante.

En los últimos años están surgiendo nuevos hidrogeles más eficaces de colágeno. Uno de ellos es ColBioink de Regemat 3D, un hidrogel con una concentración de 80 mg/ml, mayor que la usada en este trabajo, 4 mg/ml. Esta biotinta tiene potenciales aplicaciones en tejido adiposo, vasos sanguíneos, tejido neural, cartílago, hueso, piel y córnea. Incluso hoy en día hay empresas que ya comercializan colágeno extraído de medusa, Jellagen® JellaGel. Next Generation Hydrogel, acorde con la normativa ISO 13485 de 2016 por la que se rigen los productos sanitarios. El uso de estos colágenos facilitaría la accesibilidad de nuestros andamios a la clínica que es el fin de esta investigación. A pesar de ello aún quedan muchas investigaciones por realizar.

### **5.3.1. Estudio de la viabilidad de la biotinta inyectada al inicio y al final del experimento**

Se midió la viabilidad de los andamios a las 24 horas y se comparó con la viabilidad al final del experimento, a las 2 semanas. Podemos ver como la viabilidad de las células L6 aumenta estadísticamente ( $P=0.000$ ) entre las 24 horas y las 2 semanas del  $83.49 \pm 5.62$  % al  $93.09 \pm 2.44$  %, respectivamente.

A continuación nos centramos en estudiar la viabilidad a las 24 horas y las 2 semanas para cada densidad celular estudiada. En las densidades de  $40 \times 10^6$  células/ml y  $80 \times 10^6$  células/ml, la viabilidad se incrementó significativamente a lo largo del experimento desde la siembra  $P=0.020$  y  $P=0.007$ , respectivamente, mientras que en la densidad de  $160 \times 10^6$  células/ml, fue estadísticamente igual ( $P=0.188$ ).

Por el contrario, las células C2C12 redujeron significativamente su viabilidad del  $94.37 \pm 2.74$  % al  $81.22 \pm 6.38$  % ( $P=0.031$ ), esto nos indica que el efecto de bioimpresión inicial que se produce a las 24 horas es liviano y poco a poco las células van muriendo en

la biotinta mientras son cultivadas. La reducción de la viabilidad visualizada en este trabajo en la línea C2C12, está en consonancia con los trabajos publicados con dicha línea celular (282).

Estos resultados nos indican las células L6 son más susceptibles que las células C2C12 a las fuerzas de cizallamiento generadas en el proceso de bioimpresión. Por el contrario, la línea L6 toleró mejor la biotinta CA2 que la línea C2C12 durante las 2 semanas de cultivo.

#### **5.4. Análisis de los andamios de electrospinning**

Los andamios de nanofibras han sido ampliamente estudiados en la MR. Estos andamios podrían recrear la arquitectura tisular y la ECM y servir además como reguladores de las respuestas celulares. A continuación, destacamos varios ejemplos sobre el uso de andamios de nanofibras para su uso en MR. Es sobradamente conocido que los materiales sintéticos como la PLGA o la PCL son biocompatibles pero tras su degradación, los productos generados inducen una respuesta inflamatoria debido al cambio de pH. En comparación, los materiales naturales, como el colágeno, la gelatina y el quitosano presentan propiedades biocompatibles superiores, aunque con propiedades mecánicas más débiles. Por lo tanto, se suelen desarrollar andamios híbridos combinando polímeros sintéticos y naturales o polímeros sintéticos/naturales y partículas inorgánicas. Las señales fisicoquímicas de los polímeros influyen en la diferenciación de los mioblastos, por ello es tan importante la elección de los biomateriales para la fabricación de los andamios (225).

Existen varios parámetros que pueden ajustarse durante el electrospinning. Así, Li et al. (329) demostraron que la velocidad de rotación del colector tenía un impacto considerable en la anisotropía de la malla de fibras resultante, que a su vez influía en las propiedades mecánicas de los andamios y en la orientación y reordenamiento de las nanofibras. También se ha publicado que la alineación de las fibras en estos andamios favorecen la reorganización del citoesqueleto en los mioblastos (290,294,295,330,331).

Diferentes materiales han sido usados para la fabricación de andamios mediante electrospinning. Algunos de ellos han sido el DegraPols® (300), la combinación de PLCL/PANi (297), el PVDF (330) o el PLGA (290). Todos estos trabajos presentaron

expresión de proteínas típicas del citoesqueleto y un aumento de la diferenciación miogénica, del número, de la longitud de los miotubos. Otras investigaciones (315,332) se han centrado en la incorporación de nanotubos de carbono a andamios de electrospinning, demostrando que estos nanotubos aumentan la proliferación y diferenciación de mioblastos esqueléticos.

En contraposición otros estudios han fabricado andamios híbridos usando materiales sintéticos y naturales como el PLGA y el colágeno (333) o el quitosán y el PVA (293). Estos estudios revelaron que la combinación mejoraba las propiedades fisicoquímicas y mecánicas, la biocompatibilidad, la biofuncionalidad de los materiales sintéticos y la hidrofilia proporcionando un microambiente favorable para la adhesión, proliferación celular y la diferenciación miogénica espontánea con menos respuestas inmunológicas cuando el andamio se implantó *in vivo*.

Otros estudios han estudiado el uso de andamios de nanofibras de dECM. Pese a las limitaciones que presentaban pudieron ver que promovían la proliferación y diferenciación de las células. La capacidad del sustrato de dECM para guiar la alineación de los miotubos fue similar a la observada en los polímeros sintéticos y en los híbridos mezclados con componentes de ECM (314).

Uno de los materiales sintéticos más explotado y usado es la PCL. De hecho es un polímero que está aprobado por la FDA (157). Este material se ha empleado generalmente en combinación con otros materiales como la PLGA (331), fibroína de seda y polianilina (334) o PEG-DA (335). Estos andamios promovían el crecimiento celular y mejoraban la diferenciación, formando miotubos alineados permitiendo el intercambio de nutrientes y propiedades mecánica. Nuestras investigaciones se han centrado en el uso de la PCL en combinación con elastina, colágeno y gelatina (159,292). La gelatina en combinación de nanofibras de carbono ha presentado mejores propiedades mecánicas y la expresión de miogenina, contribuyendo a la maduración de los mioblastos y a la formación de miotubos (302). La elastina aumentó la hidrofilia de los andamios de PCL y las propiedades mecánicas y redujo el tamaño de las fibras. Según los resultados biológicos, se demostró la creación *in vitro* de tejido muscular en fase inmadura. Se observó un aumento de la viabilidad en los controles estáticos frente a los andamios estimulados durante la última fase del cultivo *in vitro*. Entre los análisis *in vivo*, la actividad de los fibroblastos y la deposición de colágeno fueron similares en ambos grupos y la

neovascularización fue mayor en el grupo estimulado mecánicamente (292). Los andamios de PCL y gelatina tuvieron un carácter más hidrofílico. Los andamios con la combinación de la PCL con gelatina o colágeno presentaron un menor tamaño de fibra respecto a los andamios de PCL y, en consecuencia, una menor porosidad. Los tamaños de fibra más bajos son más adecuados para obtener una mayor superficie para la adhesión celular. La evaluación biológica reveló que la combinación de PCL y gelatina era mejor que la de colágeno (159).

Parte de esta investigación se ha centrado en la continuación de los estudios *in vitro* de los andamios de los 3 tipos de andamios de PCL y gelatina que se generaron en el trabajo de Perez-Puyana et al (159). El grado de alineamiento entre las fibras no ha supuesto un factor influyente en la viabilidad celular. No obstante, la morfología celular sí se ha visto afectada. Los andamios random presentaban valores de diferenciación mayores que el resto de andamios, seguidos de los andamios alineados y finalmente semialineados. La morfología celular reveló que los andamios alineados produjeron miotubos significativamente más estrechos que los andamios sin alineamiento y los andamios semialineados. En esta variable también puede interferir el grosor de las nanofibras de los andamios, viéndose incrementado el tamaño de los miotubos a la vez que crecía el tamaño de las nanofibras de los andamios, siendo los andamios que poseían un mayor grosor los andamios random (159). Drexler (336) estudio el efecto que podía tener el tamaño de las fibras sin encontrar resultados determinante. Por el contrario, nuestro pequeño estudio abre la puerta a esta posible teoría. Precisamente, los estudios previos revelaron que estos andamios alineados tenían las nanofibras más pequeñas de los 3 tipos de andamios, pero no el tamaño del poro más pequeño (159).

Estudiando el alineamiento de las fibras, nuestra investigación apoya la teoría descrita por trabajos anteriores sobre el ordenamiento de los miotubos en la dirección de las nanofibras (290,294,295,330,331). Los andamios alineados presentaron un mayor alineamiento de las fibras que los otros dos grupos, sin embargo, este mayor alineamiento fue significativo solamente entre los andamios alineados y random ( $P=0.015$ ). La maduración celular fue medida a partir de la morfología del núcleo, los andamios que presentaron mayor diferenciación fueron los alineados en la variable ratio del aspecto y redondez y los random en la circularidad, entre los 3 andamios se encontraron significancias en las 3 variables ( $P=0.000$ ). No se demostró que el ordenamiento

conllevara una influencia sobre la fusión nuclear y la densidad de actina en los miotubos, ya que es estadísticamente igual la fusión en los 3 andamios ( $P=0.301$ ).

Finalmente se estudió la actividad funcional de los 3 tipos de andamios. Los picos de luminiscencia más evidentes fueron visualizados en los andamios random y alineados cuando fueron expuestos a soluciones altas en  $K^+$ , siendo más acentuados en los andamios random mientras que los andamios semialineados presentaron leves oscilaciones. Los andamios random por consiguiente tuvieron una contracción ante el estímulo que puede dar a pensar en el buen carácter de estos andamios para la regeneración musculo-esquelética, quizás esto puede estar relacionado con lo visualizado en el estudio morfológico, donde hemos podido ver que los andamios random tenían una mayor maduración que el resto de andamios. No obstante, habría que tener en cuenta otros factores como el alineamiento de las fibras, el cual no es lo suficientemente elevado en este tipo de andamios.

Además medimos los niveles de calcio intracelular en el primer y segundo pico para conocer la fatiga celular que sufrían y el incremento de calcio tras los estímulos. Los andamios semialineados han presentado leves oscilaciones que han sido demostradas frente a los otros dos tipos de andamios a partir de las diferencias en las concentraciones y en las luminiscencias tras los dos estímulos. La única explicación viable que podemos encontrar para esta menor respuesta por parte de los andamios semialineados es el grado de fusión nuclear en las fibras, ya que ha sido el que ha presentado menor fusión nuclear de los 3 andamios. Esto solo se trata de una hipótesis que habría que continuar estudiando. También se ha podido ver que a pesar de la contracción que pueden sufrir todos los andamios, existe cierta fatiga mayor en los andamios random tras el primer estímulo. Esta fatiga puede ser mayor debido a la mayor contracción en el primer estímulo.

### **5.5. Análisis del impacto de la estimulación mecánica y eléctrica sobre los andamios**

Las fuerzas mecánicas desempeñan un papel importante en la transición del músculo esquelético del estado embrionario al maduro. La tensión pasiva continua (no relacionada con la inervación) aplicada al músculo esquelético por el crecimiento óseo durante la embriogénesis y el desarrollo neonatal ayuda a organizar los mioblastos mononucleados en proliferación en las miofibras multinucleadas orientadas en un músculo funcional, y

también influye en el peso y la longitud del músculo, así como en la organización de los miofilamentos. Se ha demostrado que el aumento de la carga de trabajo y el ejercicio modifican la morfología del músculo maduro aumentando tanto el número (hiperplasia) como el diámetro (hipertrofia) de las fibras musculares y regulando el crecimiento longitudinal y transversal de las mismas. Se ha demostrado que los patrones de estiramiento que se asemejan a las fases de desarrollo *in vivo* incrementan la expresión de genes miogénicos, aumentan el tamaño de las fibras, la multinucleación, mejorando la organización de los miofilamentos dentro de los andamios en el sentido de la estimulación y aumentando la función contráctil (298,299,301,326,337–340).

Diversos estudios han mostrado un patrón de estimulación mecánica en la cual los cultivos eran sometidos a una carga de tensión, la cual se fue incrementando en el tiempo. Además estas cargas iban acompañadas de un descanso (298,341,342). Los estudios que utilizan la estimulación mecánica para las estructuras musculares esqueléticas creadas con tejidos han demostrado mejoras en la diferenciación, maduración, alineación y contractilidad del músculo creado con tejidos (343). Este patrón puede asemejarse en parte al utilizado por nosotros en nuestra investigación, el cual se centró en aumentar la carga de tensión en las dos semanas del 5 al 10%, durante 55 min y 5 min de descanso.

Además de la estimulación mecánica, las señales eléctricas también influyen en la función del músculo esquelético. Se ha investigado la estimulación eléctrica para simular la actividad de las motoneuronas. Las membranas celulares contienen canales iónicos y el bombeo de iones genera un potencial eléctrico dentro de la membrana. Los campos eléctricos pueden alterar el nivel del contenido de calcio intracelular, y las señales se transducen a través de diferentes vías de señalización, como la vía calcio/calmodulina. Los impulsos eléctricos aplicados a los miofilamentos desde las neuronas motoras cercanas desempeñan un papel importante en la regulación y la función de los tejidos musculares (343). Se ha estudiado que la estimulación eléctrica tiene implicación en la maduración celular y que puede inducir la diferenciación miogénica, aumentando la expresión de genes típicos de las miofibras, la orientación las fibras en el sentido de la electroestimulación y la fuerza contráctil (78,294,302,306,315,327,344,345) incluso algunos trabajos han descrito la contracción tras la electroestimulación (346). Sin embargo, encontrar las condiciones eléctricas óptimas, incluidos el tipo de voltaje, la amplitud y la frecuencia de los pulsos, así como el modo de estimulación eléctrica, es extremadamente crítico para explorar la estimulación eléctrica en los músculos creados

por IT. Incluso algunos trabajos han descrito el efecto negativo reduciendo la expresión de factores miogénicos (305).

En este sentido, el patrón de la estimulación eléctrica lo hemos establecido similar a la estimulación mecánica, es decir, aumentando en el tiempo, sin superar los 8V que estableció Hashimoto como crítico (347). Durante la primera semana se dieron pulsos de 1V de 10 ms de anchura, coincidiendo con los momentos en que las mordazas del biorreactor estaban más próximas entre sí, simulando la contracción muscular. Durante la segunda semana, al aumentar el recorrido de las mordazas, se amplió la amplitud del pulso a 5V con la misma anchura.

Al igual que se comentó anteriormente, nuestros resultados han mostrado que en la biotinta CA1 frente a la biotinta CA2 cuando fueron estimuladas eléctricamente, la viabilidad fue estadísticamente mayor en CA2 con la línea celular L6 ( $P=0.000$ ), por lo que nuestra investigación centró su atención en esta biotinta. Estudiando el efecto de la viabilidad sobre el grupo control, sin encontrar un incremento estadísticamente significativo ( $P=0.075$ ) de la viabilidad celular asociado a la estimulación eléctrica, grupo control  $91.63 \pm 3.43$  %, grupo electroestimulado  $96.53 \pm 0.90$  %. Además, estudiando la morfología de ambas biotintas respecto a sus grupos controles, solamente pudimos ver diferencia en la morfología en la variable circularidad de CA1 ( $P=0.000$ ) y CA2 ( $P=0.000$ ), pudimos comprobar que las estimulaciones tenían un efecto directo hacia un mayor estiramiento reduciendo la morfología. Como se comentó anteriormente, nuestro estudio se centró en la biotinta CA2 debido a la mayor estabilidad que presentaba.

Estudiando por densidades el efecto de la estimulación mecánica y eléctrica, pudimos comprobar que dentro de la densidad de  $40 \times 10^6$  células/mL, no encontramos un efecto sobre la viabilidad respecto al grupo control ( $P=0.241$ ). En cuanto a la morfología se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos de estudio. A pesar de existir diferencias significativas, los valores de circularidad y redondez son bastante elevados ( $>0.77$ ) y la ratio del aspecto ( $<1.29$ ) suficientemente baja como para determinar que exista una maduración celular en estos andamios.

La densidad de  $80 \times 10^6$  células/mL presentó una reducción de la viabilidad en la estimulación mecánica frente al grupo control ( $P=0.019$ ). Sin embargo, las variables morfológicas estudiadas no mostraron que existiera una maduración en el grupo



estimulado mecánicamente. Estos resultados son contrarios a los publicados hasta la fecha, donde se demuestra que la estimulación mecánica puede tener efecto sobre la morfología y diferenciación celular (298,299,301,326,337–339). Creemos que esta contraposición frente a lo publicado se puede deber tanto a la biotinta empleada como a la línea celular.

Finalmente, la densidad  $160 \times 10^6$  células/mL, no mostró un efecto de la estimulación sobre la viabilidad ( $P=0.117$ ). Al contrario que vimos con las densidades anteriores, en este caso, sí pudimos comprobar que la estimulación promovió la maduración celular, acorde a lo publicado (298,299,301,326,337–340). Se pudo ver que la circularidad fue estadísticamente menor en los grupos electroestimulados ( $P=0.000$ ) y estimulados mecánicamente ( $P=0.000$ ) respecto al grupo control.

Enfrentando cada densidad celular dentro de cada estimulación, no se evidenció que ninguna en ninguna de las estimulaciones, existiera diferencia en la viabilidad ( $P>0.05$ ) entre cada densidad celular estudiada. No obstante, en el estudio de la morfología de los andamios estimulados eléctricamente, sí se corroboró que la densidad de  $160 \times 10^6$  células/mL tenían parámetros de mayor maduración frente al resto de estimulaciones. Igualmente pasó con la estimulación mecánicamente. Como se comentó anteriormente esto puede deberse al aumento de la densidad y a la mayor proximidad que puede haber entre las células para las interacciones entre sí.

Prestando atención ahora a la línea C2C12, la estimulación mecánica mostró una reducción de la viabilidad sin evidenciar diferencias significativas ( $P=0.341$ ). Sí mostraron diferencias en la circularidad ( $P=0.000$ ), la redondez ( $P=0.000$ ) y la ratio del aspecto ( $P=0.000$ ), indicando una mayor maduración en el grupo estimulado mecánicamente. Finalmente para la biotinta CA2, se vio que la línea C2C12 estimulada mecánicamente, tenía una morfología mayor maduración que la de la línea L6.

Los andamios de electrospinning no mostraron inferencia en la viabilidad entre los grupos estimulados ( $P=0.256$ ). La literatura actual no concluye claramente el efecto que puede tener la estimulación mecánica o eléctrica sobre esta variable (274), sin embargo, pudo apreciarse un leve ascenso en los grupos estimulados. La morfología a partir de las imágenes Live/Dead, determinaron que a pesar de los buenos valores de la morfología que presenta la estimulación mecánica, esta es levemente menos madura a la que muestra

la estimulación eléctrica o el grupo control. No obstante, estudios más profundos fueron realizados sobre las 2 estimulaciones y el grupo control.

El uso de la estimulación eléctrica fue medido de dos formas diferentes: a través de la capsula de biorreactor y a través de una placa fabricada mediante impresión 3D. El uso de esta placa no presentó diferencias ni con los andamios sin estimulación ( $P=0.971$ ), ni con los andamios estimulados eléctricamente con el biorreactor ( $P=0.339$ ). Sin embargo, al ser fabricada mediante impresión 3D, quedaron pequeños poros que aumentó considerablemente la contaminación de los cultivos en pleno experimento, por lo que se consideró la continuación de la estimulación eléctrica por medio de la cápsula del biorreactor.

La estimulación tanto mecánica como eléctrica incrementó considerablemente el diámetro de las fibras, esto se debe a que las señales de estimulación al recrear el ambiente celular del tejido promueve la maduración de las fibras. Este resultado refrenda lo expuesto por Powell et al. (298). Además el alineamiento se incrementó levemente en los andamios alineados cuando se estimularon mecánicamente, como detallaron Ahmed et al. (339) y Okano et al. (326). La electroestimulación por el contrario no lo favoreció. Este resultado es contrario a lo expuesto por Hosseini et al. (344). Consideramos que esto se pudo deber a que los andamios no tenían ninguna sujeción respecto a los electrodos por lo que pudieron sufrir movimientos mientras que estaban en cultivo y desordenar el alineamiento. Los experimentos futuros pueden centrarse la estimulación de los andamios random y semialineados para ver si las estimulaciones incrementan el direccionamiento de los miotubos.

La maduración de los núcleos desveló que la estimulación eléctrica favorece la maduración de los núcleos. En menor medida, la estimulación mecánica también hizo que la circularidad de los núcleos se viera reducida, sin reducir la redondez ni aumentar la ratio del aspecto. A pesar de esto, la estimulación mecánica aumentó considerablemente la densidad nuclear dentro de los miotubos, es decir, los miotubos de estos andamios estimulados presentaron una mayor cantidad de células que podrían aumentar la funcionalidad del tejido creado. Al igual que la densidad de actina se vio incrementada en los andamios estimulados mecánicamente. Todas estas evidencias pueden poner de manifiesto el efecto positivo que puede tener el uso de andamios alineados de PCL y gelatina estimulados mecánicamente aumentando la viabilidad, grosor, fusión nuclear, el

direccionamiento y la expresión de actina. Por el contrario, la estimulación eléctrica redujo la expresión de actina, puede ser que el estímulo que reciben sea excesivamente elevado para la tolerancia de los miotubos, esto podría seguir estudiándose en profundidad, debido a los buenos resultados descritos por diferentes grupos sobre la estimulación eléctrica (78,294,302,306,315,327,344,346).

Finalmente, los andamios fabricados por electrospinning estimulados fueron sometidos a un test de funcionalidad. Estudiamos la molaridad de calcio intracelular ante estímulos de cambio de concentraciones de  $K^+$ . Tras el primer estímulo, los andamios estimulados mecánicamente presentan un elevado pico de luminiscencia, siendo más bajo el de los andamios estimulados eléctricamente. El incremento de calcio en los andamios estimulados con cualquiera de las estimuciones tras el primer estímulo es bastante bajo en comparación a los andamios controles. Tras el segundo estímulo la luminiscencia es prácticamente inexistente en comparación con el grupo control. Así descubrimos que los andamios con alineamiento estimulados mecánicamente tenían una mayor fatiga ante el segundo estímulo. Consideramos que la mayor fatiga presentada por los andamios estimulados mecánicamente puede estar relacionada por el tiempo de recuperación de las células del estímulo previo, se dio un tercer estímulo tras 3 minutos y medio de reposos y se incrementó la luminiscencia considerablemente. Para el estudio de la contracción, puede ser más representativo de la realidad el estudio de la luminiscencia en lugar de la concentración intracelular teórica ya que pueden existir sesgos en el cálculo.

Visualizando la gráfica de luminiscencia, los andamios estimulados mecánicamente tienen un ascenso más elevado y sincronizado de una mejor forma que los andamios electroestimulados, e incluso mayor que los andamios alineados control. Esto nos indica que la contracción fue más pronunciada en los andamios estimulados mecánicamente sufriendo una mayor contracción ante estímulos.

Los andamios estimulados mecánicamente, al presentar una contracción evidente y una buena orientación de las fibras, fueron sometidos a estimulación eléctrica para conocer su respuesta ante este nuevo estímulo. Pudimos ver la buena respuesta que tuvieron los andamios ante los estímulos a bajas frecuencias. Sin embargo, a frecuencia de 2 Hz, la respuesta fue difusa. Esto se puede deber al tiempo de despolarización de las membranas celulares, puede que sea más lento que la velocidad a la que cambian los estímulos y no da tiempo a que el calcio entre dentro de las células. Los cultivos se

comprobaron que tras esto continuaban siendo funcionales, ya que presentaron respuesta a 1 Hz y a soluciones altas en K<sup>+</sup>. Todos estos hallazgos sobre la funcionalidad de los andamios alineados estimulados mecánicamente podrían estar relacionados con el aumento de la viabilidad, grosor, fusión nuclear, direccionamiento y la expresión de actina.

Ante lo expuesto, nuestros resultados apoyan las hipótesis que plantearon Candiani et al. (300) tras sus resultados a cerca de la acumulación de proteínas típicas de los miotubos. Determinaron que tras esta acumulación podría estar la hiperplasia celular debida al aumento de la proliferación celular antes de los procesos de diferenciación; y la hipertrofia celular con un aumento de la incorporación de núcleos en los miotubos o la regulación génica mediada por el estiramiento que conduce a un aumento de la síntesis de proteínas del citoesqueleto. A pesar de esto, la proliferación celular puede aumentar en las muestras estimuladas mecánicamente. Otros posibles mecanismos que podrían justificar la acumulación de proteínas del citoesqueleto en andamios estimulados mecánicamente son la liberación sostenida de factores de crecimiento inducida mecánicamente, que influye positivamente en la síntesis de proteínas, evita la atrofia de los miotubos y la mejora de la difusión entre las fibras del andamio asociada al estímulo, que permite el intercambio de catabolitos/anabolitos. En particular, los nutrientes que han penetrado en el andamio pueden ser empujados hacia su centro con la perturbación mecánica, contribuyendo así a una mejora general de las capacidades metabólicas celulares.

### **5.6. Estudio comparativo entre ambas técnicas de fabricación de andamios**

Estudiamos el efecto que tienen ambas técnicas sobre los cultivos de la línea C2C12. Los andamios de electrospinning presentaron una viabilidad significativamente mayor que los andamios bioimpresos. También se pudo comprobar la morfología era más elongada y madurada en los andamios de electrospinning que en los andamios bioimpresos, presentando una ratio del aspecto estadísticamente mayor y circularidad y redondez significativamente menores.

A continuación nos centramos en diferenciar ambas técnicas diferenciando con y sin estimulación mecánica. En los andamios sin estimulación, no se pudo evidenciar que

existiera diferencia en la viabilidad entre ambas técnicas ( $P=0.423$ ), mientras que la morfología volvió a indicar que el electrospinning promueve la maduración mejor que la bioimpresión de colágeno y alginato, a través de las 3 variables morfológicas estudiadas circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ).

En el caso de los andamios estimulados mecánicamente, demostramos que en mientras que en los andamios bioimpresos se reduce la viabilidad respecto a los andamios controles, en los andamios de electrospinning se incrementa, siendo estadísticamente mayor en los andamios fabricados mediante electrospinning que en los andamios de bioimpresión ( $P=0.013$ ). En ambos casos, las variables morfológicas determinaron que la estimulación mecánica promueve la maduración y elongación de las células. No obstante, las variables morfológicas estudiadas circularidad ( $P=0.000$ ), redondez ( $P=0.000$ ) y ratio del aspecto ( $P=0.000$ ), mostraron que la morfología en los andamios de electrospinning es estadísticamente más madurada que la de los andamios de bioimpresión.

Además comparamos el efecto de la estimulación mecánica tanto en los andamios bioimpresos como en los andamios fabricados mediante electrospinning. Mientras que la estimulación mecánica reducía la viabilidad en los andamios de bioimpresión, en los andamios de electrospinning se incrementó la viabilidad. La morfología determinó que los andamios de electrospinning con la estimulación mecánica promueven una mayor maduración que los andamios de bioimpresión.

Consideramos que estos resultados pueden deberse a la biotinta utilizada que tiene un efecto encapsulador, sin permitir a las células presentar la morfología que deberían mostrar y no recrea como debería las propiedades de la ECM, mientras que los andamios de electrospinning son porosos. Esta porosidad puede además facilitar el intercambio de nutrientes y metabolitos respecto a la biotinta empleada en este experimento. Como vimos anteriormente, este test no es determinante y se realizaron estudios en más profundidad sobre la morfología del citoesqueleto de los andamios.

## 5.7. Limitaciones y dificultades

La principal dificultad encontrada en este trabajo estuvo en la manipulación de los andamios, concretamente los alineados, debido a su extrema fragilidad, ya que se rompían

con facilidad. Además hubo problemas en la fijación con PFA de los andamios bioimpresos debido a su degradabilidad.

Creemos que el empleo de otros anticuerpos para el estudio de la expresión de otras proteínas de miotubos habría aportado mayor valor al presente trabajo. Se podría estudiar en el futuro medir otras proteínas como podrían ser la MHC, MyoD o la miogenina.

El tamaño muestral al ser un trabajo experimental se ha hecho al menos por triplicado cada experimento, que han bastado para tener diferencias significativas en algunas de las variables de estudio. No obstante, se debería continuar en la línea del estudio de andamios fabricados por electrospinning para dar paso a futuras líneas preclínicas.

La utilización de la estimulación eléctrica en biorreactor ha podido sesgar su efecto sobre andamios de electrospinning. Al carecer de un soporte de sujeción los andamios pudieron moverse durante el experimento incrementando la aleatoriedad del direccionamiento de los miotubos.

El uso de mioblastos C2C12 y L6 podría estar limitado por su bajo potencial de diferenciación a pesar de que estas células precursoras se cultivan fácilmente (314). Por lo tanto, los resultados del estudio podrían parecer más sólidos si se utilizara un tipo de célula diferente, como las células satélite primarias o células de origen humano para ir allanando el paso a los futuros pasos, el traslado a la clínica.

También el método de obtención de imágenes y el análisis mediante un software de procesamiento de las mismas pueden dar lugar a sesgos del observador. Si bien la obtención y el análisis de imágenes se intentaron de forma sistemática para limitar el sesgo, este es inherente a este tipo de técnicas.

Los andamios alineados presentaron un grosor de nanofibras menor al resto de andamios, esto ha podido conllevar a unos miotubos más finos que el resto de andamios y podría verse como un factor limitante. A pesar del ordenamiento, quizás una concentración mayor de biomateriales podría derivar en un aumento del grosor de las nanofibras y por consiguiente un mayor grosor de los miotubos que afectará a la densidad nuclear y a la funcionalidad de los mismos.

## 5.8. Perspectivas de futuro

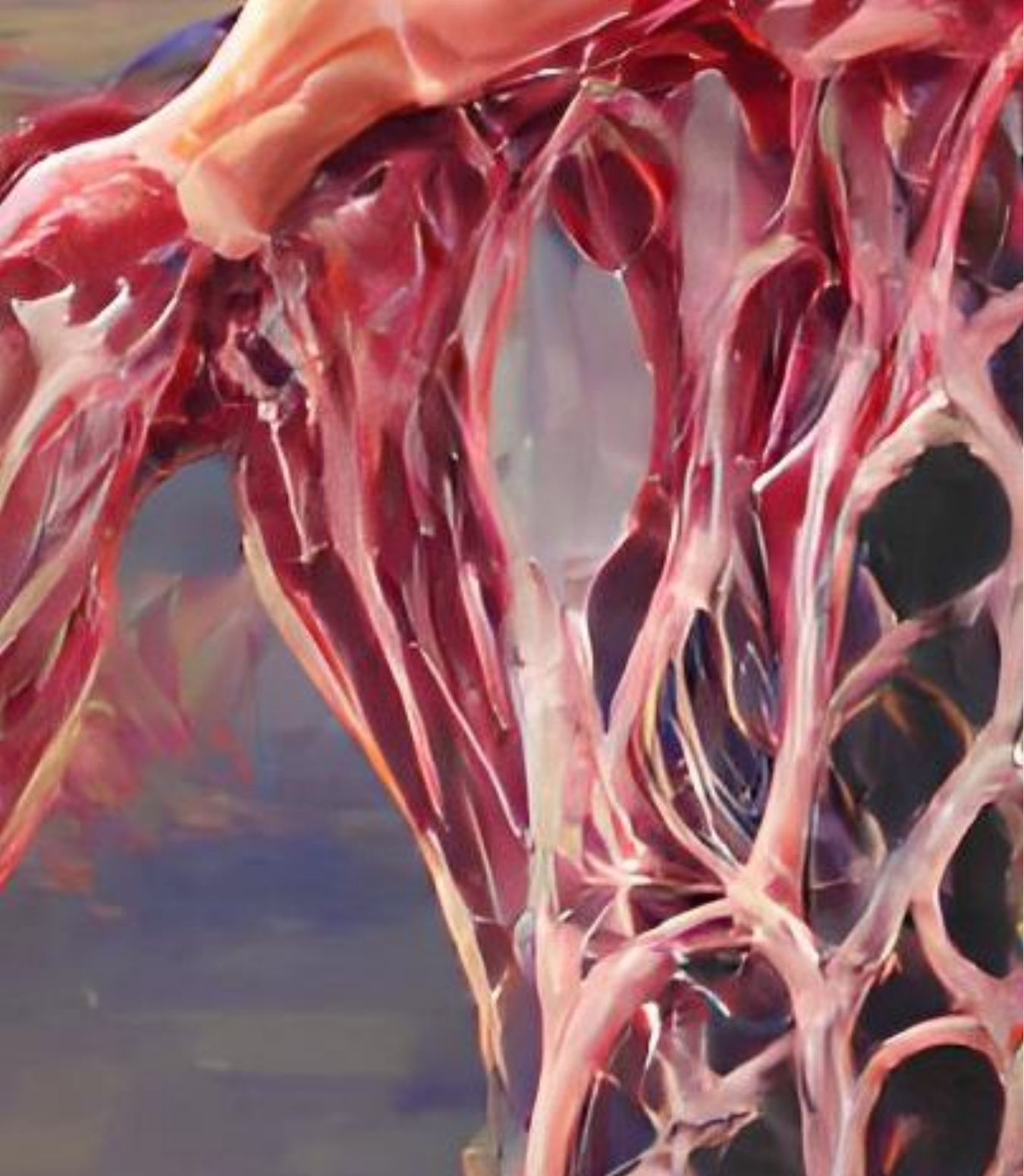
En el futuro, se debería tener en cuenta la estimulación tanto mecánica como eléctrica de los andamios random y semialineados. Estos andamios presentaron mejores propiedades mecánicas que los andamios alineados y las estimulaciones podrían tener un efecto de orientación de los miotubos creados. Igualmente la estimulación combinada podría ser carácter de estudio para estudiar si beneficiaría el desarrollo del músculo esquelético, como estudios previos han reportado la posible influencia de la estimulación electromecánica sobre la diferenciación en cultivos 3D (294,300).

Al tratarse de un tejido creado *ex vivo*, en el futuro se podría estudiar el comportamiento *in vivo* a través de un ensayo preclínico. De esta manera se conocería si el tejido funcional creado puede llegar a reparar el tejido a reparar o por el contrario se vería migración celular como trabajos previos del grupo (292). Esto nos ayudaría a saber si el tejido creado *ex vivo* serviría o si simplemente la incorporación de un andamio sería suficiente. También sería objeto de estudio si el tejido creado debería de ser estimulado de alguna manera tras su implante en el modelo como estudios previos describieron (348).

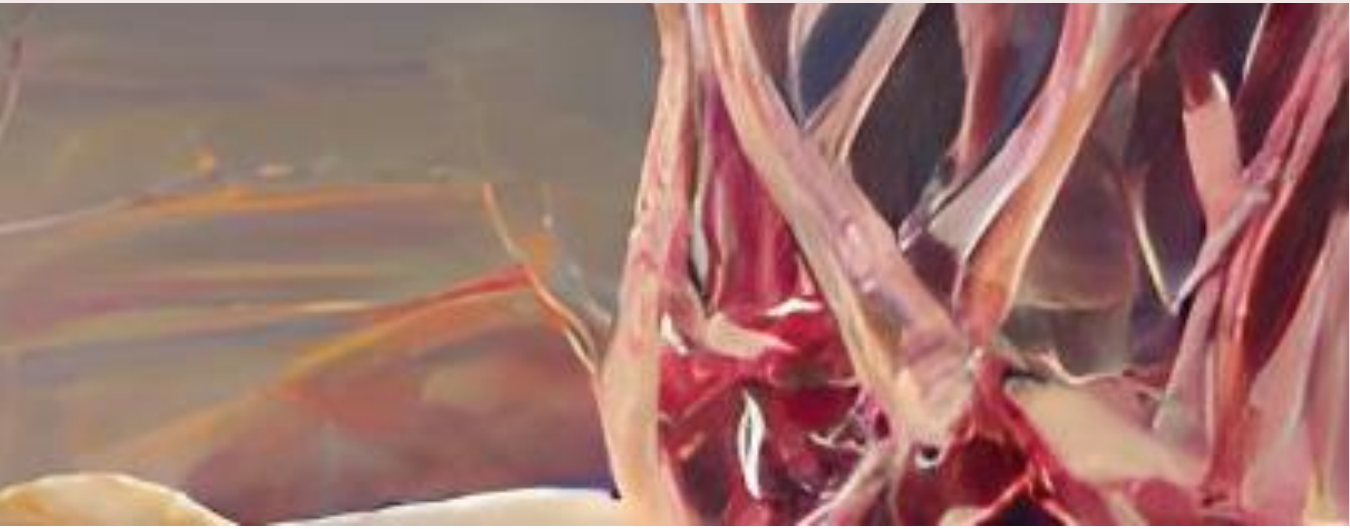
Finalmente, referente al tiempo de cultivo, sería interesante estudiar el efecto en periodos más cortos a las dos semanas de estimulación como hicieron Candiani et al. (300).







# CONCLUSIONES



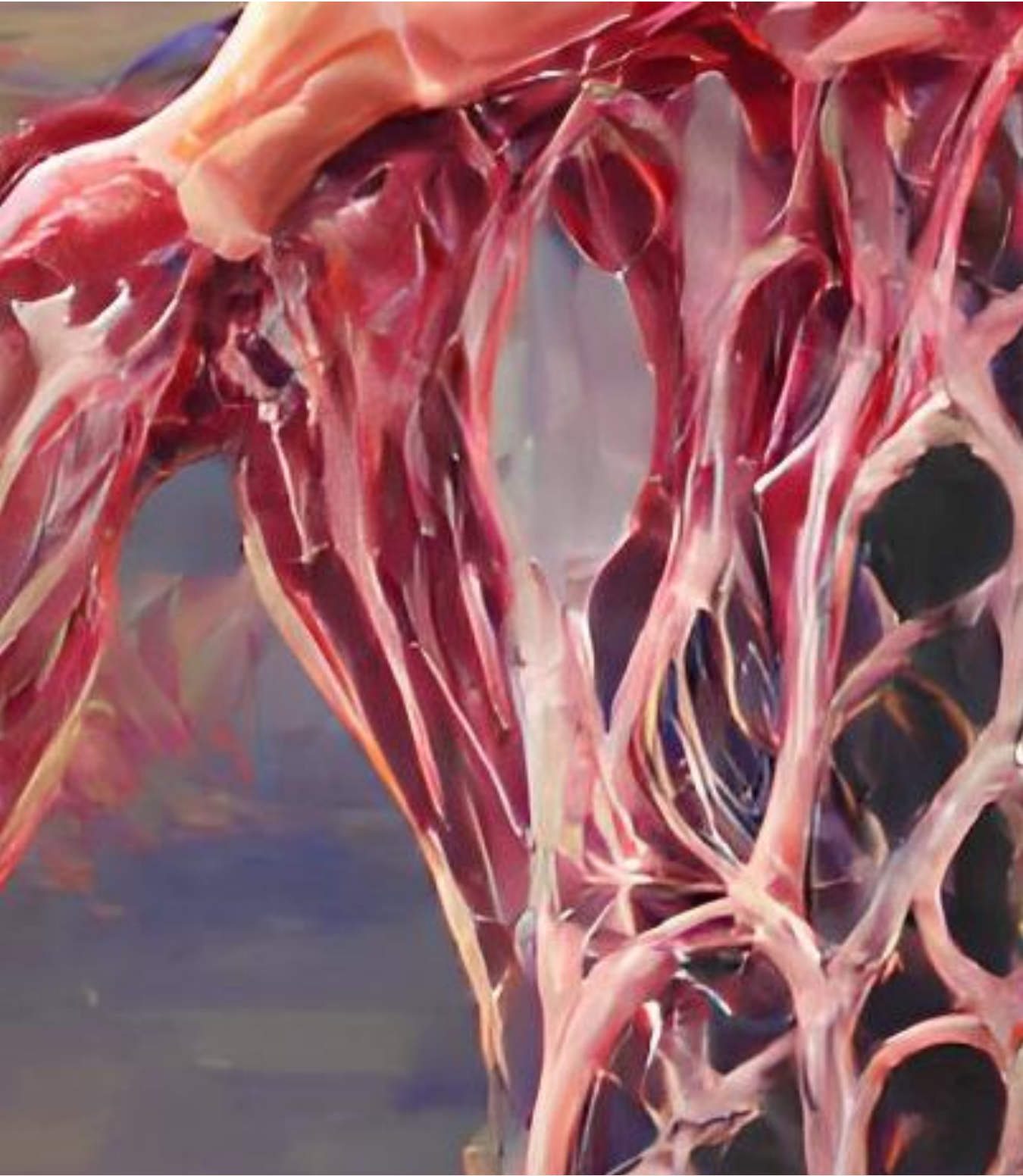
# CAPÍTULO 6



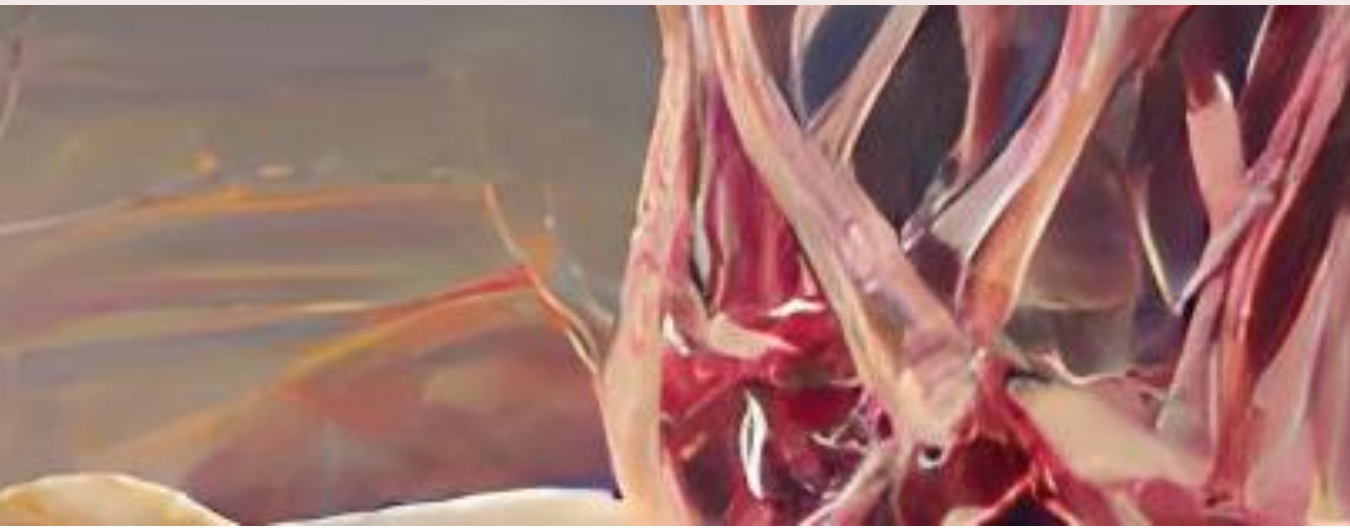
- Conseguimos regenerar tejido músculo esquelético utilizando andamios creados mediante bioimpresión y electrospinning y cultivados en un biorreactor con estimulación eléctrica y mecánica.
- Se ha determinado que la línea C2C12 es la línea más adecuada para la experimentación en ingeniería tisular de músculo esquelético.
- Se ha conseguido establecer un tiempo de cultivo, siendo este de dos semanas.
- Se ha definido que la cantidad de células en una biotinta de colágeno y alginato en bioimpresión debe de ser de una densidad  $160 \times 10^6$  células/mL. En los andamios fabricados mediante electrospinning, se ha demostrado que una siembra de  $10 \times 10^6$  células/andamio puede dar resultados satisfactorios.
- El andamio de PCL junto con gelatina fabricados con electrospinning fue el ideal. Así como su estimulación mecánica frente a otros estímulos.
- Hemos comprobado que estos andamios cumplen condiciones ideales de regeneración como mayor grosor de fibras, alineamiento, fusión nuclear, diferenciación nuclear y funcionalidad.







## REFERENCIAS



# CAPÍTULO 7





1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96:183–95.
2. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10.
3. Rosero DH, Salazar L, Tovar MA. Músculo esquelético y lesión por reperfusión. Ultraestructura, alteración y regeneración: Revisión sistemática. *Rev Médica Risaralda* 2015;21:58–68.
4. Calero Castro FJ, de la Portilla F. Capítulo 24: Tema 24. Ingeniería de tejidos para el sistema músculo esquelético (I). Creación tejido muscular. Estado actual y aplicaciones clínicas. In: *Nociones sobre Ingeniería Tisular y medicina regenerativa.* 2020. p. 239–52.
5. Chal J, Pourquoié O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Dev.* 2017;144:2104–22.
6. Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. 2009; 266:372-89
7. Sambasivan R, Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 1;18:870–82.
8. Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet.* 2003;4:497–507.
9. Schultz E. Satellite Cell Proliferative Compartments in Growing Skeletal Muscles. *Dev Biol.* 1996;175:84–94.
10. Davis TA, Fiorotto ML. Regulation of muscle growth in neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009;12: 78-85.
11. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000;23:617–26.
12. Pellettieri J, Alvarado AS. Cell Turnover and Adult Tissue Homeostasis: From Humans to Planarians. *Annu Rev Genet.* 2007;41:83–105.

13. CHARGÉ SBP, RUDNICKI MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev.* 2004;8:209–38.
14. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2).
15. Kennedy KAM, Porter T, Mehta V, Ryan SD, Price F, Peshdary V, et al. Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative  $\beta$ -catenin. *BMC Biol.* 2009;7:67.
16. Ryan T, Liu J, Chu A, Wang L, Blais A, Skerjanc IS. Retinoic Acid Enhances Skeletal Myogenesis in Human Embryonic Stem Cells by Expanding the Premyogenic Progenitor Population. *Stem Cell Rev Reports.* 2012;8:482–93.
17. Kim JH, Ren Y, Ng WP, Li S, Son S, Kee Y-S, et al. Mechanical Tension Drives Cell Membrane Fusion. *Dev Cell.* 2015;32:561–73.
18. Abmayr SM, Pavlath GK. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development.* 2012;139:641–56.
19. Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche Regulation of Muscle Satellite Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell.* 2008;2:22–31.
20. Bentzinger Cf, von Maltzahn J, Rudnicki MA. Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:27.
21. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:377–406.
22. Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2005;172:91–102.
23. Hammond CL, Hinitz Y, Osborn DPS, Minchin JEN, Tettamanti G, Hughes SM. Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev Biol.* 2007;302:504–21.

24. Kacperczyk A, Jagla T, Daczewska M. Pax-3 and Pax-7 Label Muscle Progenitor Cells During Myotomal Myogenesis in *Coregonus lavaretus* (Teleostei: Coregonidae). *Anat Histol Embryol*. 2009;38:411–8.
25. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev*. 2004;18:1088–105.
26. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 2005;435:948–53.
27. Hutcheson DA, Zhao J, Merrell A, Haldar M, Kardon G. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for  $\beta$ -catenin. *Genes Dev*. 2009;23:997–1013.
28. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell*. 2000 102:777–86.
29. Buckingham M, Rigby PWJ. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Dev Cell*. 2014;28:225–38.
30. Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE, Rudnicki MA. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;72:10–8.
31. Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1986;47:649–56.
32. Parker SB, Gregor E, Pumin Z, Alan R, T. SA, Allan B, et al. p53-Independent Expression of p21<sup>Cip1</sup> in Muscle and Other Terminally Differentiating Cells. *Science*. 1995;267:1024–7.
33. Orna H, G. NB, B. SD, X. SS, James R, J. HG, et al. Correlation of Terminal Cell Cycle Arrest of Skeletal Muscle with Induction of p21 by MyoD. *Science*. 1995;267:1018–21.
34. Mesires NT, Doumit ME. Satellite cell proliferation and differentiation during

- postnatal growth of porcine skeletal muscle. *Am J Physiol Physiol.* 2002;282:899–906.
35. Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development.* 1991;111:1097–107.
  36. Buckingham M. Making muscle in mammals. *Trends Genet.* 1992;8:144–9.
  37. Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, et al. *Mrf4* determines skeletal muscle identity in *Myf5:Myod* double-mutant mice. *Nature.* 2004;431:466–71.
  38. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 1993;364:501–6.
  39. Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, Brenner HR, Eftimie R. The *MyoD* family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse *Myf-5* cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:539–44.
  40. Münsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 1995;9:2911–22.
  41. Rios AC, Serralbo O, Salgado D, Marcelle C. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature.* 2011;473:532–5.
  42. van der Velden JLJ, Langen RCJ, Kelders MCJM, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW, Schols AMWJ. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am J Physiol Physiol.* 2006;290:453–62.
  43. Rudnicki MA, Williams BO. Wnt signaling in bone and muscle. *Bone.* 2015;80:60–6.
  44. von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol.* 2012;22:602–9.

45. Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, et al. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development*. 1998;125:4155–62.
46. Borello U, Berarducci B, Murphy P, Bajard L, Buffa V, Piccolo S, et al. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development*. 2006 Sep 15;133:3723–32.
47. Brunelli S, Relaix F, Baesso S, Buckingham M, Cossu G. Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Dev Biol*. 2007 Apr 15;304:604–14.
48. Anderson C, Williams VC, Moyon B, Daubas P, Tajbakhsh S, Buckingham ME, et al. Sonic hedgehog acts cell-autonomously on muscle precursor cells to generate limb muscle diversity. *Genes Dev*. 2012;26:2103–17.
49. Voronova A, Coyne E, Al Madhoun A, Fair J V, Bosiljcic N, St-Louis C, et al. Hedgehog Signaling Regulates MyoD Expression and Activity. *J Biol Chem*. 2013;288:4389–404.
50. Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T. Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis. *J Biol Chem*. 1999;274:7238–44.
51. Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:279–85.
52. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:251–63.
53. Sieiro D, Rios AC, Hirst CE, Marcelle C. Cytoplasmic NOTCH and membrane-derived  $\beta$ -catenin link cell fate choice to epithelial-mesenchymal transition during myogenesis. Bronner ME, editor. *Elife*. 2016;5:14847.
54. Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, et al. p38 and

- extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol.* 2000;20:3951–64.
55. Semsarian C, Wu M-J, Ju Y-K, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG, et al. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature.* 1999;400:576–81.
  56. Gu J-M, Wang DJ, Peterson JM, Shintaku J, Liyanarachchi S, Coppola V, et al. An NF- $\kappa$ B - EphrinA5-Dependent Communication between NG2<sup>+</sup> Interstitial Cells and Myoblasts Promotes Muscle Growth in Neonates. *Dev Cell.* 2016 Jan 25;36:215–24.
  57. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:4361–71.
  58. Andermarcher E, Surani MA, Gherardi E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev Genet.* 1996;18:254–66.
  59. Milasincic DJ, Calera MR, Farmer SR, Pilch PF. Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biol.* 1996;16:5964–73.
  60. Hikida RS. Aging changes in satellite cells and their functions. *Curr Aging Sci.* 2011 Dec;4:279–97.
  61. Hoppeler H, Lüthi P, Claassen H, Weibel ER, Howald H. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 1973;344:217–32.
  62. Thomas GD. Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Front Physiol.* 2013;4:381.
  63. Haug M, Reischl B, Prölß G, Pollmann C, Buckert T, Keidel C, et al. The MyoRobot: A novel automated biomechatronics system to assess voltage/Ca<sup>2+</sup> biosensors and active/passive biomechanics in muscle and biomaterials. *Biosens*

- Bioelectron. 2018;102:589–99.
64. Ottenheijm CAC, Granzier H. Lifting the Nebula: Novel Insights into Skeletal Muscle Contractility. *Physiology*. 2010;25:304–10.
  65. Monroy JA, Powers KL, Gilmore LA, Uyeno TA, Lindstedt SL, Nishikawa KC. What Is the Role of Titin in Active Muscle? *Exerc Sport Sci Rev*. 2012;40: 73-8.
  66. Jayasinghe ID, Launikonis BS. Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *J Cell Sci*. 2013;126:4048–58.
  67. Kerr J, Ward C, Bloch R. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca<sup>2+</sup> homeostasis in skeletal muscle. *Front Physiol*. 2014;5:89.
  68. Dahl R, Larsen S, Dohlmann TL, Qvortrup K, Helge JW, Dela F, et al. Three-dimensional reconstruction of the human skeletal muscle mitochondrial network as a tool to assess mitochondrial content and structural organization. *Acta Physiol*. 2015;213:145–55.
  69. Mahmoud AM, Brown MD, Phillips SA, Haus JM. Skeletal Muscle Vascular Function: A Counterbalance of Insulin Action. *Microcirculation*. 2015;22:327–47.
  70. Gustafsson T. Vascular remodelling in human skeletal muscle. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:1628–32.
  71. Stromer MH, Bendayan M. Arrangement of desmin intermediate filaments in smooth muscle cells as shown by high-resolution immunocytochemistry. *Cell Motil*. 1988;11:117–25.
  72. Gabella G. Structural apparatus for force transmission in smooth muscles. *Physiol Rev*. 1984;64:455–77.
  73. Makuch R, Birukov K, Shirinsky V, Dabrowska R. Functional interrelationship between calponin and caldesmon. *Biochem J*. 1991;280:33–8.
  74. Sellers JR. Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin. *Curr Opin Cell Biol*. 1991;3:98–104.
  75. Persidis A. Tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 1999;17:508–10.



76. Chandra PK, Soker S, Atala A. Chapter 1 - Tissue engineering: current status and future perspectives. In: Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Atala ABT-P of TE (Fifth E, editors. Academic Press; 2020. p. 1–35.
77. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920–6.
78. Bajaj P, Reddy Jr. B, Millet L, Wei C, Zorlutuna P, Bao G, et al. Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. *Integr Biol*. 2011;3:897–909.
79. MIGONNEY V. Chapter 2. Definitions. In: Biomaterials. 1st ed. ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 11–26.
80. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of Tissue Engineering. 2000.
81. Gu X, Wang F, Li X. Chapter 1 Overview of Scaffold Reinforcement for Tissue Repair. In: Li X, editor. Tissue Repair Reinforced Scaffolds. 2017. p. 1–24.
82. Murugan R, Ramakrishna S. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. *Tissue Eng*. 2007;13:1845–66.
83. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011.
84. Li X, Wang L, Fan Y, Feng Q, Cui F-Z, Watari F. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013;101A:2424–35.
85. Li X, Feng Q, Wang W, Cui F. Chemical characteristics and cytocompatibility of collagen-based scaffold reinforced by chitin fibers for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2006;77B:219–26.
86. Li X, Feng Q, Cui F. In vitro degradation of porous nano-hydroxyapatite/collagen/PLLA scaffold reinforced by chitin fibres. *Mater Sci Eng C*. 2006;26:716–20.
87. Calero Castro FJ. Capítulo 11: El andamio en Ingeniería de Tejidos. Conceptos y características. Métodos de construcción. Bioimpresión 3D. In: de la Portilla F, editor. Nociones sobre Ingeniería Tisular y medicina regenerativa. 2020. p. 105–18.

88. Starborg, Tobias; Lu, Yinhui; Meadows, Roger S.; Kadler, Karl E.; Holmes DF. Electron microscopy in cell-matrix research. *methods*. 2008;45:53–68.
89. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:526–32.
90. Sands RW, Mooney DJ. Polymers to direct cell fate by controlling the microenvironment. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:448–53.
91. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol*. 2010;29:690–700.
92. Allen RA, Seltz LM, Jiang H, Kasick RT, Sellaro TL, Badylak SF, et al. Adrenal Extracellular Matrix Scaffolds Support Adrenocortical Cell Proliferation and Function In Vitro. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun 9;16:3363–74.
93. Sellaro TL, Ranade A, Faulk DM, McCabe GP, Dorko K, Badylak SF, et al. Maintenance of Human Hepatocyte Function In Vitro by Liver-Derived Extracellular Matrix Gels. *Tissue Eng Part A*. 2009;16:1075–82.
94. Attiah DG, Kopher RA, Desai TA. Characterization of PC12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14:1005–9.
95. Xu CC, Chan RW, Weinberger DG, Efuno G, Pawlowski KS. Controlled release of hepatocyte growth factor from a bovine acellular scaffold for vocal fold reconstruction. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2010;93:1335–47.
96. Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials*. 2010;31:7475–84.
97. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32:3233–43.
98. Tiwari; A, Ramalingam; M, Kobayashi; H, Turner APF. *Biomedical Materials and Diagnostic Devices*. 2012.

99. G. CB, R. FM, X. SF, B. RA, Anthony A. Phenotypic and Cytogenetic Characterization of Human Bladder Urothelia Expanded in Vitro. *J Urol.* 1994;152:665–70.
100. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 2001;414:118–21.
101. YAFFE D, SAXEL ORA. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270:725–7.
102. Herbst A, Aiken JM, McKenzie D. Replication of prions in differentiated muscle cells. *Prion.* 2014;8:166–8.
103. Yu H, Chong SK, Hassanbhai AM, Teng Y, Balachander G, Muthukumaran P, et al. Principles of bioreactor design for tissue engineering. *Principles of Tissue Engineering.* INC; 2020. 179–203 p.
104. Cohen J. Biomaterials in orthopedic surgery. *Am J Surg.* 1967;114:31–41.
105. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17:967–78.
106. Patel N, Gohil P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *Int J Emerg Technol Adv Eng.* 2012;2:91–101.
107. Williams European Society for Biomaterials., DF. Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. In Amsterdam; New York: Elsevier; 1987.
108. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2020;108:1617–33.
109. MIGONNEY V. Chapter 1: History of biomaterials. In: *Biomaterials.* 1st ed. ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 1–10.
110. Bhaskar B, Nagarjuna V. Biomaterials, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: A Brief Outline BT - Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches. In: Bhaskar B, Sreenivasa Rao P, Kasoju N, Nagarjuna V, Baadhe RR, editors. Singapore: Springer Singapore; 2021. p. 3–17.

111. Fischer LP, Planchamp W, Fischer B, CHAUVin F. Les premières prothèses articulaires de la hanche chez l'homme (1890-1960). *Hist Sci Med.* 2000;34:57–70.
112. Bhaskar; B, Nagarjuna V. Biomaterials, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: A Brief Outline. In: *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2021. p. 3–18.
113. Mythili Prakasam, Laura Madalina, Roxana Mioara Piticescu AL. Fabrication Methodologies of Biomimetic and Bioactive Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications.* Intech. 2017;1:13.
114. Ewais AMMA and EMM. Bioceramic Scaffolds. *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications.* Vol. 3, Intech. 2016. p 49–74.
115. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008;17:467–79.
116. Camacho P, Busari H, Seims KB, Tolbert JW, Chow LW. Materials as Bioinks and Bioink Design BT - 3D Bioprinting in Medicine: Technologies, Bioinks, and Applications. In: Guvendiren M, editor. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 67–100.
117. Migonney V. Chapter 4: Biocompatibility and Norms. *Biomaterials.* 1st ed. ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 83-100.
118. Edwards SL, Mitchell W, Matthews JB, Ingham E, Russell SJ. Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *Autex Res J.* 2004;4:86–94.
119. Seymour RB, Kauffman GB. The rise and fall of celluloid. *J Chem Educ.* 1992;69:311.
120. Nam K, Kishida A. Chapter 1: Application of the Collagen as Biomaterials. In: *Biomedical materials and diagnostic devices.* 2012. p. 3–18.

121. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatr Res.* 2008;63:492–6.
122. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater.* 2019;31.
123. Friess W. Collagen - Biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;45:113–36.
124. Fujioka K, Maeda M, Hojo T, Sano A. Protein release from collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;31:247–66.
125. Nam K, Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer–collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent. *Acta Biomater.* 2010;6:403–8.
126. Ahn H-J, Khalmuratova R, Park SA, Chung E-J, Shin H-W, Kwon SK. Serial Analysis of Tracheal Restenosis After 3D-Printed Scaffold Implantation: Recruited Inflammatory Cells and Associated Tissue Changes. *Tissue Eng Regen Med.* 2017 Oct;14:631–9. A
127. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006; 17:356-60.
128. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2012;8:3191–200.
129. Mori H, Shimizu K, Hara M. Dynamic viscoelastic properties of collagen gels with high mechanical strength. *Mater Sci Eng C.* 2013;33:3230–6.
130. Yang X, Lu Z, Wu H, Li W, Zheng L, Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C.* 2018;83:195–201.
131. Kim JE, Kim SH, Jung Y. Current status of three-dimensional printing inks for soft

- tissue regeneration. *Tissue Eng Regen Med.* 2016;13:636–46.
132. Ko H-F, Sfeir C, Kumta PN. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 201;368:1981–97.
  133. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012;37:106–26.
  134. Gopinathan J, Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater Res.* 2018;22:1–15.
  135. Khalid Zia, Zuber M, Muhammad A. *Algae Based Polymers, Blends, and Composites.* 2017.
  136. Rastogi P, Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication.* 2019;11.
  137. Montanucci P, Terenzi S, Santi C, Pennoni I, Bini V, Pescara T, et al. Insights in Behavior of Variably Formulated Alginate-Based Microcapsules for Cell Transplantation. Fernandes JC, editor. *Biomed Res Int.* 2015;2015:
  138. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28:621–30.
  139. Calero Castro FJ, Yuste Herranz Y, Pereira S, Garvín MD, López García MÁ, Padillo FJ, et al. Proof of concept, design and manufacture via 3D printing of a mesh with bactericidal capacity: behaviour in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019; 13:1955-1964.
  140. Bouhadir KH, Lee KY, Alsberg E, Damm KL, Anderson KW, Mooney DJ. Degradation of Partially Oxidized Alginate and Its Potential Application for Tissue Engineering. *Biotechnol Prog.* 2001;17:945–50.
  141. Lee KY, Bouhadir KH, Mooney DJ. Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules. *Biomaterials.* 2004;25:2461–6.
  142. Prang P, Müller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, et al. The

- promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*. 2006;27:3560–9.
143. Guo X, Wang Y, Qin Y, Shen P, Peng Q. Structures, properties and application of alginic acid: A review. *Int J Biol Macromol*. 2020;162:618–28.
  144. Sapra A. Alginate. *A Serv Natl Libr Med Natl Institutes Heal*. 2020.
  145. Echave CM, Saenz del Burgo L, Pedraz LJ, Orive G. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. Vol. 23, *Current Pharmaceutical Design*. 2017. p. 3567–84.
  146. Mehdi Nikkhah, Mohsen Akbari, Arghya Paul, Adnan Memic, Alireza Dolatshahi-Pirouz AK. Gelatin-based biomaterials for tissue engineering and stem cell bioengineering. In: *Biomaterials from nature for advances devices and therapies*. 2016. p. 37–62.
  147. Lynda Velutheril Thomas. Chapter 4: Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering: Retrospects and Prospects. In: *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2021. p. 89–118.
  148. Hsu R-S, Chen P-Y, Fang J-H, Chen Y-Y, Chang C-W, Lu Y-J, et al. Adaptable Microporous Hydrogels of Propagating NGF-Gradient by Injectable Building Blocks for Accelerated Axonal Outgrowth. *Adv Sci*. 2019; 6.
  149. Foox M, Zilberman M. Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12:1547–63.
  150. Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y. Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;12:77–88.
  151. Contessi Negrini N, Lipreri MV, Tanzi MC, Farè S. In vitro cell delivery by gelatin microspheres prepared in water-in-oil emulsion. *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31:26.
  152. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*. 2001;22:763–8.



153. Marois Y, Chakfé N, Deng X, Marois M, How T, King MW, et al. Carbodiimide cross-linked gelatin: a new coating for porous polyester arterial prostheses. *Biomaterials*. 1995;16:1131–9.
154. Velutheri Thomas L, Nair PD. An electrospun citric acid modified polyvinyl alcohol scaffold for vascular tissue engineering. *J Bioact Compat Polym*. 2019;34:263–79.
155. Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, Yao K De. Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 2003;24:1067–74.
156. Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomater* [Internet]. 2007;3(3):321–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706107000153>
157. Roohani-Esfahani S-I, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites. *Biomaterials*. 2010;31:5498–509.
158. Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, Brook G, Klee D, Dalton P, et al. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- $\epsilon$ -caprolactone and a collagen/poly- $\epsilon$ -caprolactone blend. *Biomaterials*. 2007;28:3012–25.
159. Perez-Puyana V, Wieringa P, Yuste Y, de la Portilla F, Guerro A, Romero A, et al. Fabrication of hybrid scaffolds obtained from combinations of PCL with gelatin or collagen via electrospinning for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2021;109:1600–12.
160. Dong L, Wang S-J, Zhao X-R, Zhu Y-F, Yu J-K. 3D- Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffold Integrated with Cell-laden Chitosan Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Sci Rep*. 2017;7:13412.
161. Christiani TR, Baroncini E, Stanzione J, Vernengo AJ. In vitro evaluation of 3D printed polycaprolactone scaffolds with angle-ply architecture for annulus fibrosus

- tissue engineering. *Regen Biomater.* 2019;6:175–84.
162. Pektok E, Nottelet B, Tille J-C, Gurny R, Kalangos A, Moeller M, et al. Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. *Circulation.* 2008 Dec 9;118:2563–70.
  163. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2011;49:832–64.
  164. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;79–80:3–18.
  165. Murphy S V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32:773–85.
  166. Moroni L, Boland T, Burdick JA, De Maria C, Derby B, Forgacs G, et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol.* 2018;36:384–402.
  167. Ogushi Y, Sakai S, Kawakami K, Dosio F, Arpicco S, Stella B, et al. An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects. *Materials (Basel).* 2018;11:381–8.
  168. Calero Castro FJ. Capítulo 16: Cultivos celulares tridimensionales. Impresión de células (bioprinting). In: *Nociones sobre Ingeniería Tisular y medicina regenerativa.* 2020. p. 143–56.
  169. Su A, Al'Aref SJ. Chapter 1 - History of 3D Printing. In: Al'Aref SJ, Mosadegh B, Dunham S, Min JKBT-3D PA in CM, editors. Boston: Academic Press; 2018. p. 1–10.
  170. Savini A, Savini GG. A short history of 3D printing, a technological revolution just started. In: *2015 ICOHTEC/IEEE International History of High-Technologies and their Socio-Cultural Contexts Conference (HISTELCON).* 2015. p. 1–8.
  171. Shakor P, Nejadi S, Paul G, Malek S. Review of Emerging Additive Manufacturing

- Technologies in 3D Printing of Cementitious Materials in the Construction Industry. *Front Built Environ.* 2019;4.
172. Cesarano J, Segalman R, Calvert PD. Robocasting provides modless fabrication from slurry deposition. *Ceram Ind.* 1998;148.
  173. Wu BM, Borland SW, Giordano RA, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Solid free-form fabrication of drug delivery devices. *J Control Release.* 1996;40:77–87.
  174. Lee G, Barlow J. Selective laser sintering of bioceramic materials for implants. *Proc solid Free Fabr.* 1996;376–80.
  175. GIORDANO RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1997;8:63–75.
  176. Therriault D, White SR, Lewis JA. Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly. *Nat Mater.* 2003;2:265–71.
  177. Albrecht DR, Underhill GH, Wassermann TB, Sah RL, Bhatia SN. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat Methods.* 2006;3:369–75.
  178. Highley CB. 3D Bioprinting Technologies. *3D Bioprinting in Medicine.* 2019. p 1–66.
  179. Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec Part A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;272A:497–502.
  180. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* 2009;30:2164–74.
  181. Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials.* 2002;23:4437–47.

182. Dhariwala B, Hunt E, Boland T. Rapid Prototyping of Tissue-Engineering Constructs, Using Photopolymerizable Hydrogels and Stereolithography. *Tissue Eng.* 2004;10:1316–22.
183. Xu T, Olson J, Zhao W, Atala A, Zhu J-M, Yoo JJ. Characterization of Cell Constructs Generated With Inkjet Printing Technology Using In Vivo Magnetic Resonance Imaging. *J Manuf Sci Eng.* 2008; 021013; p 1-7.
184. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJA, et al. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv Mater.* 2013 Sep 1;25:5011–28.
185. Jones N. Science in three dimensions: The print revolution. *Nature.* 2012;487:22–3.
186. Sekar JA, Athira RK, Lakshmi TSR, Velayudhan S, Bhatt A, Kumar PRA, et al. 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Current Landscape and Future Prospects. In 2021.
187. Ozbolat IT, Moncal KK, Gudapati H. Evaluation of bioprinter technologies. *Addit Manuf.* 2017;13:179–200.
188. Chang CC, Boland ED, Williams SK, Hoying JB. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2011;98B:160–70.
189. Visser J, Peters B, Burger TJ, Boomstra J, Dhert WJA, Melchels FPW, et al. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs. *Biofabrication.* 2013;5:35007.
190. Highley CB. 3D Bioprinting Technologies. *3D Bioprinting Med.* 2019;
191. Yeong W-Y, Chua C-K, Leong K-F, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* 2004;22:643–52.
192. Tan Z, Parisi C, Di Silvio L, Dini D, Forte AE. Cryogenic 3D Printing of Super Soft Hydrogels. *Sci Rep.* 2017;7:16293.

193. Vozzi G, Previti A, De Rossi D, Ahluwalia A. Microsyringe-Based Deposition of Two-Dimensional and Three-Dimensional Polymer Scaffolds with a Well-Defined Geometry for Application to Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 2002;8:1089–98.
194. Pfister A, Landers R, Laib A, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Biofunctional rapid prototyping for tissue-engineering applications: 3D bioplotting versus 3D printing. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 2004;42:624–38.
195. Cui X, Dean D, Ruggeri ZM, Boland T. Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2010;106:963–9.
196. Derby B. Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures. *J Mater Chem.* 2008;18:5717–21.
197. Ng WL, Lee JM, Yeong WY, Naing MW. Microvalve-based bioprinting - process, bio-inks and applications. *Biomater Sci.* 2017;5 4:632–47.
198. Fang Y, Frampton JP, Raghavan S, Sabahi-Kaviani R, Luker G, Deng CX, et al. Rapid Generation of Multiplexed Cell Cocultures Using Acoustic Droplet Ejection Followed by Aqueous Two-Phase Exclusion Patterning. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18:647–57.
199. Jayasinghe SN, Qureshi AN, Eagles PAM. Electrohydrodynamic Jet Processing: An Advanced Electric-Field-Driven Jetting Phenomenon for Processing Living Cells. *Small.* 2006;2:216–9.
200. Onses MS, Sutanto E, Ferreira PM, Alleyne AG, Rogers JA. Mechanisms, Capabilities, and Applications of High-Resolution Electrohydrodynamic Jet Printing. *Small.* 2015;11:4237–66.
201. Yap CY, Chua CK, Dong ZL, Liu ZH, Zhang DQ, Loh LE, et al. Review of selective laser melting: Materials and applications. *Appl Phys Rev.* 2015;2:41101.
202. Hribar KC, Soman P, Warner J, Chung P, Chen S. Light-assisted direct-write of 3D functional biomaterials. *Lab Chip.* 2014;14:268–75.
203. Vafaei S, Tuck C, Ashcroft I, Wildman R. Surface microstructuring to modify wettability for 3D printing of nano-filled inks. *Chem Eng Res Des.* 2016;109:414–

- 20.
204. Jakus AE, Rutz AL, Shah RN. Advancing the field of 3D biomaterial printing. *Biomed Mater.* 2016;11:14102.
205. De Maria C, Vozzi G, Moroni L. Multimaterial, heterogeneous, and multicellular three-dimensional bioprinting. *MRS Bull.* 2017;42:578–84.
206. Cooley J. Apparatus for electrically dispersing fluids N° 692, 31. 1902.
207. Morton W. Method of dispersing fluids N° 705,691. 1902.
208. He W, Yong T, Teo WE, Ma Z, Ramakrishna S. Fabrication and Endothelialization of Collagen-Blended Biodegradable Polymer Nanofibers: Potential Vascular Graft for Blood Vessel Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 2005;11:1574–88.
209. Sengonul M, Ruzicka J, Attygalle AB, Libera M. Surface modification of protein nanocontainers and their self-directing character in polymer blends. *Polymer (Guildf).* 2007;48:3632–40.
210. Mondal D, Tiwari A. Electrospun Nanomatrix for Tissue Regeneration. In: *Biomedical materials and diagnostic devices.* 2012. p. 561–80.
211. Von A. G. Bailey, Research Studies Press LTD Taunton, Somerset/John Wiley & Sons Inc, *Electrostatic Spraying of Liquids.* New York 1988, 197 Seiten, 24,75 \$. *Phys unserer Zeit.* 1989;20:160.
212. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chem Rev.* 2019;119:5298–415.
213. S. G. Kumbar, M. D. Kofron, L. S. Nair CTL. Cell behavior toward nanostructured surfaces. In: *Biomedical Nanostructured.* 2008. p. 257–91.
214. KAMIDE K, NISHIYAMA K. 5 - Cuprammonium processes. In: Woodings CBT-RCF, editor. *Woodhead Publishing Series in Textiles.* Woodhead Publishing; 2001. p. 88–155.
215. Gilbert , W. *De magnete.* 1958.

216. Gray S. II. A letter concerning the electricity of water, from Mr. Stephen Gray to Cromwell Mortimer, M. D. *Secr. R. S. Philos Trans R Soc London*. 1731;37:227–60.
217. Boys C V. On the Production, Properties, and some suggested Uses of the Finest Threads. *Proc Phys Soc London*. 1887;9:8–19.
218. Formhals A. Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. 1934. p. U.S. Pat. 1,975,504.
219. Formhals A. Method and Apparatus for Spinning. 1944. p. U.S. Pat. 2,349,950,.
220. Martin, G. E.; Cockshott ID. Fibrillar Lining for Prosthetic Device. 1977. p. U.S. Pat. 4,044,404.
221. Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys*. 2000;87:4531–47.
222. Shin YM, Hohman MM, Brenner MP, Rutledge GC. Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. *Appl Phys Lett*. 2001;78:1149–51.
223. Dersch R, Liu T, Schaper AK, Greiner A, Wendorff JH. Electrospun nanofibers: Internal structure and intrinsic orientation. *J Polym Sci Part A Polym Chem*. 2003;41:545–53.
224. Sun Z, Zussman E, Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A. Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Adv Mater*. 2003;15:1929–32.
225. Chen S, Li R, Li X, Xie J. Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;132:188–213.
226. Han F, Jia X, Dai D, Yang X, Zhao J, Zhao Y, et al. Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF. *Biomaterials*. 2013;34:7302–13.
227. Yu D-G, Li X-Y, Wang X, Yang J-H, Bligh SWA, Williams GR. Nanofibers



- Fabricated Using Triaxial Electrospinning as Zero Order Drug Delivery Systems. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7:18891–7.
228. Lai H-J, Kuan C-H, Wu H-C, Tsai J-C, Chen T-M, Hsieh D-J, et al. Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing. *Acta Biomater*. 2014;10:4156–66.
229. Chen S, Boda SK, Batra SK, Li X, Xie J. Emerging Roles of Electrospun Nanofibers in Cancer Research. *Adv Healthc Mater*. 2018;7:1701024.
230. Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres. *Pharm Res*. 2000;171:100–6.
231. Hinderer S, Layland SL, Schenke-Layland K. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:260–9.
232. Ji W, Yang F, Seyednejad H, Chen Z, Hennink WE, Anderson JM, et al. Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA-based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation. *Biomaterials*. 2012;33:6604–14.
233. Merkle VM, Tran PL, Hutchinson M, Ammann KR, DeCook K, Wu X, et al. Core–shell PVA/gelatin electrospun nanofibers promote human umbilical vein endothelial cell and smooth muscle cell proliferation and migration. *Acta Biomater*. 2015;27:77–87.
234. Kuo Y-C, Hung S-C, Hsu S. The effect of elastic biodegradable polyurethane electrospun nanofibers on the differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;122:414–22.
235. Yin Z, Chen X, Song H, Hu J, Tang Q, Zhu T, et al. Electrospun scaffolds for multiple tissues regeneration in vivo through topography dependent induction of lineage specific differentiation. *Biomaterials*. 2015;44:173–85.
236. Nam J, Johnson J, Lannutti JJ, Agarwal S. Modulation of embryonic mesenchymal

- progenitor cell differentiation via control over pure mechanical modulus in electrospun nanofibers. *Acta Biomater.* 2011;7:1516–24.
237. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci Rep.* 2013;3:1604.
238. Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014;10:2341–53.
239. Jiang X, Cao HQ, Shi LY, Ng SY, Stanton LW, Chew SY. Nanofiber topography and sustained biochemical signaling enhance human mesenchymal stem cell neural commitment. *Acta Biomater.* 2012;8:1290–302.
240. Stroka KM, Gu Z, Sun SX, Konstantopoulos K. Bioengineering paradigms for cell migration in confined microenvironments. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;30:41–50.
241. Zuidema JM, Hyzinski-García MC, Van Vlasselaer K, Zaccor NW, Plopper GE, Mongin AA, et al. Enhanced GLT-1 mediated glutamate uptake and migration of primary astrocytes directed by fibronectin-coated electrospun poly-l-lactic acid fibers. *Biomaterials.* 2014;35:1439–49.
242. Mascharak S, Benitez PL, Proctor AC, Madl CM, Hu KH, Dewi RE, et al. YAP-dependent mechanotransduction is required for proliferation and migration on native-like substrate topography. *Biomaterials.* 2017;115:155–66.
243. Rao SS, Nelson MT, Xue R, DeJesus JK, Viapiano MS, Lannutti JJ, et al. Mimicking white matter tract topography using core–shell electrospun nanofibers to examine migration of malignant brain tumors. *Biomaterials.* 2013;34:5181–90.
244. Ji W, Yang F, Ma J, Bouma MJ, Boerman OC, Chen Z, et al. Incorporation of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone regeneration. *Biomaterials.* 2013;34:735–45.
245. Phipps MC, Xu Y, Bellis SL. Delivery of Platelet-Derived Growth Factor as a Chemotactic Factor for Mesenchymal Stem Cells by Bone-Mimetic Electrospun Scaffolds. *PLoS One.* 2012;7:e40831.

246. Mandenius C-F. Challenges for Bioreactor Design and Operation. *Bioreactors*. 2016. p. 1–34. (Wiley Online Books).
247. Meyer U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective BT - Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Meyer U, Handschel J, Wiesmann HP, Meyer T, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 5–12.
248. Kasper C, Griensven M van, Pörtner R. *Bioreactor Systems for tissue engineering*. 2009.
249. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res*. 2017;5:17014.
250. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:581–603.
251. Villanueva P. Segunda parte - biorreactores. Diseño, tipos y aplicaciones actuales. In: *Nociones sobre Ingeniería Tisular y medicina regenerativa*. 2020. p. 157–66.
252. Russell Burch, Rex Leonard., WMS. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen; 1959.
253. Ogunlade O, Ho JOY, Kalber TL, Hynds RE, Zhang E, Janes SM, et al. Monitoring neovascularization and integration of decellularized human scaffolds using photoacoustic imaging. *Photoacoustics*. 2019;13:76–84.
254. Popp JR, Roberts JJ, Gallagher D V, Anseth KS, Bryant SJ, Quinn TP. An Instrumented Bioreactor for Mechanical Stimulation and Real-Time, Nondestructive Evaluation of Engineered Cartilage Tissue. *J Med Device*. 2012;6:21006.
255. Nieponice A, Maul TM, Cumer JM, Soletti L, Vorp DA. Mechanical stimulation induces morphological and phenotypic changes in bone marrow-derived progenitor cells within a three-dimensional fibrin matrix. *J Biomed Mater Res Part A*. 2007;81A:523–30.

256. Kong Z, Li J, Zhao Q, Zhou Z, Yuan X, Yang D, et al. Dynamic compression promotes proliferation and neovascular networks of endothelial progenitor cells in demineralized bone matrix scaffold seed. *J Appl Physiol*. 2012;113:619–26.
257. Chan SCW, Ferguson SJ, Wuertz K, Gantenbein-Ritter B. Biological Response of the Intervertebral Disc to Repetitive Short-Term Cyclic Torsion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36: 2021-30.
258. Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*. 2011;48:171–81.
259. Ravichandran A, Liu Y, Teoh SH. Review: bioreactor design towards generation of relevant engineered tissues: focus on clinical translation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12:e7–22.
260. Dennis RG, Smith B, Philp A, Donnelly K, Baar K. Bioreactors for Guiding Muscle Tissue Growth and Development BT - Bioreactor Systems for Tissue Engineering. In: Kasper C, van Griensven M, Pörtner R, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 39–79.
261. Nagai Y, Yokoi H, Kaihara K, Naruse K. The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel. *Biomaterials*. 2012;33:1044–51.
262. Baker BM, Shah RP, Huang AH, Mauck RL. Dynamic Tensile Loading Improves the Functional Properties of Mesenchymal Stem Cell-Laden Nanofiber-Based Fibrocartilage. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1445–55.
263. Sharifpoor S, Simmons CA, Labow RS, Paul Santerre J. Functional characterization of human coronary artery smooth muscle cells under cyclic mechanical strain in a degradable polyurethane scaffold. *Biomaterials*. 2011;32:4816–29.
264. Jin G, Yang GH, Kim G. Tissue engineering bioreactor systems for applying physical and electrical stimulations to cells. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2015;103:935–48.

265. Blank M, Findl E. Mechanistic Approaches to Interactions of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems. In: Springer US. 1987.
266. Robinson KR. The responses of cells to electrical fields: a review. *J Cell Biol.* 1985;101:2023–7.
267. Freyssenet D, Connor MK, Takahashi M, Hood DA. Cytochrome c transcriptional activation and mRNA stability during contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Metab.* 1999;277:E26–32.
268. Kim IS, Song JK, Song YM, Cho TH, Lee TH, Lim SS, et al. Novel Effect of Biphasic Electric Current on In Vitro Osteogenesis and Cytokine Production in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:2411–22.
269. Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, Azzena GB, Grassi C. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Cav1-channel activity. *J Cell Physiol.* 2008;215:129–39.
270. Kasukonis B, Kim J, Brown L, Jones J, Ahmadi S, Washington T, et al. Codelivery of Infusion Decellularized Skeletal Muscle with Minced Muscle Autografts Improved Recovery from Volumetric Muscle Loss Injury in a Rat Model. *Tissue Eng Part A.* 2016;22:1151–63.
271. Mariscalco MW, Magnussen RA, Mehta D, Hewett TE, Flanigan DC, Kaeding CC. Autograft Versus Nonirradiated Allograft Tissue for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Systematic Review. *Am J Sports Med.* 2013;42:492–9.
272. Vang P. Advantages and disadvantages between allograft versus autograft in anterior cruciate ligament replacement. *Significance.* 2006;82–3.
273. Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol.* 2004;166:877–87.
274. Beldjilali-Labro M, Garcia AG, Farhat F, Bedoui F, Grosset JF, Dufresne M, et al.

- Biomaterials in tendon and skeletal muscle tissue engineering: Current trends and challenges. *Materials (Basel)*. 2018;11.
275. Volckaert T, De Langhe S. Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2014;7:8.
276. Fernandes DJ, McConville JF, Stewart AG, Kalinichenko V, Solway J. Can we differentiate between airway and vascular smooth muscle? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31:805–10.
277. Hrousis CA, Wiggs BJR, Drazen JM, Parks DM, Kamm RD. Mucosal Folding in Biologic Vessels. *J Biomech Eng*. 2002;124:334–41.
278. Jaslove JM, Nelson CM. Smooth muscle: A stiff sculptor of epithelial shapes. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2018;373.
279. Järvinen TAH, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2013;3:337–45.
280. Qazi TH, Mooney DJ, Pumberger M, Geißler S, Duda GN. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. *Biomaterials*. 2015;53:502–21.
281. Alarcin E, Bal-öztürk A, Avcı H, Ghorbanpoor H, Guzel FD, Akpek A, et al. Current strategies for the regeneration of skeletal muscle tissue. *Int J Mol Sci*. 2021;22:1–28.
282. Choi YJ, Kim TG, Jeong J. 3D Cell Printing of Functional Skeletal Muscle Constructs Using Skeletal Muscle-Derived Bioink. *Adv Heal Mater*. 2016;5:2636–45.
283. Kim WJ, Lee H, Lee JU, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ, et al. Efficient myotube formation in 3D bioprinted tissue construct by biochemical and topographical cues. *Biomaterials*. 2020;230:119632.
284. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. 2015;1.

285. Kim JH, Seol YJ, Ko IK, Kang HW, Lee YK, Yoo JJ, et al. 3D Bioprinted Human Skeletal Muscle Constructs for Muscle Function Restoration. *Sci Rep.* 2018;8:1–16.
286. Seyedmahmoud R, Çelebi-Saltik B, Barros N, Nasiri R, Banton E, Shamloo A, et al. Three-dimensional bioprinting of functional skeletal muscle tissue using gelatin. *Micromachines.* 2019;10:1–12.
287. Narayanan LK, Huebner P, Fisher MB, Spang JT, Starly B, Shirwaiker RA. 3D-Bioprinting of Polylactic Acid (PLA) Nanofiber-Alginate Hydrogel Bioink Containing Human Adipose-Derived Stem Cells. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016;2:1732–42.
288. Baniyasi H, Mashayekhan S, Fadaoddini S, Haghsharifzamini Y. Design, fabrication and characterization of oxidized alginate-gelatin hydrogels for muscle tissue engineering applications. *J Biomater Appl.* 2016;31:152–61.
289. Mozetic P, Giannitelli SM, Gori M, Trombetta M, Rainer A. Engineering muscle cell alignment through 3D bioprinting. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2017;105:2582–8.
290. Aviss KJ, Gough JE, Downes S. Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. *Eur Cells Mater.* 2010;19:193–204.
291. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49:59–68.
292. Perez-puyana V, Villanueva P, Jiménez-rosado M, de la Portilla F, Romero A. Incorporation of elastin to improve polycaprolactone-based scaffolds for skeletal muscle via electrospinning. *Polymers (Basel).* 2021;13:1–10.
293. Kheradmandi M, Vasheghani-Farahani E, Ghiaseddin A, Ganji F. Skeletal muscle regeneration via engineered tissue culture over electrospun nanofibrous chitosan/PVA scaffold. *J Biomed Mater Res Part A.* 2016;104:1720–7.
294. Liao I-C, Liu JB, Bursac N, Leong KW. Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers. *Cell Mol Bioeng.*



- 2008;1:133–45.
295. Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly( $\epsilon$ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials*. 2008;29:2899–906.
  296. Sreerekha PR, Menon D, Nair S V., Chennazhi KP. Fabrication of electrospun poly (lactide-co-glycolide)-fibrin multiscale scaffold for myocardial regeneration in vitro. *Tissue Eng - Part A*. 2013;19:849–59.
  297. Jun I, Jeong S, Shin H. The stimulation of myoblast differentiation by electrically conductive sub-micron fibers. *Biomaterials*. 2009;30:2038–47.
  298. Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandenburg HH. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Physiol*. 2002;283:C1557–65.
  299. Pennisi CP, Olesen CG, de Zee M, Rasmussen J, Zachar V. Uniaxial Cyclic Strain Drives Assembly and Differentiation of Skeletal Myocytes. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:2543–50.
  300. Candiani G, Riboldi SA, Sadr N, Lorenzoni S, Neuenschwander P, Montevecchi FM, et al. Cyclic Mechanical Stimulation Favors Myosin Heavy Chain Accumulation in Engineered Skeletal Muscle Constructs. *J Appl Biomater Biomech*. 2010;8:68–75.
  301. Boonen KJM, Langelaan MLP, Polak RB, van der Schaft DWJ, Baaijens FPT, Post MJ. Effects of a combined mechanical stimulation protocol: Value for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomech*. 2010;43:1514–21.
  302. Ostrovidov S, Shi X, Zhang L, Liang X, Kim SB, Fujie T, et al. Myotube formation on gelatin nanofibers – Multi-walled carbon nanotubes hybrid scaffolds. *Biomaterials*. 2014;35:6268–77.
  303. Kasper AM, Turner DC, Martin NRW, Sharples AP. Mimicking exercise in three-dimensional bioengineered skeletal muscle to investigate cellular and molecular mechanisms of physiological adaptation. *J Cell Physiol*. 2018;233:1985–98.

304. Rangarajan S, Madden L, Bursac N. Use of Flow, Electrical, and Mechanical Stimulation to Promote Engineering of Striated Muscles. *Ann Biomed Eng.* 2014;42:1391–405.
305. Stern-Straeter J, Bach AD, Stangenberg L, Foerster VT, Horch RE, Stark GB, et al. Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures - a real-time RT-PCR study. *J Cell Mol Med.* 2005;9:883–92.
306. Langelaan MLP, Boonen KJM, Rosaria-Chak KY, van der Schaft DWJ, Post MJ, Baaijens FPT. Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5:529–39.
307. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016;34:312–9.
308. Fishman JM, Tyraskis A, Maghsoudlou P, Urbani L, Totonelli G, Birchall MA, et al. Skeletal muscle tissue engineering: Which cell to use? *Tissue Eng - Part B Rev.* 2013;19:503–15.
309. Pérez Polo A. Desarrollo de tejido muscular esquelético in vitro con andamios 3D y un biorreactor. Universidad de Sevilla; 2019.
310. Serrano Alarcón Á. Comportamiento en biorreactor de andamios de colágeno con células musculares con y sin electroestimulación. Universidad de Sevilla; 2017.
311. Alave Reyes-Furrer A, De Andrade S, Bachmann D, Jeker H, Steinmann M, Accart N, et al. Matrigel 3D bioprinting of contractile human skeletal muscle models recapitulating exercise and pharmacological responses. *Commun Biol* |. 2021;4:1183.
312. Kirsch M, Birnstein L, Pepelanova I, Handke W, Rach J, Seltsam A, et al. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties. *Bioengineering.* 2019;6:76.

313. Beldjilali-Labro M, Jellali R, Brown AD, Garcia Garcia A, Lerebours A, Guenin E, et al. Multiscale-Engineered Muscle Constructs: PEG Hydrogel Micro-Patterning on an Electrospun PCL Mat Functionalized with Gold Nanoparticles. Vol. 23, International journal of molecular sciences. 2021.
314. Smoak MM, Hogan KJ, Grande-Allen KJ, Mikos AG. Bioinspired electrospun dECM scaffolds guide cell growth and control the formation of myotubes. Vol. 7, Science Advances. 2021.
315. Sirivisoot S, Harrison BS. Skeletal myotube formation enhanced by electrospun polyurethane carbon nanotube scaffolds. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2483–97.
316. Anne Géraldine Guex, Dominique Lisa Birrer, Giuseppino Fortunato HTT and M-NG. Anisotropically oriented electrospun matrices with an imprinted periodic micropattern: a new scaffold for engineered muscle constructs. 2013;
317. Takeda N, Tamura K, Mineguchi R, Ishikawa Y, Haraguchi Y, Shimizu T, et al. In situ cross-linked electrospun fiber scaffold of collagen for fabricating cell-dense muscle tissue. *J Artif Organs*. 2016;19:141–8.
318. Ong CS, Yesantharao P, Huang CY, Mattson G, Boktor J, Fukunishi T, et al. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatr Res*. 2018;83:223–31.
319. Ji S, Guvendiren M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:1–8.
320. Morais DS, Rodrigues MA, Lopes MA, Coelho MJ, Maurício AC, Gomes R, et al. Biological evaluation of alginate-based hydrogels, with antimicrobial features by Ce(III) incorporation, as vehicles for a bone substitute. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24:2145–55.
321. de la Portilla F, Dios-Barbeito S, Victoria Maestre-Sánchez M, Manuel Vázquez-Monchul J, María García-Cabrera A, Ramallo I, et al. Feasibility and safety of calcium alginate hydrogel sealant for the treatment of cryptoglandular fistula-in-ano: phase I/IIa clinical trial Anal fistula, calcium alginate hydrogel, sealant agent, sphincter-preserving technique. *Colorectal Dis*. 2021;23:1499-1506.

322. Zhang J, Wehrle E, Vetsch JR, Paul GR, Rubert M, Müller R. Alginate dependent changes of physical properties in 3D bioprinted cell-laden porous scaffolds affect cell viability and cell morphology. *Biomed Mater.* 2019;14:65009.
323. Ansari S, Chen C, Xu X, Annabi N, Zadeh HH, et al. Muscle Tissue Engineering Using Gingival Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in Alginate Hydrogels Containing Multiple Growth Factors. *Ann Biomed Eng.* 2016;44:1908–20.
324. Jang J, Park H-J, Kim S-W, Kim H, Park JY, Na SJ, et al. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials.* 2017:264–74.
325. Nakajima A, Uemura R, Hashimoto S, Susa T, Sato Y. Effect of pulsatile electric field on cultured muscle cells in vitro. *WMSCI 2011 - 15th World Multi-Conference Syst Cybern Informatics, Proc.* 2011;2:129–33.
326. Okano T, Satoh S, Oka T, Matsuda T. Tissue engineering of skeletal muscle. Highly dense, highly oriented hybrid muscular tissues biomimicking native tissues. *ASAIO J.* 1997;43:M749-53.
327. Serena E, Flaibani M, Carnio S, Boldrin L, Vitiello L, De Coppi P, et al. Electrophysiologic stimulation improves myogenic potential of muscle precursor cells grown in a 3D collagen scaffold. *Neurol Res.* 2008;30:207–14.
328. Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandenburg HH. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. 2002; 283:C1557-65.
329. Li WJ, Mauck RL, Cooper JA, Yuan X, Tuan RS. Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomech.* 2007;40:1686–93.
330. Martins PM, Ribeiro S, Ribeiro C, Sencadas V, Gomes AC, Gama FM, et al. Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly(vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering. 2013;3:17938.
331. Abarzúa-Illanes PN, Padilla C, Ramos A, Isaacs M, Ramos-Grez J, Olguín HC, et al. Improving myoblast differentiation on electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)

- scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2017;105:2241–51.
332. McKeon-Fischer KD, Flagg DH, Freeman JW. Coaxial electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone), multiwalled carbon nanotubes, and polyacrylic acid/polyvinyl alcohol scaffold for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2011;99 A:493–9.
333. Shin YC, Lee JH, Jin L, Kim MJ, Kim Y-J, Hyun JK, et al. Stimulated myoblast differentiation on graphene oxide-impregnated PLGA-collagen hybrid fibre matrices. *J Nanobiotechnology*. 2015;13:21.
334. Wang L, Wu Y, Guo B, Ma PX. Nano fiber Yarn / Hydrogel Core À Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast. *ACS Nano*. 2015;9:9167–79.
335. Cha SH, Lee HJ, Koh WG. Study of myoblast differentiation using multi-dimensional scaffolds consisting of nano and micropatterns. *Biomater Res*. 2017;21:1–9.
336. Drexler JW, Powell HM. Regulation of electrospun scaffold stiffness via coaxial core diameter. *Acta Biomater*. 2011 Mar;7:1133–9.
337. Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannahower A, et al. A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:2291–303.
338. Heher P, Maleiner B, Prüller J, Teuschl AH, Kollmitzer J, Monforte X, et al. A novel bioreactor for the generation of highly aligned 3D skeletal muscle-like constructs through orientation of fibrin via application of static strain. *Acta Biomater*. 2015;24:251–65.
339. Ahmed WW, Wolfram T, Goldyn AM, Bruellhoff K, Rioja BA, Möller M, et al. Myoblast morphology and organization on biochemically micro-patterned hydrogel coatings under cyclic mechanical strain. *Biomaterials*. 2010;31:250–8.
340. Li Y, Huang G, Gao B, Li M, Genin GM, Lu TJ, et al. Magnetically actuated cell-

- laden microscale hydrogels for probing strain-induced cell responses in three dimensions. *NPG Asia Mater.* 2016;8.
341. Player DJ, Martin N R W, Passey S L, Sharples A P, Mudera V, Lewis M P, et al. Acute mechanical overload increases IGF-I and MMP-9 mRNA in 3D tissue-engineered skeletal muscle. *Biotechnol Lett.* 2014;36:1113–24.
342. Vandeburgh HH, Hatfaludy S, Karlisch P, Shansky J. Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch-relaxation in tissue culture. *Am J Physiol.* 1989; 256:C674-82.
343. Nakayama KH, Shayan M, Huang NF. Engineering Biomimetic Materials for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Adv Healthc Mater.*2019;8:1801168.
344. Hosseini V, Ahadian S, Ostrovidov S, Camci-Unal G, Chen S, Kaji H, et al. Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:2453–65.
345. Ito A, Yamamoto Y, Sato M, Ikeda K, Yamamoto M, Fujita H, et al. Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation. *Sci Rep.* 2014;4:1–7.
346. Cvetkovic C, Raman R, Chan V, Williams BJ, Tolish M, Bajaj P, et al. Three-dimensionally printed biological machines powered by skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:10125-30.
347. Yamada E, Hashimoto S, Tachibana K, Okada M, Yamasaki K, Kondo H, et al. Effect of electric stimulation on adhesion and proliferation of cultured muscle cells. *WMSCI 2008 - 12th World Multi-Conference Syst Cybern Informatics, Jointly with 14th Int Conf Inf Syst Anal Synth ISAS 2008 - Proc.* 2008;2:124–9.
348. Hotta K, Behnke BJ, Masamoto K, Shimotsu R, Onodera N, Yamaguchi A, et al. Microvascular permeability of skeletal muscle after eccentric contraction-induced muscle injury: in vivo imaging using two-photon laser scanning microscopy. *J Appl Physiol.* 2018;125:369–80.