

**DISEÑO DE UNA TINTA DE BIOMATERIAL PARA LA
BIOIMPRESIÓN TRIDIMENSIONAL A PARTIR DE ALGINATO
FUNCIONALIZADO CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS CON
POTENCIAL USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA
OSTEOARTRITIS**

Presentado por:

Silvia Carolina Suárez Mantilla

Código:

U00104607

Karen Sofía Vega Bautista

Código:

U00106499

Director:

PhD Víctor Alfonso Solarte David

Co-directora:

PhD Silvia Milena Becerra Bayona

Universidad Autónoma de Bucaramanga
Facultad de Ingeniería
Programa de Ingeniería Biomédica

Bucaramanga
2021

Agradecimientos

A mi madre María Elena Mantilla, quien ha sido mi mayor ejemplo a seguir y me ha enseñado a lo largo de la vida que todos los sueños se pueden cumplir con perseverancia, entrega, motivación, compromiso y mucho amor.

A mi padre Hilario Suárez, por su apoyo y amor incondicional en todas las etapas de mi vida, quien me ha inculcado que la paciencia y dedicación son unas grandes virtudes, esenciales para lograr cualquier meta propuesta.

A mi hermana Lizeth Suárez, por llenarme cada día de alegría y amor, gracias por convertirme en mejor persona, por todas las enseñanzas valiosas que me has dado y por brindarme el regalo más bonito, a mi sobrino.

A mis directores de proyecto de grado, PhD Víctor Alfonso Solarte y PhD Silvia Milena Becerra, quienes, con su dedicación, paciencia, apoyo y conocimientos brindados hicieron posible el desarrollo de este proyecto, permitiéndome formarme como una mejor profesional.

A mi compañera de tesis y mejor amiga Karen Vega, quien ha sido mi compañía y apoyo durante todo este proceso, gracias por llenarme la vida de alegría.

Un agradecimiento especial a Fundonemos y al Ingeniero Guillermo Rueda, quien me brindó apoyo incondicional haciendo posible la culminación de este proyecto.

Silvia Carolina Suárez Mantilla

A Dios, porque en Él encontré fortaleza y sabiduría para culminar este proyecto.

A mi papá, Alfonso Vega, por ser mi mejor maestro y mi ejemplo a seguir, por enseñarme la importancia del esfuerzo y dedicación para lograr cada una de las metas que me propongo, y por apoyarme con tanto amor en cada paso que doy a lo largo de mi vida.

A mi mamá, Claudia Sofía Bautista, quien con sus palabras de amor me demostró su apoyo día a día, por enseñarme a ser una mujer valiente y con carácter para afrontar cada dificultad.

A mis hermanitos y a Sammy, quienes me llenan de amor y felicidad a diario, me confirman la importancia de permanecer unidos en familia, ellos son mi motor y motivación para ser su ejemplo a seguir.

A Juan Pablo, mi novio, mejor amigo y compañero incondicional, gracias por motivarme siempre con palabras de amor, y por confirmarme día a día que juntos somos un gran equipo.

A Silvia Suárez, mi compañera de proyecto y hermana que me dejó la universidad, gracias por tanta paciencia y apoyo, por estar en cada momento y por crecer juntas.

A mis directores de proyecto, PhD Víctor Alfonso Solarte y PhD Silvia Milena Becerra, por ser excelentes maestros, por el amor y la vocación que mostraron siempre, gracias por los conocimientos brindados y por apoyarnos con la mejor actitud durante el desarrollo del proyecto.

A mi nonita, Emperatriz Rueda, por sus palabras de amor y constante oración, y en general a toda mi familia, por estar siempre presentes, por creer en mí y darme palabras de aliento.

Y a quienes están en el cielo, pero que siempre llevo en mi corazón, a ustedes también gracias.

Karen Sofía Vega Bautista

Dedicatoria

Dedicamos este proyecto de investigación y la culminación de nuestra formación profesional a nuestras familias, principalmente a nuestros padres, quienes nos han brindado un apoyo incondicional y amor inmenso durante todo este proceso, sin ellos nada de esto habría sido posible. A nuestros hermanos, por ser nuestros compañeros de vida, dadores de amor y alegría sin importar las dificultades. A Dios, por llenarnos de sabiduría y fortaleza para realizar este proyecto, juntando nuestros caminos y permitiéndonos lograr nuestros sueños juntas.

Resumen

La osteoartritis (OA) es una enfermedad reumática que afecta el cartílago y huesos de las articulaciones; los tratamientos disponibles para dicha enfermedad van desde inyecciones intraarticulares hasta analgésicos, que brindan una solución a corto y mediano plazo, mostrando la necesidad de desarrollar un tratamiento capaz de actuar a largo plazo. Por lo tanto, en este proyecto se desarrolló una tinta de biomaterial para la bioimpresión tridimensional de alginato de sodio funcionalizado con plasma rico en plaquetas (PRP), ya que, al ser un material biológico compuesto por factores de crecimiento, induce la regeneración del tejido a tratar. Inicialmente, se preparó la tinta de biomaterial de alginato de sodio al 1%, 2%, 3% y 4% p/v, la cual fue pre-reticulada físicamente con CaCl_2 ; se realizó la impresión de cuatro estructuras para el análisis de imprimibilidad requerido para la selección de la concentración más apta, así como los parámetros de impresión más óptimos. Con la concentración seleccionada (3% p/v), se llevó a cabo la preparación de la tinta de biomaterial de alginato de sodio funcionalizada con PRP, la cual fue evaluada según la imprimibilidad presentada, su capacidad de hinchamiento, propiedades mecánicas y la cuantificación de proteínas presentes en cada estructura. Mediante las pruebas realizadas, se pudo concluir la obtención de una tinta con una gelación adecuada y buena imprimibilidad, sin embargo, la tinta no obtuvo una mezcla homogénea, debido a la preparación mecánica de la misma. Por lo tanto, se recomienda implementar un método de preparación automatizado, evitando que se formen microgeles, los cuales dificultan la impresión y producen diferencias significativas en la encapsulación de proteínas en cada una de las estructuras impresas; las cuales requieren una cantidad alta de factores de crecimiento para tener un potencial uso en el tratamiento de la OA a largo plazo.

Palabras clave: Bioimpresión tridimensional, alginato de sodio, plasma rico en plaquetas, factores de crecimiento, imprimibilidad.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a rheumatic disease that affects the cartilage and bones of the joints; The treatments available for this disease range from intra-articular injections to analgesics, which provide a solution in the short and medium term, showing the need to develop a treatment capable of acting in the long term. Therefore, in this project a biomaterial ink was developed for the three-dimensional bioprinting of sodium alginate functionalized with platelet-rich plasma (PRP), since, being a biological material composed of growth factors, it induces tissue regeneration. to treat. Initially, the 1%, 2%, 3% and 4% w / v sodium alginate biomaterial ink was prepared, which was physically pre-crosslinked with CaCl₂; Four structures were printed for the printability analysis required for the selection of the most suitable concentration, as well as the most optimal printing parameters. With the selected concentration (3% w / v), the preparation of the PRP functionalized sodium alginate biomaterial ink was carried out, which was evaluated according to the printability presented, its swelling capacity, mechanical properties and quantification. of proteins present in each structure. Through the tests carried out, it was possible to conclude the obtaining of an ink with adequate gelation and good printability, however, the ink did not obtain a homogeneous mixture, due to its mechanical preparation. Therefore, it is recommended to implement an automated preparation method, avoiding the formation of microgels, which make printing difficult and produce significant differences in protein encapsulation in each of the printed structures; which require a high amount of growth factors to have a potential use in the treatment of OA in the long term.

Keywords: Three-dimensional bioprinting, sodium alginate, platelet rich plasma, growth factors, printability.

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| Capítulo 1. Problema u oportunidad | 12 |
| Introducción..... | 12 |
| Planteamiento del problema | 13 |
| Justificación..... | 14 |
| Objetivo general | 15 |
| Objetivos específicos..... | 15 |
| Capítulo 2. Marco teórico..... | 16 |
| Osteoartritis | 16 |
| Plasma rico en plaquetas..... | 17 |
| Factores de crecimiento | 18 |
| Andamios..... | 18 |
| Características de los andamios | 19 |
| Tinta de biomaterial..... | 19 |
| Hidrogel | 20 |
| Mecanismos de reticulación de los hidrogeles..... | 21 |
| Alginato | 22 |
| Reticulación del alginato..... | 22 |
| Bioimpresión | 23 |
| Tipos de bioimpresión..... | 24 |
| Imprimibilidad (Extrusión 3D) | 25 |
| Hinchamiento de los hidrogeles..... | 27 |

| | |
|---|----|
| Capítulo 3. Estado del arte | 29 |
| Capítulo 4. Metodología..... | 32 |
| Preparación de la tinta de biomaterial de alginato de sodio pre-reticulado..... | 32 |
| Preparación alginato de sodio | 32 |
| Pre-reticulación del alginato de sodio..... | 32 |
| Impresión de hidrogeles de alginato de sodio | 32 |
| Prueba de caída de filamento | 33 |
| Análisis de las estructuras impresas a base de alginato | 34 |
| Modificación parámetros de impresión | 34 |
| Prueba de fusión de filamentos | 36 |
| Obtención de PRP..... | 36 |
| Preparación de tinta de alginato funcionalizada con PRP | 37 |
| Imprimibilidad de la tinta de alginato funcionalizada con plasma | 37 |
| Cuantificación de proteínas..... | 38 |
| Hinchamiento de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP | 39 |
| Propiedades mecánicas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP... .. | 39 |
| Análisis estadísticos..... | 40 |
| Capítulo 5. Resultados y Análisis de Resultados | 41 |
| Resultados..... | 41 |
| Preparación de la tinta de biomaterial de alginato | 41 |
| Bioimpresión 3D de la tinta de biomaterial de alginato | 41 |
| Imprimibilidad de la tinta de biomaterial de alginato | 43 |

| | |
|--|----|
| Estandarización parámetros de impresión | 48 |
| Prueba de fusión de filamentos | 54 |
| Tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con plasma..... | 54 |
| Imprimibilidad de la tinta de alginato funcionalizada con PRP | 59 |
| Hinchamiento de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP | 64 |
| Propiedades mecánicas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP... | 65 |
| Cuantificación de proteínas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP | 67 |
| Análisis de Resultados..... | 69 |
| Capítulo 6. Conclusiones y Recomendaciones | 73 |
| Referencias | 75 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. A. Ilustración articulación de rodilla sana. B. Ilustración articulación de rodilla con osteoartritis. | 16 |
| Figura 2. Estructura química del alginato | 22 |
| Figura 3. Rangos de resultados para el factor de uniformidad [U] y el factor de poros [Pr]. 26 | 26 |
| Figura 4. Cobertura de las jeringas para centrifugación. | 33 |
| Figura 5. Estado de extrusión..... | 34 |
| Figura 6. Parámetros de impresión INVIVO@GEL..... | 35 |
| Figura 7. Mediciones rejilla y disco en ImageJ. A. Cuadrado interno rejilla. B. Grosor filamento rejilla. C. Disco | 38 |
| Figura 8. Estructuras diseñadas para bioimpresión 3D. A. Rejilla. B. Anillo. C. Disco. D. Filamento..... | 42 |
| Figura 9. A. Gráfica de área del círculo interno del anillo. B. Gráfica de round del círculo interno del anillo..... | 44 |
| Figura 10. A. Grafica área del disco. B. Grafica round del disco. C. Grafica imprimibilidad del disco..... | 45 |
| Figura 11. A. Gráfica del área del cuadrado interno de la rejilla. B. Gráfica de grosor de filamento del cuadrado interno de la rejilla. C. Imprimibilidad de la tinta. D. Fidelidad del área. | 46 |
| Figura 12. A. Rejilla recién impresa con biotinta de alginato al 1%. B. Rejilla recién impresa con biotinta de alginato al 2%. | 47 |
| Figura 13. A. Gráfica de área de filamento. B. Gráfica de grosor de filamento. | 48 |
| Figura 14. Variación parámetros de impresión. A. Medición área cuadrado interno vs medidas teóricas. B. Medición grosor del filamento vs medidas teóricas. C. Imprimibilidad de la tinta vs medidas teóricas. D. Fidelidad del área vs medidas teóricas..... | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Variación velocidad de impresión en anillos. A. Medición área círculo interno vs medidas teóricas. B. medición round círculo interno vs medidas teóricas. | 52 |
| Figura 16. Variación velocidad de impresión en discos. A. Medición área vs medida teórica. B. Medición round vs medida teórica. C. Imprimibilidad de la tinta vs medida teórica. | 53 |
| Figura 17. Prueba de fusión de filamentos..... | 54 |
| Figura 18. Prueba de caída de filamento (Tinta con PRP)..... | 57 |
| Figura 19. Rejillas recién impresas con tinta de biomaterial funcionalizada con PRP y tinta de control. A. Área de la rejilla. B. Grosor del filamento de la rejilla. C. Imprimibilidad de la rejilla. D. Fidelidad del área. | 60 |
| Figura 20. Rejillas con tinta de biomaterial funcionalizada con PRP y tinta de control reticuladas con CaCl ₂ . A. Área de la rejilla. B. Grosor del filamento de la rejilla. C. Imprimibilidad de la rejilla. D. Fidelidad del área. | 61 |
| Figura 21. Discos recién impresos con tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP y tinta de control. A. Área disco. B. Round disco. C. Imprimibilidad disco. | 62 |
| Figura 22. Discos con la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP y tinta de control reticulados con CaCl ₂ . A. Área disco. B. Round disco. C. Imprimibilidad disco. | 63 |
| Figura 23. Prueba de hinchamiento..... | 65 |
| Figura 24. Disco reticulado para prueba de compresión..... | 66 |
| Figura 25. Prueba de tensión. A. Anillo inicial. B. Anillo luego de la fractura..... | 66 |
| Figura 26. Módulo de elasticidad tinta de biomaterial de alginato funcionalizado con PRP. | 67 |
| Figura 27. Estructura en degradación..... | 68 |
| Figura 28. Cuantificación de proteínas. A. Tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP. B. Tinta de control (solo alginato)..... | 69 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Variación parámetros de impresión..... | 35 |
| Tabla 2. Caída de filamento para cada una de las concentraciones de alginato..... | 41 |
| Tabla 3. Medidas obtenidas para cada estructura..... | 43 |
| Tabla 4. Variación parámetros de impresión..... | 49 |
| Tabla 5. Variación velocidad de impresión..... | 51 |
| Tabla 6. Estructuras impresas con tinta de alginato funcionalizada con PPP..... | 55 |
| Tabla 7. Estructuras para la cuantificación de proteínas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP recién impresas. | 56 |
| Tabla 8. Estructuras para la cuantificación de proteínas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP reticuladas. | 58 |
| Tabla 9. Estructuras para la cuantificación de proteínas (Tinta de control) recién impresas. | 58 |
| Tabla 10. Estructuras para la cuantificación de proteínas (Tinta de control) reticuladas. | 59 |
| Tabla 11. Discos prueba de hinchamiento..... | 64 |

Capítulo 1. Problema u oportunidad

Introducción

Actualmente, la osteoartritis (OA) es una de las enfermedades reumáticas más comunes a nivel mundial, sin embargo, los tratamientos disponibles solo presentan un efecto a corto y mediano plazo. Entre las alternativas terapéuticas de última generación se destacan las inyecciones intraarticulares, de Plasma Rico en Plaquetas (PRP), el cual es un componente biológico obtenido de la sangre, con una alta concentración de plaquetas las cuales a su vez liberan factores de crecimiento, que inducen la regeneración tisular, permitiendo estimular la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular. El PRP se ha convertido en uno de los tratamientos más prometedores para la OA, sin embargo, se requiere una liberación controlada de los factores de crecimiento con el fin de inducir un efecto a largo plazo (Muchedzi, T. A., & Roberts, S. B, 2018).

Para lograr la liberación controlada, se ha planteado el desarrollo de andamios a base de polímeros, los cuales actúan como una matriz extracelular artificial que pueden ser fabricados por diferentes métodos, entre los que se destaca la bioimpresión tridimensional (3D), la cual permite la fabricación de estructuras personalizadas compuestas por materiales biológicos que son utilizados como tinta de biomaterial, tal es el caso del alginato de sodio, el cual es un biomaterial que presenta buenas propiedades para aplicaciones en ingeniería de tejidos, como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad.

Atendiendo a la necesidad de implementar una tinta de biomaterial capaz de inmovilizar el PRP, en este trabajo investigativo se realizó el diseño y evaluación de una tinta compuesta por alginato de sodio, la cual fue capaz de inmovilizar los factores de crecimiento del PRP, siendo utilizada en la bioimpresión 3D para la fabricación de rejillas, discos, anillos y filamentos que presentaron buenos valores de imprimibilidad.

Planteamiento del problema

La OA es una enfermedad reumática que afecta el cartílago y hueso de las articulaciones, y es generada por la presencia de mediadores inflamatorios produciendo dolor sistémico (O'Brien et al., 2019). Según estudios de la OMS, la artritis afecta un 80% de la población mayor de 65 años, y es considerada la enfermedad reumática con mayor prevalencia a nivel mundial. La OA es la principal causa de discapacidad del aparato locomotor, afectando a hombres y mujeres mayores de 60 en un 9,6% y 18% respectivamente (Arias, A., 2014).

A pesar de ser una de las enfermedades reumáticas más comunes a nivel mundial, no existe un tratamiento totalmente efectivo a largo plazo, ya que los tratamientos actuales como las inyecciones intraarticulares, analgésicos y fisioterapia tienen como función principal disminuir el dolor y retrasar el progreso de la enfermedad a corto y mediano plazo. En particular, las inyecciones intraarticulares compuestas por PRP o combinación de factores de crecimiento, se especializan en estimular la reparación y regeneración tisular en la OA, sin embargo, pierden su eficacia a los 6 meses de haber realizado la inyección, también se presenta una falta de estandarización de la concentración de plaquetas para la inyección, así como el número y frecuencia de las inyecciones. Por lo tanto, se requiere un tratamiento que actúe a largo plazo, y que se acople a los componentes anatómicos del paciente (Muchedzi, T. A., & Roberts, S. B, 2018). Para lograr que el tratamiento actúe a largo plazo, se requieren dispositivos de liberación controlada de PRP, como, por ejemplo, los sistemas de administración de fármacos en los cuales se usan hidrogeles para dicha liberación, debido que permiten la absorción de dichos fármacos, y su liberación a favor de gradiente de concentración o degradación del hidrogel. También, es importante que los dispositivos de liberación controlada tengan formas personalizadas de componentes anatómicos del paciente,

y cumplan con sus características físicas y químicas. No obstante, a la fecha, no se encuentra disponible un hidrogel que permita la liberación de PRP diseñado para la OA.

Justificación

Según varios estudios, el PRP retrasa la progresión de la OA estimulando la cascada de curación natural y la regeneración tisular mediante la liberación de factores derivados de las plaquetas en el lugar del tratamiento (Muchedzi, T. A., & Roberts, S. B, 2018). Para lograr que el efecto del PRP sea a largo plazo, es necesario elaborar una tinta de biomaterial que permita la liberación controlada del PRP, y que pueda ser utilizada en la bioimpresión 3D, permitiendo imitar las condiciones de la matriz extracelular del tejido nativo, así como su forma anatómica.

Los aspectos fisicoquímicos y biológicos son los principales a tener en cuenta para la elección del material, con el cual se pretende realizar la biotinta, considerando su funcionalidad como promotor de la regeneración tisular y su biocompatibilidad. Al respecto, el alginato es uno de los biomateriales más usados en aplicaciones de ingeniería de tejido debido a que es un material biocompatible, presenta baja toxicidad y tiene capacidad de gelación, por otra parte, al ser un biomaterial que tiene una estructura similar a la matriz extracelular de los tejidos vivos, permite la liberación de agentes bioactivos como el PRP al ser encapsulado (Fernández, J. M, 2020). La reticulación del alginato se da mediante su interacción con iones catiónicos, por lo que al modular la concentración de dichos iones, se puede modular el grado de reticulación de alginato, lo que permite controlar las características reológicas de la tinta de biomaterial, así como sus características físicas y mecánicas, lo que hace que sea un buen candidato para el diseño de biotintas y su implementación en la impresión de estructuras 3D, mediante mecanismos de extrusión (Sean V. Murphy, Aleksander Skardal, Anthony Atala, 2012).

Con el propósito de diseñar alternativas terapéuticas que permitan de manera personalizada la liberación controlada de PRP, se desarrolla este proyecto, con el objetivo de realizar una biotinta de alginato funcionalizado con PRP, que, a futuro, permita la regeneración y recuperación del tejido con potencial uso para el tratamiento de la OA a largo plazo.

Pregunta problema

¿Cómo diseñar una tinta de biomaterial a partir de alginato funcionalizado con plasma rico en plaquetas para la bioimpresión 3D, que permita la inmovilización de factores de crecimiento con potencial uso para el tratamiento de la osteoartritis?

Objetivo general

Diseñar una tinta de biomaterial para la bioimpresión 3D a partir de alginato, funcionalizado con plasma rico en plaquetas, que permita la inmovilización de factores de crecimiento con potencial uso para el tratamiento de la osteoartritis.

Objetivos específicos

1. Establecer una metodología para la bioimpresión de geles de alginato.
2. Determinar la metodología para la fabricación de una tinta de biomaterial a base de alginato y plasma rico en plaquetas.
3. Evaluar la presencia de los factores de crecimiento en los geles impresos con la tinta del biomaterial a base de alginato y plasma rico en plaquetas.

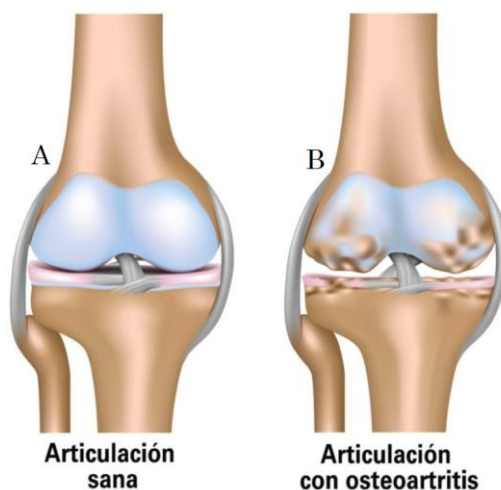
Capítulo 2. Marco teórico

Osteoartritis

Es una enfermedad articular considerada la forma más común de artritis, sus principales síntomas son la degeneración articular, pérdida de cartílago y alteraciones del hueso subcondral (ver Figura 1). Las articulaciones mayormente afectadas son las periféricas, axiales y aquellas que soportan peso. Primero, se manifiesta con la destrucción del cartílago hialino seguido de endurecimiento y formación de espolones óseos en los márgenes articulares causando dolor, deformidad y movimiento articular limitado (Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H., 2016).

Figura 1.

A. Ilustración articulación de rodilla sana. B. Ilustración articulación de rodilla con osteoartritis.



Fuente: Modificada de Percano, G., 2018.

Sus principales causas son: la obesidad, lesiones articulares, la edad avanzada, tensión repetida en la articulación, genética, deformidades óseas y ciertas enfermedades metabólicas.

La OA es comúnmente dividida en dos categorías:

- OA primaria: surge del desgaste articular y no de anomalías predisponentes; se presenta en articulaciones previamente sanas, y puede ser localizada o generalizada

dependiendo de la cantidad de articulaciones que afecte (Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H., 2016).

- OA secundaria: se presenta en articulaciones con factores predisponentes para la degeneración, tales como anomalías congénitas en la estructura o funcionalidad articular, traumatismo, depósito de cristales, presencia de cartílago anormal y enfermedad inflamatoria (Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H., 2016).

El nivel de OA presentado en un paciente se determina por medio de radiografías de la articulación afectada; Las articulaciones con aspecto normal y poco estrechamiento del espacio articular, presentan un alto nivel de dolor; en cambio, las articulaciones con una alta deformidad pueden presentar un dolor más bajo (Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H., 2016).

Plasma rico en plaquetas

El PRP es un material biológico obtenido de sangre venosa que contiene una concentración de plaquetas por encima de la línea de base (150.000-350.000/ μ L). Este compuesto principalmente contiene diversos factores de crecimiento entre los cuales se destacan el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1), que son nativos dentro de un coágulo como portador (I-Kung, Borg, & Díaz, 2016). El coágulo se compone de fibrina, fibronectina y vitronectina, las cuales son unas moléculas de adhesión celular necesarias para la migración celular, sin embargo, contiene las mismas concentraciones de estas moléculas que un coágulo de sangre normal (200 μ g-400 μ g / ml), por lo tanto, no es un pegamento de fibrina ni un material osteoinductivo (Marx, Robert E. DDS, 2001).

El PRP, actúa sobre las células capaces de regenerar el tejido, al producir mitogénesis y angiogénesis. También, induce la formación de hueso mediante las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), cuando actúa por un tiempo prolongado (Marx, Robert E. DDS, 2001).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas y péptidos reguladores que se expresan como moléculas de señalización implicadas en el proceso de comunicación de paracrinas (Intercellular Signaling Peptides and Proteins - MeSH - NCBI., 2003).

Sus funciones principales son la estimulación de la proliferación celular, la supervivencia celular, la estimulación de la migración celular y la diferenciación celular. Estas funciones se regulan por la transcripción de genes pro-factores de crecimiento y su consecuente traducción, la modulación de la transducción de señal por el receptor, y el control de la respuesta celular (Intercellular Signaling Peptides and Proteins - MeSH - NCBI., 2003).

En el caso del tratamiento para la osteoartritis, los factores de crecimiento mayormente utilizados son: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante b1 (TGF-b1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Marx, Robert E. DDS, 2001). Es importante destacar, que estos factores, pueden ser liberados a partir del PRP.

Andamios

También conocidos como scaffolds, son considerados como una matriz extracelular artificial, guía a las células a crecer, sintetiza la matriz extracelular y facilita la formación de tejidos funcionales. Los andamios pueden ser fabricados a partir de materiales naturales o

artificiales, y debe lograr una estructura similar al tejido que se busca reemplazar o imitar (Ma, P. X., 2004).

Características de los andamios

- Porosidad: debe tener una alta porosidad y un tamaño de poro adecuado (O'Brien, 2011).
- Biodegradabilidad: debe tener una tasa de degradación adecuada, con el fin de permitir que el andamio cumpla las funciones de la matriz que va a reemplazar (Bayona, 2020).
- Propiedades mecánicas: debe cumplir con las propiedades mecánicas para mantener la estructura de tejido prediseñada, para ello, debe mantener una integridad mecánica (Bayona, 2020). Las propiedades mecánicas comúnmente se evalúan con pruebas de tensión y compresión, que consisten en someter a la muestra a una carga uniaxial creciente hasta que ocurre la falla o fractura. La prueba de tensión, consiste en sujetar extremos opuestos de la muestra separándolos, mientras que la prueba de compresión consiste en someter la muestra a una carga produciendo una acción aplastante (S.J.V. Franklanda, V.M. Harikb, G.M. Odegarda, 2003).
- Biocompatibilidad: se debe usar un biomaterial que no presente respuesta pro-inflamatoria o citotóxica, una vez esté en contacto con el tejido, para así permitir que las células cumplan su función (O'Brien, 2011).

Tinta de biomaterial

La tinta de biomaterial o biotinta es un compuesto fabricado para la bioimpresión 3D de estructuras capaces de regenerar tejidos y órganos (Monika Hospodiuk et al., 2016); dichas biotintas, permiten que se deposite de forma simultánea un biomaterial y células en la bioimpresora, obteniendo estructuras personalizadas y con la posibilidad de tener varios tipos de células en una misma estructura impresa logrando así una alta densidad celular (Hözl, et

al, 2016). Para la fabricación de la tinta de biomateriales utilizan dos metodologías principalmente, las cuales son:

- Biotintas a base de hidrogeles, en los cuales se fabrican andamios de hidrogel con células o andamios de materiales exógenos. Tienen como ventaja que permiten la proliferación y crecimiento celular facilitando la formación de tejido (Monika Hospodiuk et al., 2016).
- Biotintas a base de células, los cuales se imprimen sin uso de materiales exógenos, es decir, no cuenta con un andamio, lo cual simula el proceso embrionario. Se requiere transformar las células en neo-tejidos, luego, dichos neo-tejidos se depositan en patrones específicos que se fusionan y maduran para la fabricación de tejidos funcionales a mayor escala (Monika Hospodiuk et al., 2016).

Hidrogel

Los hidrogeles se consideran una red polimérica reticulada e hinchada por agua, la cual es producida por la reacción de uno o más monómeros (Ahmed, 2013).

Los hidrogeles son utilizados en la ingeniería de tejidos para varias aplicaciones, tales como la administración de fármacos, lentes de contacto y apósitos para heridas. Dichos compuestos son capaces de imitar el entorno del tejido nativo, ya que, dependiendo del material, tienen algunas características esenciales de los componentes de la MEC (matriz extracelular), las cuales, permiten la encapsulación celular en un estado altamente hidratado (Monika Hospodiuk et al., 2016). Los hidrogeles sintéticos han sido los más usados últimamente en comparación con los naturales, esto debido a su larga vida útil, alta capacidad de absorción de agua y alta fuerza de gel, también cuentan con estructuras bien definidas que permiten ser modificadas para obtener una degradabilidad y funcionalidad adaptable. (Ahmed, 2013)

Mecanismos de reticulación de los hidrogeles

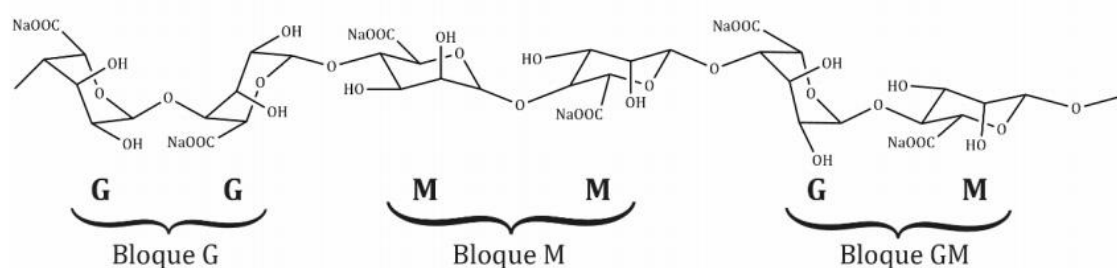
- **Reticulación física:** Los hidrogeles con reticulación física se crean mediante interacciones intermoleculares reversibles, y se presenta en polímeros que no requieren agentes exógenos para su reticulación, lo cual disminuye el riesgo de contaminación química o toxicidad inducida químicamente, además, estos hidrogeles pueden ser usados para la encapsulación de células, proteínas y otros productos biológicos gracias a sus propiedades de autorreparación y capacidad de ser inyectados a temperatura ambiente (Monika Hospodiuk et al., 2016). Algunos de los mecanismos de reticulación física más conocidos son la reticulación de hidrogel por interacciones iónicas/electrostáticas, reticulación de hidrogel por interacciones hidrofóbicas, reticulación de hidrogel por cristalización, reticulación de hidrogel por enlace de hidrógeno, reticulación de hidrogel por coordinación de metales, y reticulación de hidrogel por interacciones huésped-huésped (Weikang Hu et al, 2018).
- **Reticulación química:** Se presenta en enlaces covalentes entre cadenas de polímeros, a menudo proporcionan una mejor estabilidad mecánica que los que presentan reticulación física, sin embargo, al requerir agentes exógenos para su reticulación pueden inducir reacciones indeseables en el hidrogel, o presentar citotoxicidad (Monika Hospodiuk et al., 2016). Las principales formas de reticulación química son reticulación de hidrogel por fotopolimerización, reticulación de hidrogel por reacciones catalizadas por enzimas, reticulación de hidrogel por “clic químico”, reticulación de hidrogel por reacción de Diels-Alder, reticulación de hidrogel por formación de base de Schiff, reticulación de hidrogel por reticulación de oxima, reticulación de hidrogel por adición de Michael, reticulación de hidrogel por química covalente dinámica (Weikang Hu et al, 2018).

Alginato

Es un polisacárido natural aniónico y no ramificado de una familia de copolímeros naturales de β -D-ácido manurónico (M) y α -ácido L-gulurónico (G), el cual se obtiene de algas pardas o bacterianas (Zhang, J et al., 2019). El alginato, es un hidrogel altamente empleado en aplicaciones de ingeniería de tejido debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y capacidad de gelación cuando se entrecruza con cationes covalentes. Cuenta con diferentes métodos de entrecruzamiento para su preparación, y permite un medio húmedo, de tal forma que el riesgo de infección se reduce (Yao, B et al., 2019).

Figura 2.

Estructura química del alginato



Nota: El alginato está constituido por dos tipos de monosacáridos, el ácido gulurónico (Bloque G) y el ácido manurónico (Bloque M), también, presenta una zona formada por ácido gulurónico y ácido manurónico alternados (Bloque GM). Estas zonas se unen entre sí por enlaces glucosídicos α (1-4).

Fuente: (Fernández, J. M., 2020)

Reticulación del alginato

El alginato sufre una reticulación iónica en cloruro de calcio (CaCl_2) o soluciones de sulfato de calcio (CaSO_4). Los iones de calcio divalentes forman un puente debido a la

atracción de grupos de ácido carboxílico cargados negativamente entre dos cadenas de alginato vecinas (Faramarzi et al., 2018).

Bioimpresión

Cuando se tienen hidrogeles consistentes, se procede a la bioimpresión, la cual consiste en una técnica usada para ensamblar material biológico o células creando estructuras funcionales como micromatrices de células o estructuras anatómicas tridimensionales (Bioprinting - MeSH - NCBI., 2020). Para la bioimpresión se deben tener en cuenta diferentes parámetros:

- **Velocidad de impresión:** La bioimpresora cuenta con dos velocidades que son la velocidad de la primera capa, y la velocidad de impresión del filamento extruido. Estas dos velocidades deben ser iguales para obtener una mayor fidelidad en el filamento impreso, y un diámetro de filamento similar al diámetro de la boquilla interna (Galeano, 2021).
- **Flujo de material:** Es el volumen de biotinta que transcurre por el extrusor, está directamente relacionado con la presión y velocidad de impresión, controlando así el ancho del filamento a imprimir (Mancha et al, 2020).
- **Resolución de impresión:** La resolución depende del tamaño de la estructura a imprimir, puede ser tejido molecular, celular u órganos (Mironov, V., Reis, N., & Derby, B., 2006).
- **Aspectos físicos de la bioimpresión:** Uno de los aspectos importantes es el efecto que tiene el proceso de impresión sobre el material biológico, ya que puede llegar a afectar el hidrogel o las células. Se deben tener en cuenta requisitos de impresión como la viscosidad, la densidad, la tensión superficial y la velocidad para optimizar el proceso de impresión. Algunos estudios han podido mostrar efectos positivos o negativos que

se obtienen después de la impresión, por ejemplo, al imprimir por extrusión y por láser, las células pueden soportar estas fuerzas sólo bajo algunas condiciones de deposición. El plegamiento molecular, la viabilidad celular y la expresión de los marcadores adecuados son algunas de las características a estudiar antes y después de la bioimpresión (Mironov, V., Reis, N., & Derby, B., 2006).

- **Aspectos biológicos de la bioimpresión:** Se debe estudiar la viabilidad celular durante y después de realizar la bioimpresión, para verificar que no se afecte biológicamente la estructura. Es importante llevar un control sobre estos aspectos biológicos, demostrando que el método de impresión no es tóxico ni dañará irreversiblemente las células y su ADN, también, que las estructuras impresas se ensamblan entre sí, y que sean aptas para perfusión y sobrevivencia in vitro; con un correcto control de estos aspectos, se puede lograr que las estructuras cuenten con funciones e integración de órganos o tejidos (Mironov, V., Reis, N., & Derby, B., 2006).

Tipos de bioimpresión

Hay diferentes tipos de bioimpresión, entre los cuales destaca:

- **Impresión por inyección de tinta:** Utiliza fuerzas térmicas o acústicas para expulsar gotas de tinta en un sustrato, el cual soporta o hace forma de la construcción final. El método térmico consiste en calentar el cabezal de impresión para producir los pulsos de presión necesarios para extraer las gotas de material de la boquilla, sin embargo, representa una desventaja en la viabilidad celular de las tintas debido a las altas temperaturas de trabajo. Por otra parte, el método acústico consiste en un cristal piezoeléctrico, el cual crea una onda acústica dentro del cabezal de impresión, que permite romper la tinta en gotas a intervalos regulares (Sean V Murphy & Anthony Atala, 2014).

- **Impresión por extrusión:** Funciona mediante extrusión controlada robóticamente de un material, el cual se deposita a través de una boquilla obteniendo la impresión de un filamento. Sus métodos más comunes son los sistemas de dispensación neumáticos o mecánicos (pistón o tornillo). Los sistemas de dispensación mecánico proporcionan un control más directo sobre el flujo del material, ya que en los sistemas neumáticos hay un retraso del volumen del gas comprimido. Las impresoras con este tipo de bioimpresión consisten en un sistema de dispensación y una cama base con temperatura controlada (Sean V Murphy & Anthony Atala, 2014).
- **Impresión asistida por láser:** Se basa en los principios de transferencia directa inducida por láser. Consiste en un láser pulsado, un sistema de enfoque, una cinta generalmente de vidrio cubierta con una capa de absorción de energía láser y una capa de material biológico. Funciona generando pulsos del láser sobre la capa absorbente de la cinta con el fin de generar una burbuja de alta presión que impulsa el material biológico hacia el sustrato colector (Sean V Murphy & Anthony Atala, 2014).

Imprimibilidad (Extrusión 3D)

Para evaluar la correcta realización de la bioimpresión 3D se pueden evaluar diferentes parámetros, como los siguientes:

- **Extrudibilidad:** Es considerada la presión mínima requerida para llevar a cabo la impresión de una tinta de biomaterial a un caudal másico arbitrario. Para evaluar este parámetro, se realiza la comparación de la presión programada en la bioimpresora con el valor de masa impreso (Soltan, N et al., 2019).
- **Factor de uniformidad [U]:** Este parámetro se utiliza para determinar la uniformidad de filamentos, para determinarlo se compara la longitud del filamento impreso o experimental con la longitud del filamento teórico, como se puede observar en la

Ecuación 1. Los rangos de valores esperados se pueden visualizar en la Figura 3 (Soltan, N et al., 2019).

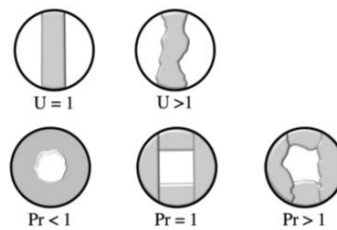
$$U = \frac{\text{longitud filamento experimental}}{\text{longitud filamento teórico}} \quad (1)$$

- **Factor de poros [Pr]:** Este parámetro se utiliza para determinar la imprimibilidad de los poros o cuadrados internos de una malla, se evalúa según el perímetro y área de dichos poros experimentales, como se puede observar en la Ecuación 2. Los rangos de valores esperados se pueden visualizar en la Figura 3 (Soltan, N et al., 2019).

$$Pr = \frac{(\text{perímetro del poro})^2}{16 * (\text{área del poro})} \quad (2)$$

Figura 3.

Rangos de resultados para el factor de uniformidad [U] y el factor de poros [Pr]



Nota: Esquemático de los rangos de resultados para factores de imprimibilidad. Factor de uniformidad (vista superior): <1 tinta sobregelada, =1 tinta perfectamente gelada. Factor de poros: >1 tinta subgelada, <1 tinta sobregelada, =1 tinta perfectamente gelada. Adaptado de “Printability and Cell Viability in Bioprinting Alginate Dialdehyde-Gelatin Scaffolds” por Soltan, N et al., 2019, ACS Biomaterials Science & Engineering.

- **Factor de integridad [I]:** Este parámetro permite determinar la integridad en el grosor de los filamentos, en este caso, se compara el grosor de los filamentos impresos con el grosor de los filamentos teóricos, como se puede observar en la Ecuación 3 (Soltan, N et al., 2019).

$$I = \frac{\text{grosor experimental}}{\text{grosor teórico}} \quad (3)$$

- **Fidelidad del área:** Este parámetro evalúa la fidelidad conseguida en el área de una malla impresa o experimental comparada con el área teórica de dicha malla, permitiendo determinar la difusión obtenida por la tinta de biomaterial, se realiza aplicando la Ecuación 4 (Wu et al., 2018).

$$Fma = \left(1 - \frac{A_t - A_a}{A_t}\right) * 100\% \quad (4)$$

Donde A_t es el área teórica y A_a es el área experimental de los cuadrados internos (poros) de una malla.

- **Circularidad y redondez (circ y round):** Estos parámetros evalúan que tan circular se encuentra impresa una estructura, comparando los valores de área y perímetro obtenidos con el fin de conocer si se obtuvo una estructura con medidas circulares o elípticas. Si el valor es cercano a 1, la estructura impresa tiene forma circular, mientras que al tener un valor cercano a 0, la estructura tendría una forma de elipse. También, el valor de circ, nos permite conocer la imprimibilidad de los hidrogeles fabricados, aplicando la Ecuación 5.

$$Imprimibilidad\ disco = \frac{1}{circ} \quad (5)$$

Hinchamiento de los hidrogeles

Una de las propiedades más distintivas de los hidrogeles es su capacidad de hinchamiento al encontrarse en contacto con un solvente termodinámicamente compatible. Dicha capacidad de hinchamiento, se puede conocer por medio de las relaciones volumétricas de hinchamiento en estado relajado (Q^*) y en equilibrio (Q), las cuales dependen de la relación de volumen del hidrogel antes y después del hinchamiento. Esta relación se puede expresar en términos de las densidades del polímero (ρ_p) y del solvente (ρ_s), tal como se observa en la Ecuación 6 y 7 (Bayona, 2020).

$$Q^* = 1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} * \left(\frac{W_i}{W_d} - 1\right) \quad (6)$$

$$Q = 1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} * \left(\frac{W_s}{W_d} - 1 \right) \quad (7)$$

Donde, W_i es el peso inicial, W_s es el peso hinchado y W_d es el peso seco.

Capítulo 3. Estado del arte

La osteoartritis es el tipo de artritis más común en el mundo considerado un problema de salud pública, por este motivo, se han producido diferentes tratamientos para esta enfermedad; entre estos tratamientos se destaca el uso de PRP, que ha sido ampliamente estudiado e investigado y se han logrado identificar entre sus componentes los factores de crecimiento (GFs) que estimulan la reparación y regeneración tisular (Muchedzi, T. A., & Roberts, S. B., 2018). Es importante resaltar que los efectos beneficiosos del PRP se muestran sólo a corto y mediano plazo (Louis, M. L et al., 2018).

Se han realizado varios estudios sobre el efecto de las inyecciones intraarticulares de PRP en la OA, en los cuales se ha podido concluir que este tratamiento es efectivo para mejorar el estado funcional de la rodilla y los síntomas con el tiempo, sin embargo, se encontró que los tratamientos inyectables pueden generar secuelas infecciosas por lo que se espera la producción de tratamientos con mayor duración sin necesidad de re intervención (Di Martino, A et al., 2018). En otro estudio realizado, se verificó la eficacia de las inyecciones intraarticulares de PRP en cuanto al alivio del dolor y la mejoría de la función física, no obstante, la duración media de dicha mejoría fue de 9 meses, lo que indica que estas inyecciones solo influyen temporalmente en el medio articular (Shen, L., Yuan, T., Chen, S. et al., 2017).

El cartílago tiene una baja capacidad de regeneración, por lo tanto, la aplicación de la ingeniería de tejidos en el tratamiento de la OA es una gran alternativa, ya que el diseño de un andamio junto con una fuente celular adecuada y GFs, podría resultar en un enfoque ideal para superar las limitaciones actuales en la regeneración del cartílago. Un material ideal para la realización de este andamio es el alginato, el cual es uno de los biopolímeros más usados en la ingeniería tisular gracias a su biocompatibilidad y degradabilidad, además, el alginato permite un correcto encapsulamiento de células y proteínas (Mohammad-Hosseini Beigi et al.,

2018). Por lo tanto, se ha planteado el uso del PRP de forma encapsulada con el uso de andamios biodegradables como el que se desarrolló utilizando un sistema de suministro de hidrogel con factores de crecimiento derivados de PRP en alginato, este estudio se planteó para analizar el grado de liberación de los GFs dentro del hidrogel mediante el uso de dos estructuras diferentes (cápsulas y perlas), y se concluyó que los GFs derivados de PRP liberados del hidrogel son osteoinductores y osteoconductores. Además, se pudo observar una diferenciación activa en las células mesenquimales cultivadas en un medio osteogénico, pues presentaron una baja proliferación (Lin, S. S et al., 2006). También, se han realizado diversos estudios fisicoquímicos del efecto del PRP en hidrogeles fabricados de alginato, los cuales han mostrado una buena adaptación al comportamiento de gelificación, la cinética de hinchamiento, la degradación, las propiedades mecánicas y la estructura de la superficie de dichos hidrogeles compuestos. (Xiang Gao et al., 2019)

El PRP, al contener una alta concentración de plaquetas, imita la respuesta del cuerpo humano a una lesión, ya que las plaquetas activadas liberan los GFs y citosinas esenciales que inducen el proceso de curación. Por ejemplo, la entrega local del PRP ha demostrado resultados favorables en el tratamiento de varias enfermedades musculo esqueléticas.

El alginato, es un hidrogel ampliamente utilizado en la bioimpresión 3D, debido a que las tintas fabricadas de este material tienen la posibilidad de combinarse con proteínas o polímeros obteniendo una red polimérica interpenetrante (IPN), también, presenta propiedades gelificantes al mezclarse con una baja concentración de CaCl_2 para formar un alginato pre-reticulado que se utiliza para la bioimpresión para una posterior reticulación con CaCl_2 a mayor concentración. Al obtener una biotinta de alginato con PRP, puede ser usada en la bioimpresión 3D, que es una de las nuevas alternativas implementadas en la ingeniería de tejidos, ya que se pueden producir estructuras que simulan en forma y funcionalidad los tejidos nativos (Choe, G et al., 2019).

En conclusión, la producción de una tinta de biomaterial de alginato funcionalizado con PRP representa una buena alternativa terapéutica para la OA, debido a los efectos curativos de los GFs, así como la funcionalidad del alginato como andamio para la fabricación de dicha tinta permitiendo la degradabilidad y propiedades mecánicas necesarias (Faramarzi et al., 2018).

Capítulo 4. Metodología

Preparación de la tinta de biomaterial de alginato de sodio pre-reticulado

Preparación alginato de sodio

El alginato de sodio, se preparó a una concentración de 2%, 4%, 6% y 8% p/v usando como solvente agua destilada. Las soluciones se homogeneizaron utilizando el agitador magnético a 50°C y 600 rpm durante 24 horas.

Pre-reticulación del alginato de sodio

Para la pre-reticulación del alginato de sodio se preparó CaCl_2 a 40 mM usando como solvente agua destilada. Se usaron 0,058808 g de cloruro de calcio para un volumen final de 100 mL en un balón aforado. La solución se homogeneizó utilizando el agitador magnético a 600 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se mezcló el cloruro de calcio con el alginato de sodio, utilizando una relación de volumen 1:1 para obtener la tinta de biomaterial con una concentración final de 1%, 2%, 3% y 4% p/v de alginato de sodio, pre-reticulada con CaCl_2 a 20 mM.

Impresión de hidrogeles de alginato de sodio

Para la impresión 3D de los hidrogeles de alginato de sodio se utilizó la bioimpresora Dr. INVIVO, en donde se imprimió las diferentes tintas de biomaterial mediante el módulo de impresión por extrusión mecánica Syringe Bio-dispender. Se usó una jeringa de 12 mL y una aguja de 0,02 cm de diámetro interno. La bioimpresora se operó mediante el software NewCreatorK, el cual permitió adaptar los archivos .stl a .gcode además de los parámetros en las estructuras CAD previamente diseñadas en el software SolidWorks.

Antes de realizar la impresión, las jeringas cargadas con la tinta de biomaterial se centrifugaron con el fin de eliminar las micro burbujas. Para centrifugar, se agregaron

aproximadamente 6 mL de la biotinta en la jeringa. En la parte superior se cubrió con parafina, aluminio y cinta, como se observa en la Figura 4, con el propósito de no perder biotinta durante la centrifugación. La jeringa se puso dentro de un tubo de 45 mL con la punta de la jeringa hacia la parte superior del tubo para permitir la fácil extracción del aire y posteriormente se centrifugó a 200 gravedades durante 20 minutos.

Figura 4.

Cobertura de las jeringas para centrifugación.



Las impresiones se realizaron utilizando una temperatura de 30°C en el extrusor y de 20°C en la base. Antes de cada impresión, se realizó una carga inicial (load) de aproximadamente 0,15 mL.

Prueba de caída de filamento

La prueba consistió en colocar la jeringa con la tinta de alginato en la impresora para posteriormente aplicar el valor de load necesario para la extrusión de la tinta y poder visualizar la formación o no formación del filamento e inferir su estado como: subgelada, sobregelada o perfectamente gelada, tal como se observa en la Figura 5, en la cual se distingue que las tintas con subgelación presentan una extrusión a gotas, las tintas con

sobregelación presentan la extrusión de un filamento no homogéneo, y la tinta con adecuada gelación presenta la extrusión de un filamento uniforme.

Figura 5.

Estado de extrusión



Nota: Adaptado de “Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells”, (p. 035020), por Ouyang et al., 2016, Biofabrication.

Análisis de las estructuras impresas a base de alginato

Se imprimieron 3 repeticiones de cuatro estructuras (rejilla, filamento, anillo y disco) por cada una de las concentraciones de la tinta de alginato de sodio. Se utilizó el software ImageJ para calcular las mediciones de los parámetros más significativos, los cuales se pueden observar en la Tabla 4.

Con base en las medidas obtenidas para cada una de las estructuras, se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, tal como se describe posteriormente siguiendo el análisis vía Anova, teniendo en cuenta el promedio y error estándar de las mediciones.

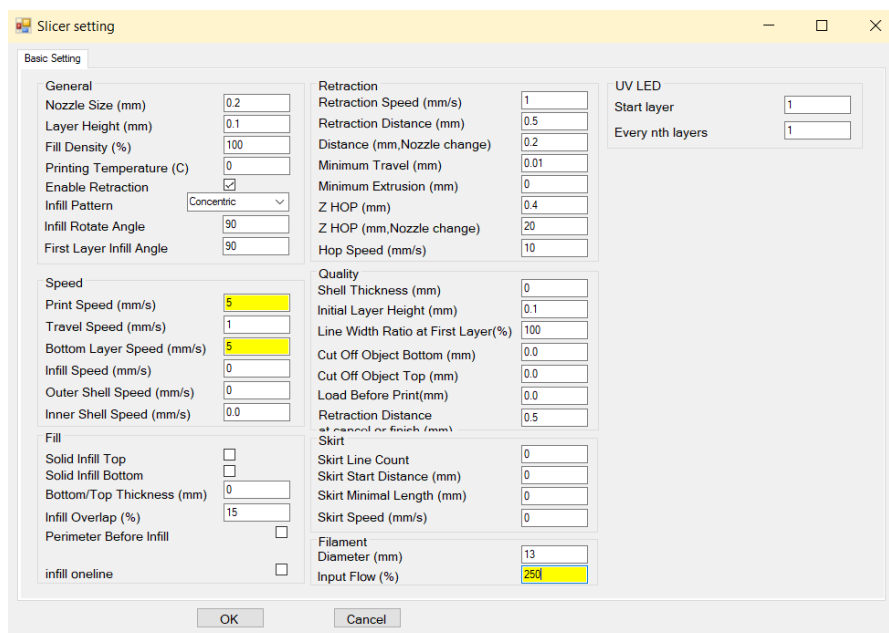
Modificación parámetros de impresión

Una vez se seleccionó la mejor concentración mediante el análisis estadístico, se realizaron impresiones modificando los parámetros de impresión. Se imprimieron rejillas manteniendo los parámetros de impresión predefinidos por NewCreatorK para el filamento INVIVO@GEL, los cuales se pueden observar en la Figura 6, a excepción de la velocidad de

impresión y flujo de impresión. Para cada impresión se realizaron 3 repeticiones variando la velocidad en un rango entre 1 mm/s y 10 mm/s; y el flujo en un rango entre 200% y 500%.

Figura 6.

Parámetros de impresión INVIVO@GEL



Nota: Los parámetros subrayados en amarillo, fueron los dispuestos para la variación y posterior estandarización de los mismos.

En la tabla 1 se observan las combinaciones que se realizaron, realizando 3 repeticiones en cada una.

Tabla 1.

Variación parámetros de impresión

| Velocidad / Flujo | Velocidad / Flujo | Velocidad / Flujo |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| 2 mm/s – 250% | 2 mm/s – 350% | 2 mm/s – 450% |
| 5 mm/s – 250% | 5 mm/s – 350% | 5 mm/s – 450% |
| 10 mm/s – 250% | 10 mm/s – 350% | 10 mm/s – 450% |

Posteriormente, se realizaron las mediciones de las rejillas impresas utilizando el software ImageJ, con el fin de realizar el análisis estadístico del promedio, error estándar, imprimibilidad (Ecuación 2) y fidelidad del área (Ecuación 4). Sin embargo, al obtener resultados similares entre dos velocidades distintas, se decidió realizar un segundo análisis imprimiendo anillos y discos, obteniendo los valores de promedio, error estándar e imprimibilidad del disco (Ecuación 5).

Para todas las estructuras impresas, se realizaron análisis estadísticos vía Anova, con el fin de identificar cual parámetro presenta diferencias no significativas con los valores teóricos del modelo CAD.

Prueba de fusión de filamentos

La realización de esta prueba se realizó la tinción de la tinta de biomaterial con colorantes a base de agua (verde y fucsia), los cuales fueron mezclados manualmente con la tinta, para posteriormente realizar la impresión de doce capas de un patrón serpenteante. De la primera a la sexta capa de alginato se tinturaron de verde, y de la séptima a la doceava capa de fucsia, con el fin de facilitar la visualización y determinar si la tinta fabricada presenta fusión en sus filamentos a medida que se realiza la impresión. Se usaron los parámetros de impresión estandarizados.

Obtención de PRP

Se obtuvieron aproximadamente 10 mL de sangre venosa periférica de 5 voluntarios en tubos que contienen citrato de sodio como anticoagulante. Las muestras obtenidas se agitaron durante 30 minutos y posteriormente se colocaron a centrifugar a 300 gravedades durante 5 minutos a 18° C (primera centrifugación). Luego, se retiró el sobrenadante de plasma en tubos falcon de 15 mL teniendo en cuenta la cantidad extraída de plasma por muestra; dichos tubos se centrifugaron a 700 gravedades durante 17 minutos a 18°C, luego se les extrajo el restante

de plasma pobre en plaquetas (PPP) dejando las plaquetas en el fondo del tubo. Para finalizar, se agregó 300 μL de PPP por cada mL obtenido en la primera centrifugación.

Preparación de tinta de alginato funcionalizada con PRP

Para los procesos de estandarización y curva de aprendizaje, se realizó el proceso de estandarización con PPP, el cual se obtiene en mayores cantidades que el PRP. Para esto, se agregaron 4 mL de PPP en un tubo falcon de 15 mL, y se agregó alginato de sodio en polvo, hasta alcanzar una concentración de 3% p/v. La disolución del alginato en PPP se realizó de manera manual, haciendo uso de una espátula, y vortex a 3000 rpm. Posteriormente, se prosiguió a incorporar el CaCl_2 a 0,2% p/v, el cual fue previamente triturado haciendo uso de un mortero para obtener una menor granulometría de dicho componente, luego, se fue incorporando poco a poco en la biotinta mientras se mezclaba manualmente con una espátula, de tal forma que se evitaran los grumos o microgeles. La biotinta obtenida fue dispuesta en una jeringa de 12 mL para su posterior impresión; la eliminación de las microburbujas se realizó en este caso de forma manual, se tapó la jeringa, permitiendo crear un vacío junto con el émbolo, el cual se extraía e introducía para generar presión en la tinta logrando explotar la mayor cantidad de microburbujas posibles.

Imprimibilidad de la tinta de alginato funcionalizada con plasma

Se imprimieron 3 repeticiones de cada objeto simulado (rejillas y discos) a una velocidad de 5 mm/s con un flujo de 250% y con las medidas que se visualizan en la Figura. A dichas estructuras se les realizaron las mediciones que se nombran en la Tabla 4, haciendo uso del software ImageJ, tal como se puede visualizar en la Figura 7; como control se usó tinta de biomaterial sin PRP.

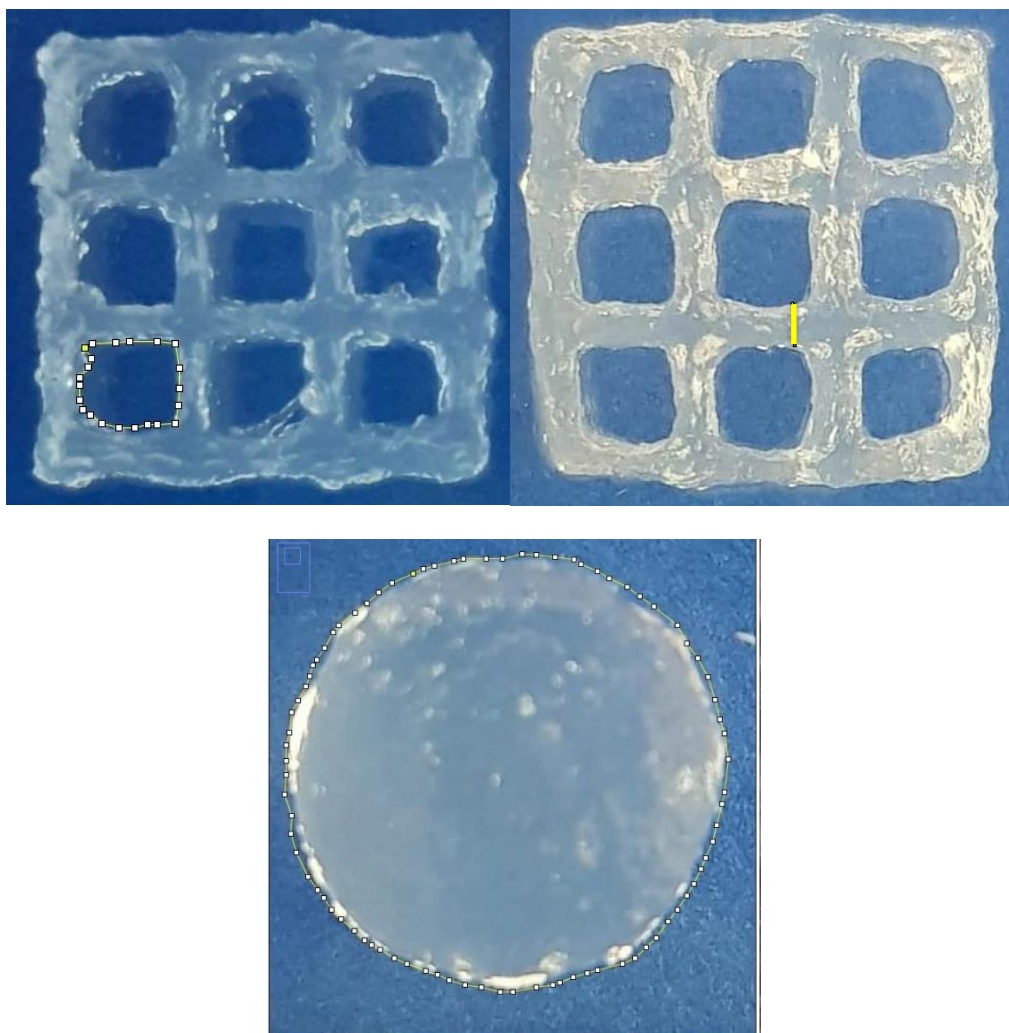
Cada una de las mediciones fueron analizadas vía Anova para la determinación de las diferencias significativas con los valores teóricos, además, se realizó el cálculo de

imprimibilidad y fidelidad del área siguiendo la Ecuación 2 y 4, respectivamente, para las rejillas, y el cálculo de imprimibilidad del disco siguiendo la Ecuación 5.

Figura 7.

Mediciones rejilla y disco en ImageJ. A. Cuadrado interno rejilla. B. Grosor filamento rejilla.

C. Disco



Cuantificación de proteínas

Para determinar la correcta inmovilización de los factores de crecimiento en la tinta de alginato, se realizó una cuantificación de proteínas haciendo uso del NanoDrop, a una longitud de onda de 280 nm. Para esta cuantificación, se realizó la impresión de tres rejillas y discos a una velocidad de 5 mm/s con un flujo de 250%, posteriormente fueron reticuladas en

un baño de CaCl_2 a 100 mM o 300 mM durante 16 horas, luego, se retiró dicho baño de CaCl_2 y se les realizó un lavado a las estructuras reticuladas con PBS, para finalmente ser colocadas en tubos eppendorf con 0,5 mL de agua destilada para permitir su degradación a 37° C. La cuantificación de proteínas se realizó en el NanoDrop tomando 2 μL de la solución obtenida tanto de las estructuras impresas con la tinta de alginato funcionalizada con PRP, así como de la tinta de alginato de control.

Hinchamiento de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP

Se imprimieron 3 discos a una velocidad de 5 mm/s con un flujo de 250%, a los cuales se les registró su peso inicial (W_i), posteriormente, se colocaron en un baño de CaCl_2 durante 16 horas a temperatura ambiente para permitir su reticulación e hinchamiento. Luego de transcurrido este tiempo, se procedió a realizar dos lavados de 10 minutos a las estructuras con PBS, después se secó suavemente cada estructura para realizar el registro del peso hinchado (W_s). Por último, cada estructura se secó en un horno de convección a 37°C durante 72 horas para obtener el valor de peso seco (W_d). Se realizó el mismo procedimiento para 3 repeticiones de discos de la tinta de alginato de control.

Propiedades mecánicas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP

Se realizó la impresión de 3 discos y 3 anillos a una velocidad de 5 mm/s con un flujo de 250%, los cuales fueron puestos en un baño de CaCl_2 durante 16 horas con el fin de evaluar sus propiedades mecánicas bajo ensayos de tensión (anillo) y compresión (disco), utilizando un banco de carga (ElectroForce 3200 Serie III) equipado con una celda de carga de 2,5 N. Sin embargo, ya que los discos presentaban un grosor muy bajo, no pudieron ser evaluado bajo en ensayo de compresión, por lo tanto, se realizó solamente el ensayo de tensión a los anillos impresos.

En las pruebas de tensión, el módulo elástico se determinó mediante el método de anillo, validado por C.P. Johnson et al (Johnson et al., 2000), el cual consistió en colocar los anillos impresos en soportes personalizados en el banco de carga para una posterior deformación a una velocidad de 1 mm/s hasta conseguir la fractura de la estructura. La tensión aplicada se calculó como se observa en la Ecuación 8.

$$\sigma = F/A \quad (8)$$

Donde F es la fuerza medida y A es el área superficial de las estructuras fabricadas ($A=2WH$, donde W es el ancho y H es el grosor medido del anillo).

La deformación se calculó como la relación entre el desplazamiento final del equipo y la longitud inicial de la estructura, el módulo de elasticidad se determinó como la pendiente de la porción lineal de la curva tensión-deformación. Cabe aclarar que la prueba de tensión se realizó solo con los anillos fabricados con la tinta de biomaterial funcionalizada con PRP, debido a que los anillos fabricados con la tinta de control se degradaron al realizar los lavados de PBS previos a la realización de la prueba.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como la media aritmética de los valores \pm error estándar. Se utilizaron técnicas de comparación de medias, utilizando análisis de varianza vía (ANOVA) y prueba post test de Bonferroni. Para el análisis se tomaron las siguientes consideraciones:

- $p < 0.05$ son valores significativos.
- Tres réplicas por experimento ($n=3$)
- Repetición independiente para comprobar la reproducibilidad de los resultados.

Capítulo 5. Resultados y Análisis de Resultados





Resultados

Preparación de la tinta de biomaterial de alginato

Con el fin de determinar la mejor concentración de alginato como tinta de biomaterial a ser funcionalizada con PRP, se prepararon diferentes soluciones de alginato (1%, 2%, 3% y 4% p/v), las cuales fueron sometidas a una prueba de caída de filamento para verificar visualmente cuáles se encontraban sub-geladas, sobre-geladas o con una gelación adecuada. En la Tabla 2 se puede observar que las concentraciones del 1% y 2% son extruidas en forma de gota, en cambio las concentraciones del 3% y 4% son extruidas en forma de filamento.

Tabla 2.

Caída de filamento para cada una de las concentraciones de alginato.

| Alginato 1% | Alginato 2% | Alginato 3% | Alginato 4% |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |

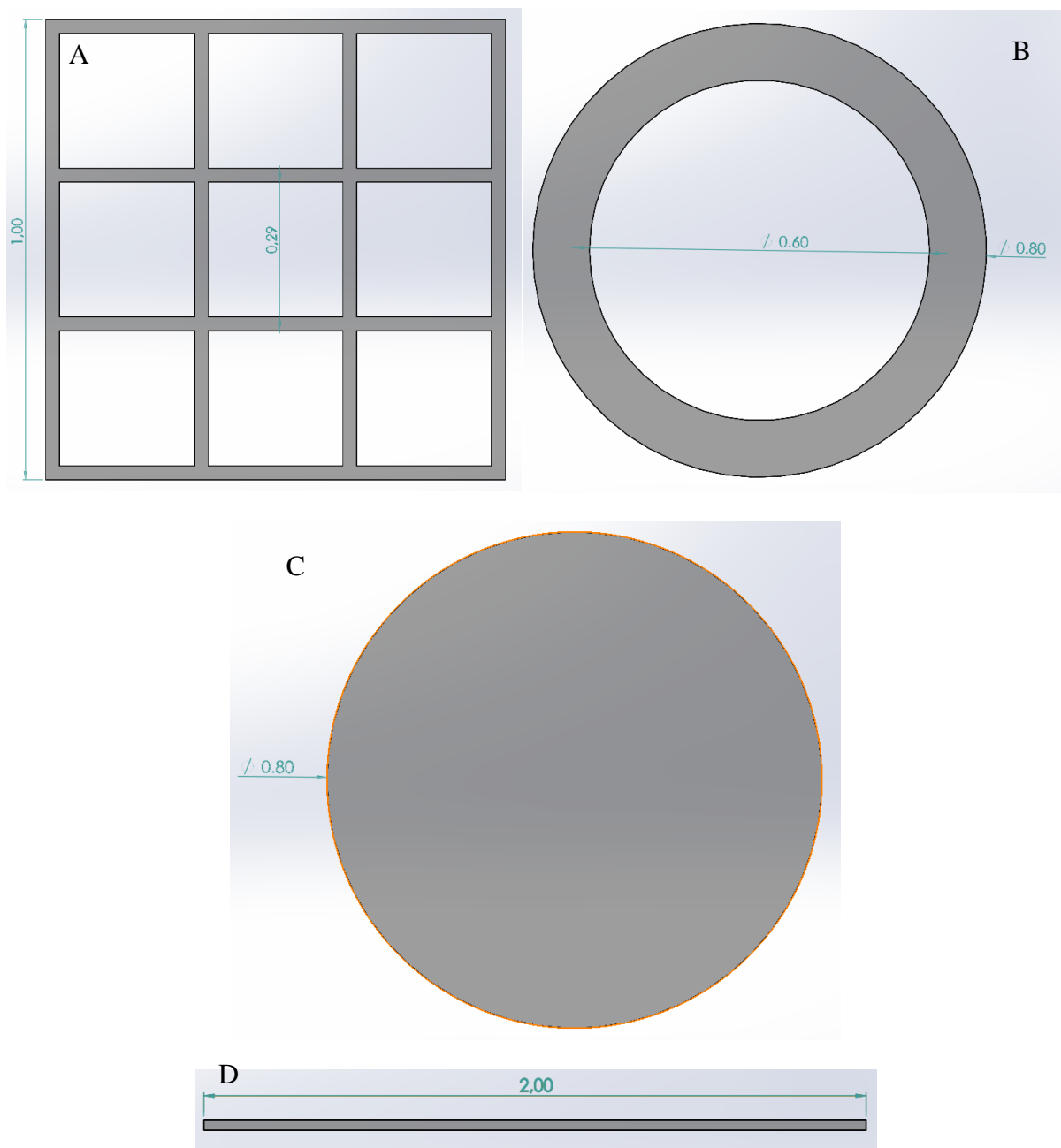
Bioimpresión 3D de la tinta de biomaterial de alginato

Para complementar la prueba de caída presentada anteriormente se realizó un análisis más a fondo de cada una de las concentraciones realizadas. Se realizó la bioimpresión de tres repeticiones de cuatro estructuras (anillos, discos, rejillas y filamentos) con una velocidad de

2 mm/s y un flujo de 250% (valores predeterminados de NewCreatorK para INVIVO@GEL), todas las impresiones fueron realizadas con una temperatura en el extrusor de 30°C y en la cama de 20°C haciendo uso de una aguja con punta de silicona de 0,02 cm de grosor; las estructuras fueron diseñadas haciendo uso del software SolidWorks, como se puede observar en la Figura 8.

Figura 8.

Estructuras diseñadas para bioimpresión 3D. A. Rejilla. B. Anillo. C. Disco. D. Filamento



Nota: Todas las estructuras se diseñaron con una altura de 0,1 cm. Las medidas presentadas en las figuras (números en azul) se encuentran en centímetros.

Para cada una de las estructuras, se realizó un análisis de imágenes usando ImageJ, y se obtuvieron las medidas descritas en la Tabla 3 para cada estructura, obteniendo así los datos más significativos para la selección de la concentración. Se calculó el promedio de los datos obtenidos para las tres repeticiones, con el fin de realizar la comparación entre los resultados obtenidos para cada concentración y las medidas teóricas de cada estructura, dichos datos se pueden observar en el Anexo 1.

Tabla 3.

Medidas obtenidas para cada estructura.

| Estructura | Medidas |
|-------------------|---|
| Anillos | Área del círculo interno, round del círculo interno. |
| Discos | Área, round e imprimibilidad. |
| Rejillas | Área del cuadrado interno, grosor del filamento, imprimibilidad y fidelidad del área. |
| Filamentos | Área y grosor. |

Imprimibilidad de la tinta de biomaterial de alginato

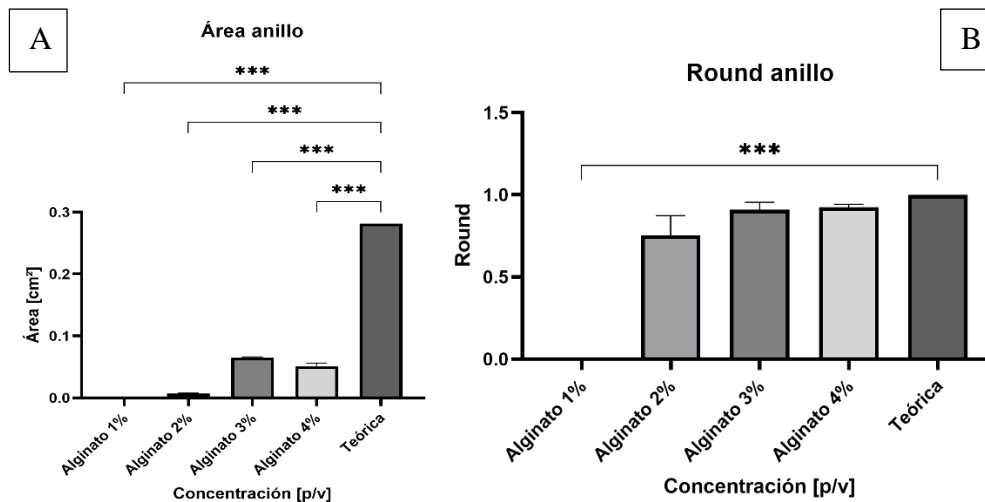
Imprimibilidad para anillos de alginato

Los anillos fueron impresos con una altura de 0,4 cm. Como se puede observar en la Figura 9, el valor de área obtenido difiere del valor de área teórico ($p < 0.001$), esto debido al nivel de altura de la estructura, ya que al realizar la impresión de varias capas se va disminuyendo el área del círculo interno del anillo. Sin embargo, mantienen su forma circular como se puede visualizar en la Figura 9B, en la cual no presentan diferencias significativas

con los valores teóricos. La concentración del 1% no pudo ser analizada, debido a que los anillos impresos con dicha tinta no pudieron mantener el círculo interno.

Figura 9.

A. Gráfica de área del círculo interno del anillo. B. Gráfica de round del círculo interno del anillo.



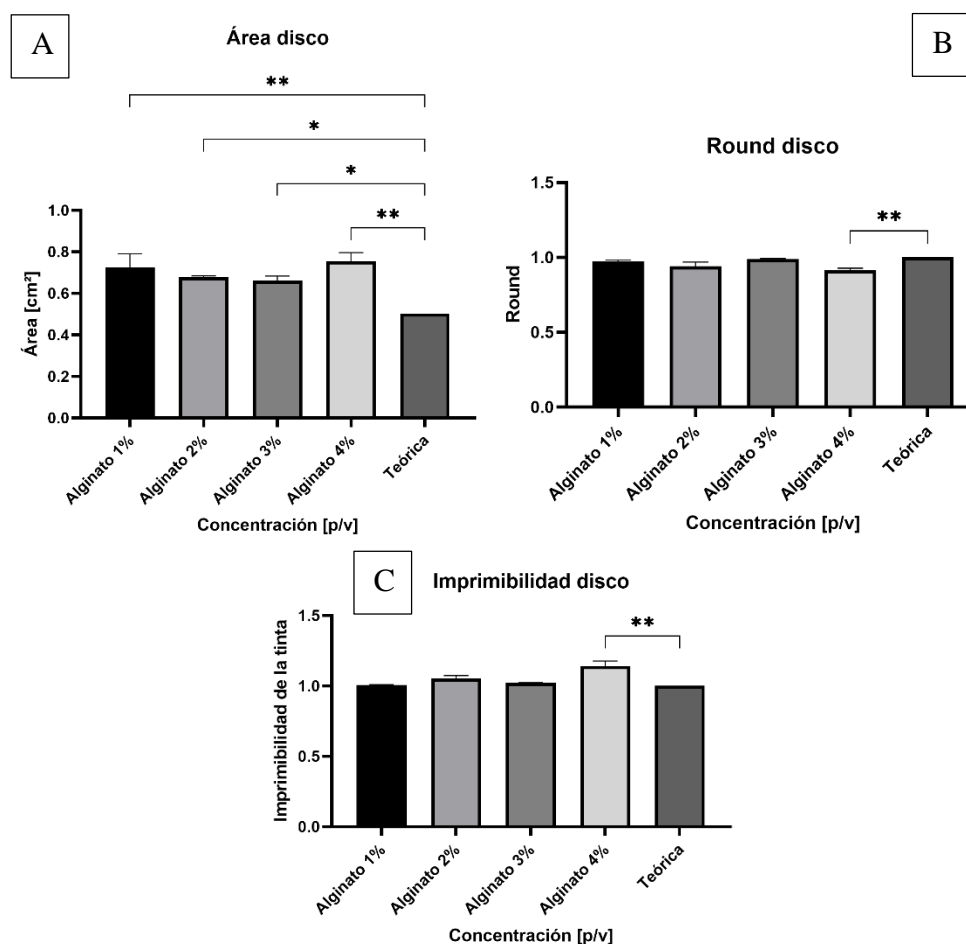
Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, *** para $p<0.001$.

Imprimibilidad de discos de alginato

Los discos fueron impresos con una altura de 0,2 cm. El análisis realizado a estas estructuras se puede observar en la Figura 10. Las concentraciones con los valores de imprimibilidad más acertados fueron las de 1%, 2% y 3%, debido a que obtuvieron una circularidad más precisa, en cambio, la concentración de 4% difirió significativamente de los valores teóricos ($p<0.002$). En cuanto al área, las concentraciones con menor diferencia a los valores teóricos fueron las de 2% y 3% ($p<0.033$).

Figura 10.

A. Grafica área del disco. B. Grafica round del disco. C. Grafica imprimibilidad del disco.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, * para $p<0.033$, ** para $p<0.002$.

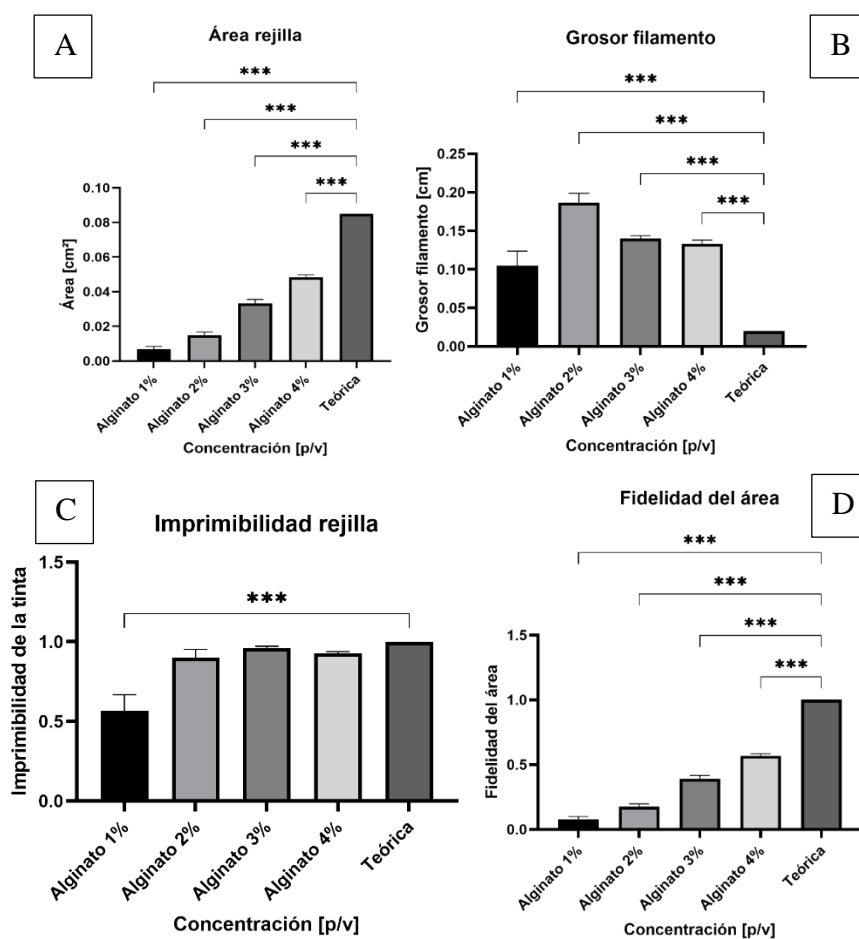
Imprimibilidad de rejillas de alginato

Las rejillas se imprimieron con una altura de 0,2 cm. El análisis realizado a estas estructuras se puede observar en la Figura 11. Las concentraciones con valores de imprimibilidad más cercanos a los teóricos, fueron las de 2%, 3% y 4%, debido a que, en dichas concentraciones, la tinta se encontraba más gelada, lo que permitió una mayor conservación de los cuadrados internos presentando diferencias no significativas con los valores teóricos, en cambio, en la concentración de 1%, se presentó una alta diferencia con los

valores teóricos ($p < 0.001$), ya que al ser menos gelada, no se mantenía la forma de todos los cuadrados internos que componen la rejilla, tal como se observa en la Figura 12A para la tinta de 1% y 12B para la tinta de 2%, debido a que al realizar varias capas de impresión la tinta se iba derritiendo por la sub-gelación presentada. En cuanto al resto de mediciones realizadas (área, grosor de filamento y fidelidad del área), se puede observar una alta diferencia con los valores teóricos ($p < 0.001$), ya que al realizar varias capas se iba disminuyendo el área de los cuadrados internos de la rejilla, lo cual se ve directamente afectado también en el grosor de filamento y la fidelidad del área.

Figura 11.

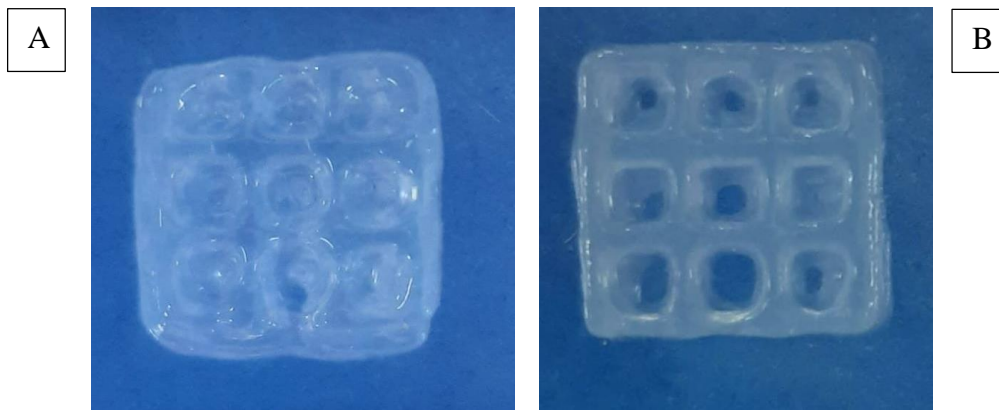
A. Gráfica del área del cuadrado interno de la rejilla. B. Gráfica de grosor de filamento del cuadrado interno de la rejilla. C. Imprimibilidad de la tinta. D. Fidelidad del área.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=27$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, *** para $p<0.001$.

Figura 12.

A. Rejilla recién impresa con biotinta de alginato al 1%. B. Rejilla recién impresa con biotinta de alginato al 2%.



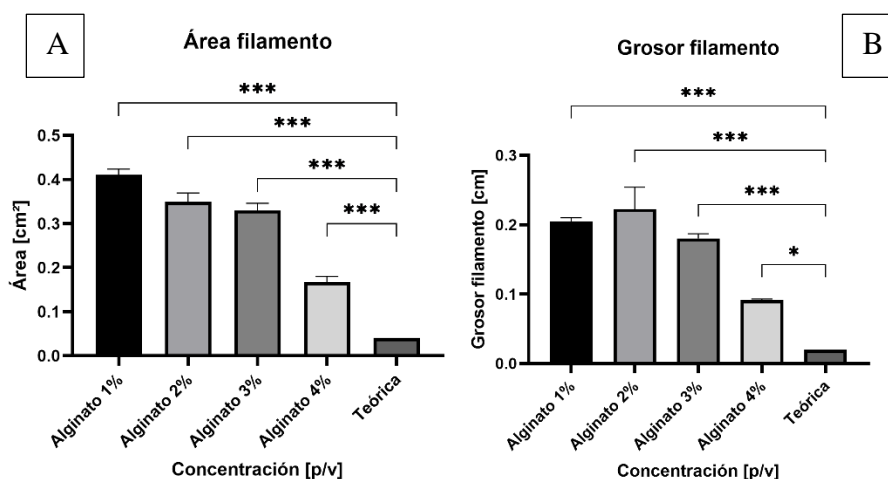
Nota: Las rejillas impresas con estas concentraciones no mantuvieron la forma de todos los cuadrados internos, debido a que al ser subgeladas se derretían a medida que se imprimían las capas correspondientes.

Imprimibilidad de filamento de alginato

Los filamentos se imprimieron con una altura de 0,2 cm. El análisis realizado a estas estructuras se puede visualizar en la Figura 13. La concentración más cercana a los valores teóricos fue la de 4% ($p<0.033$). Las concentraciones de 1%, 2% y 3% presentaron una alta diferencia con los valores teóricos ($p<0.001$), ya que a medida que iba imprimiendo las capas correspondientes se aumentaba el grosor del filamento significativamente.

Figura 13.

A. Gráfica de área de filamento. B. Gráfica de grosor de filamento.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para n=3 muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p < 0.033$, *** para $p < 0.001$.


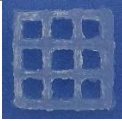
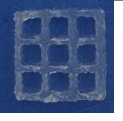
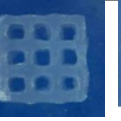
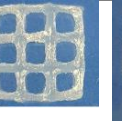
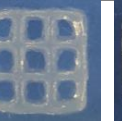
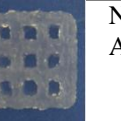
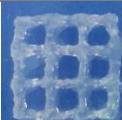
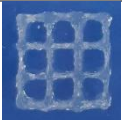
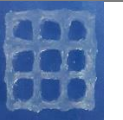
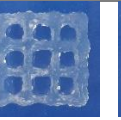
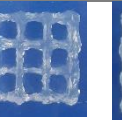
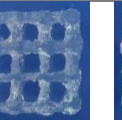

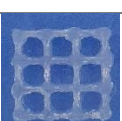
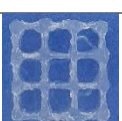
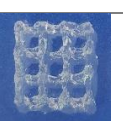
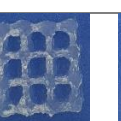
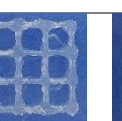
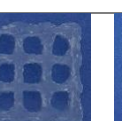

Acorde a los análisis de imprimibilidad descritos anteriormente para cada una de las estructuras, la concentración más apta para la fabricación de la tinta de biomaterial de alginato fue la del 3% p/v, ya que presenta menores diferencias significativas con los valores teóricos, así como menor variabilidad en sus datos.

Estandarización parámetros de impresión

Se realizó la estandarización de los parámetros de impresión variando la velocidad de impresión (2, 5 y 10 mm/s) y el flujo de salida (250, 350 y 450%). Esta estandarización, se realizó imprimiendo rejillas, debido a que son las estructuras que nos brindan una mayor cantidad de datos significativos.

Como se observa en la Tabla 4, se realizaron 3 repeticiones por cada una de las combinaciones de parámetros correspondiente, sin embargo, las impresiones realizadas con un flujo de 450% resultaron con un grosor visualmente más grande de lo esperado, por lo tanto, se decidió no tener en cuenta dicho parámetro.

Tabla 4.*Variación parámetros de impresión.*

| Velocidad de impresión | Flujo | | | | | | N/A | N/A | |
|------------------------|---|---|---|---|--|---|---|-----|-----|
| | 250% | | 350% | | 450% | | | | |
| 2 mm/s |  |  |  |  |  |  |  | N/A | N/A |
| 5 mm/s |  |  |  |  |  |  |  | N/A | N/A |
| 10 mm/s |  |  |  |  |  |  |  | N/A | N/A |

Las rejillas impresas según cada parámetro fueron analizadas utilizando el software ImageJ, para evaluar el área, grosor de filamento, imprimibilidad y fidelidad del área de las muestras comparadas con el diseño de rejilla teórica, como se observa en la Figura 14.

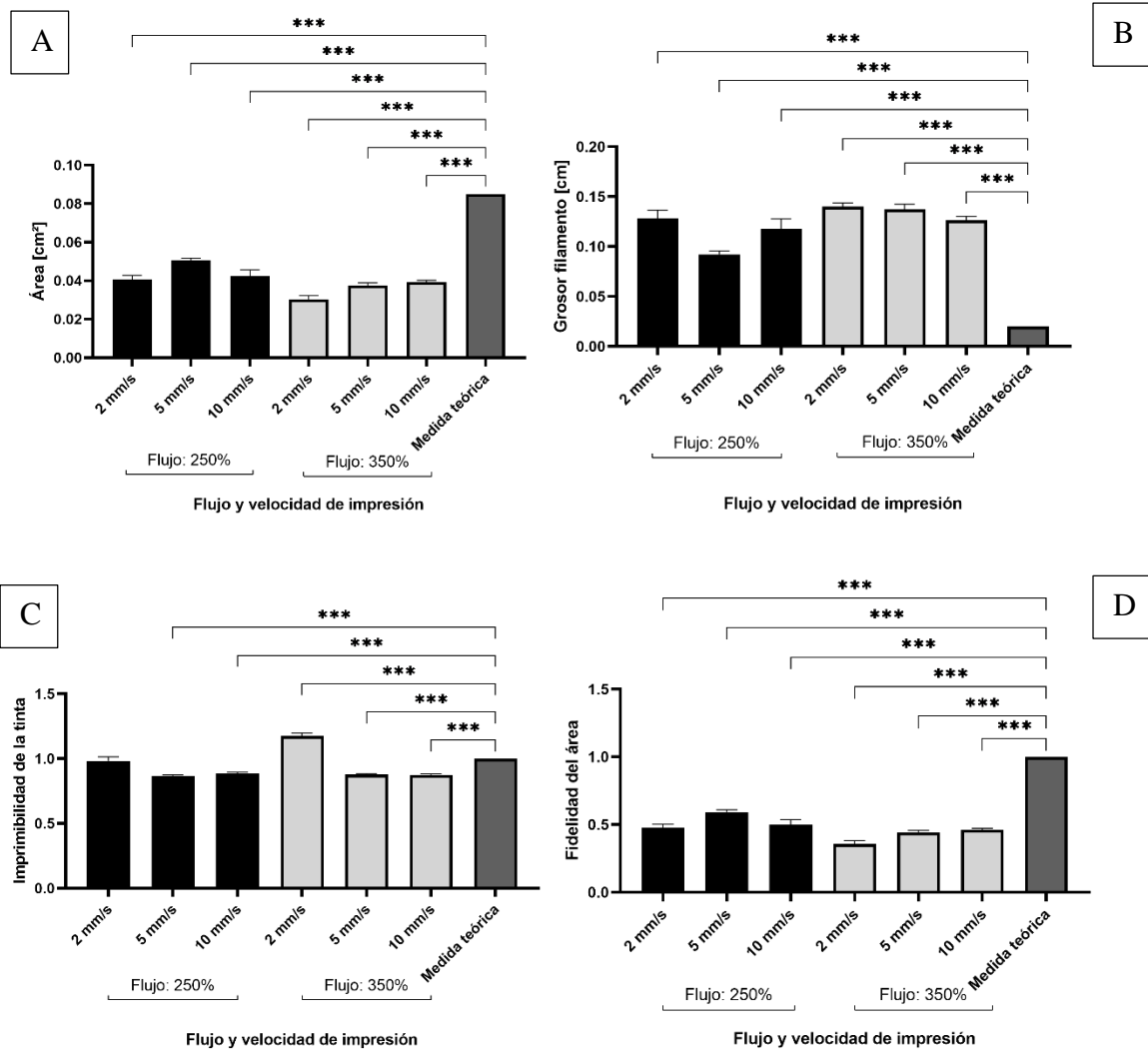
Todas las mediciones fueron significativamente diferentes, al ser comparados con la medida teórica ($p < 0.001$), a excepción de la imprimibilidad de las rejillas impresas a 2 mm/s y 250% que obtuvo una diferencia no significativa, sin embargo, dicha combinación de parámetros presentó una alta variabilidad en sus datos, lo cual nos permitió concluir que no presenta una buena reproducibilidad, por lo tanto, se decidió realizar un segundo análisis de los parámetros de impresión acotando los parámetros a evaluar al flujo de 250% y las velocidades de 5 y 10 mm/s, evaluando el efecto de estos parámetros en la impresión de anillos y discos, como se observa en la Tabla 5.

Figura 14.

Variación parámetros de impresión. A. Medición área cuadrado interno vs medidas teóricas.

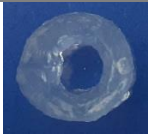
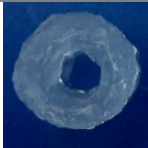
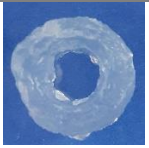

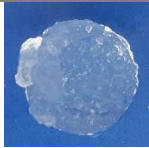


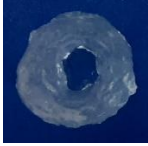
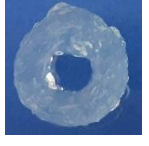
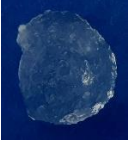
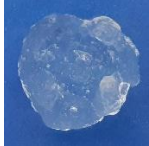
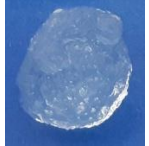
B. Medición grosor del filamento vs medidas teóricas. C. Imprimibilidad de la tinta vs

medidas teóricas. D. Fidelidad del área vs medidas teóricas.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=27$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, *** para $p<0.001$.

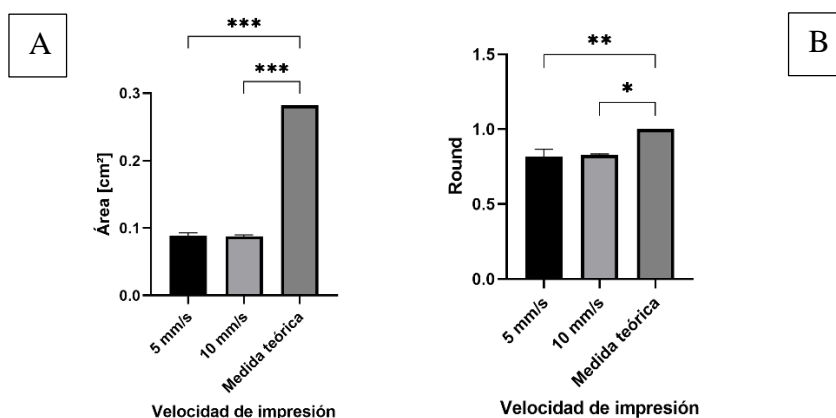
Tabla 5.*Variación velocidad de impresión.*

| Velocidad | ANILLOS | | | DISCOS | | |
|-----------|---|---|---|--|---|---|
| de | FLUJO: 250% | | | | | |
| impresión | | | | | | |
| 5 mm/s |  |  |  |  |  |  |
| 10 mm/s |  |  |  |  |  |  |

Los anillos impresos con la variación de velocidad descrita anteriormente, fueron analizados utilizando el software ImageJ, con el fin de obtener los valores de área y round, las cuales fueron comparadas mediante vía Anova con los valores teóricos, como se observa en la Figura 15.

Figura 15.

Variación velocidad de impresión en anillos. A. Medición área círculo interno vs medidas teóricas. B. medición round círculo interno vs medidas teóricas.



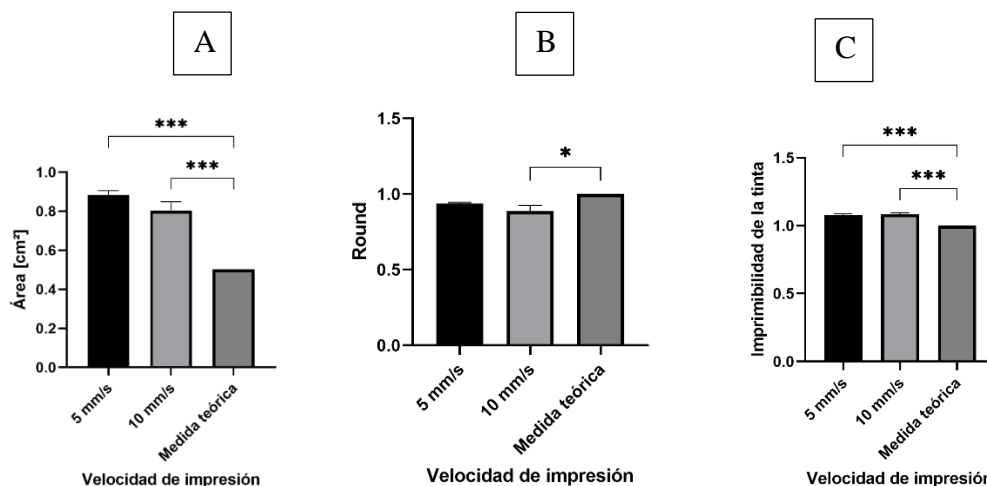
Nota: Las estructuras fueron impresas con un flujo de 250%. Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: * para $p<0.033$, ** para $p<0.002$, *** para $p<0.001$.

Como se visualiza en la Figura 15 A, ambos parámetros de velocidad presentaron diferencias significativas con el valor teórico ($p<0.001$), en cambio, en la Figura 15 B, la velocidad de 5 mm/s y 10 mm/s presentaron una diferencia con los valores teóricos de $p<0.002$ y $p<0.001$ respectivamente.

Los discos impresos con velocidades de 5 mm/s y 10 mm/s, fueron medidos utilizando el software ImageJ, de dichas mediciones se obtuvieron los análisis estadísticos del área, round e imprimibilidad de los discos comparados con los valores teóricos, como se observa en la Figura 16.

Figura 16.

Variación velocidad de impresión en discos. A. Medición área vs medida teórica. B. Medición round vs medida teórica. C. Imprimitibilidad de la tinta vs medida teórica.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, * para $p<0.033$, *** para $p<0.001$.

Como se observa en la Figura 16 A y C, ambos parámetros difirieron de los valores teóricos ($p<0.001$), embargo, la velocidad de 10 mm/s fue la más cercana a la estructura teórica en el área, pero, presentando una alta variabilidad en sus datos, lo cual nos indica que no representa una buena reproducibilidad.

En cambio, en la Figura 16 B, podemos observar que mientras la velocidad de 10 mm/s tiene una diferencia con los valores teóricos de $p<0.033$, el parámetro de 5 mm/s no presenta una diferencia significativa respecto a la medida teórica, además de que sus datos tienen baja variabilidad.

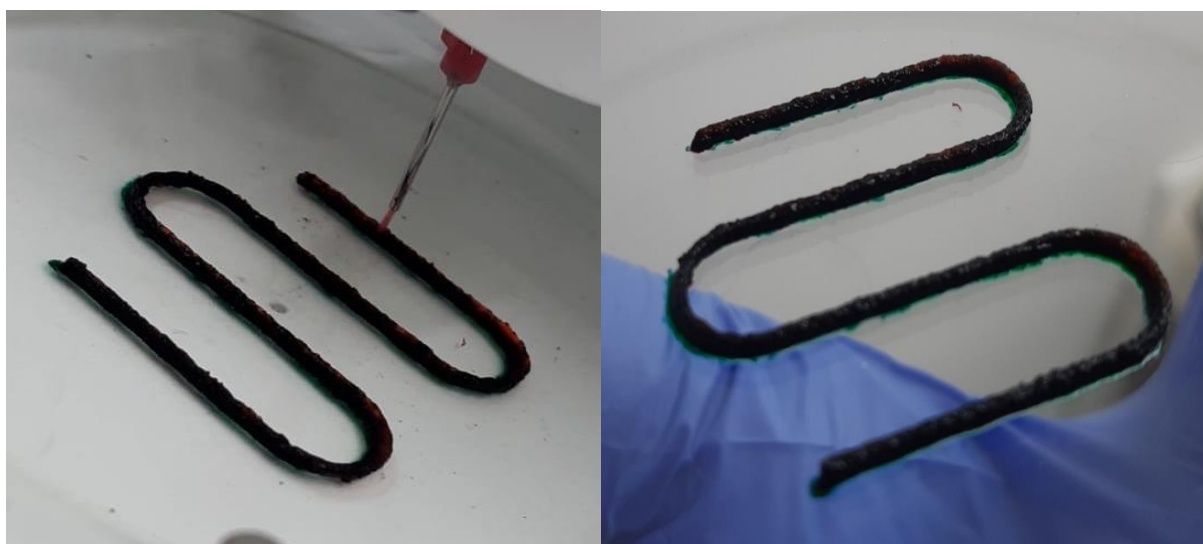
Por lo tanto, se decidió elegir la velocidad de impresión de 5 mm/s, ya que, al mirar los resultados en conjunto de todas las estructuras impresas, podemos observar que presenta valores cercanos a los teóricos, así como una baja variabilidad en sus mediciones, lo cual permite tener reproducibilidad al realizar varias repeticiones en las impresiones de estructuras.

Prueba de fusión de filamentos

Para la tinta de biomaterial de alginato con la concentración seleccionada (3% p/v) y los parámetros de impresión estandarizados, se realizó la prueba de fusión de filamentos, la cual consistió en imprimir una estructura serpenteante con la tinta de biomaterial de alginato con colorante verde desde la primera hasta la sexta capa, y tinta de biomaterial de alginato con colorante fucsia desde la séptima hasta la doceava capa. Como se observa en la Figura 17, se obtuvo una fusión instantánea en los filamentos impresos visualmente, ya que, cada filamento que se iba extrayendo se combinaba con el color del filamento ya impreso, lo cual nos indica que las estructuras impresas no presentan solidificación entre capas, por el contrario, a medida que se realiza la impresión, las capas extruidas se van unificando generando filamentos fusionados.

Figura 17.

Prueba de fusión de filamentos



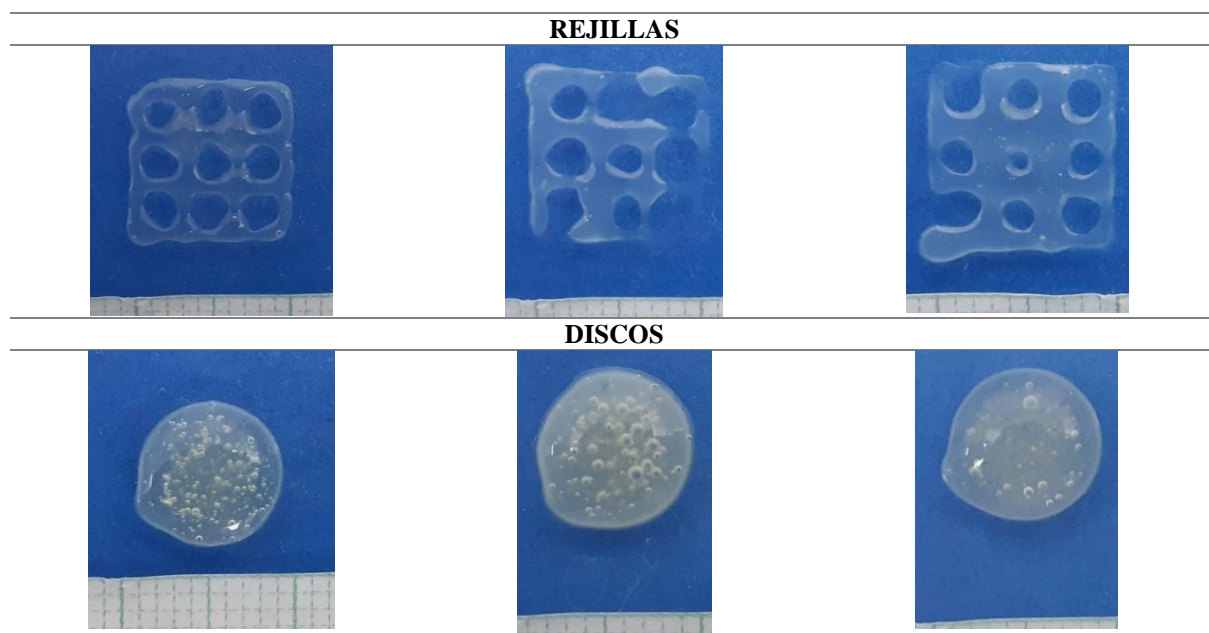
Tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con plasma

Se realizó la estandarización de la mezcla de la tinta de biomaterial de alginato haciendo uso de PPP, con el fin de estandarizar los procesos de preparación de la tinta de biomaterial. Se imprimieron 3 repeticiones de rejillas y discos tal como se observa en la Tabla 7.

Todas las impresiones se realizaron con una velocidad de 5 mm/s, flujo de 250%, temperatura en el extrusor de 20°C, temperatura en la cama de 20°C y haciendo uso de una aguja con punta siliconada de 0,02 cm de grosor.

Tabla 6.

Estructuras impresas con tinta de alginato funcionalizada con PPP.



Como se visualiza en la Tabla 6, la impresión no fue uniforme, debido a grumos en la tinta por consecuencia de la preparación manual de la misma. Así mismo, se visualizan en los discos micro burbujas en las estructuras, las cuales no pudieron ser eliminadas con la centrifugación propuesta en la preparación de la tinta de control.

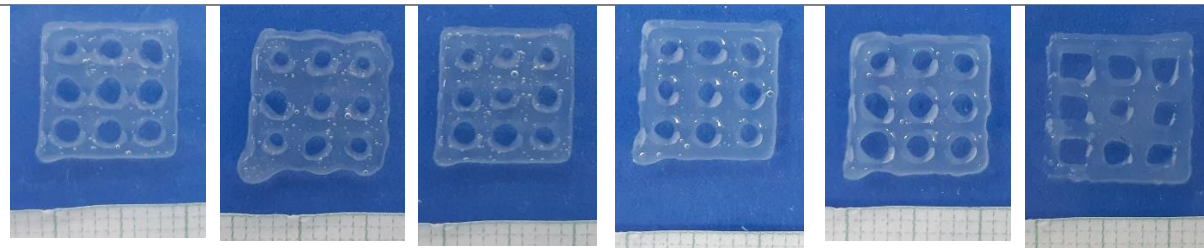
Debido a las fallas encontradas en la preparación de la tinta con PPP, se decidieron realizar tres cambios al momento de preparar la tinta con PRP; el primero, fue la implementación de tamizar la tinta preparada pasándola por una tela tul, con el fin de eliminar los grumos obtenidos; el segundo cambio realizado, fue omitir el paso de centrifugación de la tinta, en cambio, se redujeron las micro burbujas creando un vacío en la jeringa de forma manual; y el tercer cambio implementado, fue realizar las estructuras de cuantificación de

proteínas con dos concentraciones de CaCl_2 (100 mM y 300 mM) para evaluar el efecto de la reticulación en la degradación de las estructuras y la liberación de las proteínas, como se observa en la Tabla 7. También, se realizó la prueba de caída de filamento, para evaluar visualmente el estado de gelación de la tinta previo a la impresión, tal como se observa en la Figura 18.

Tabla 7.

Estructuras para la cuantificación de proteínas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP recién impresas.

REJILLAS



DISCOS

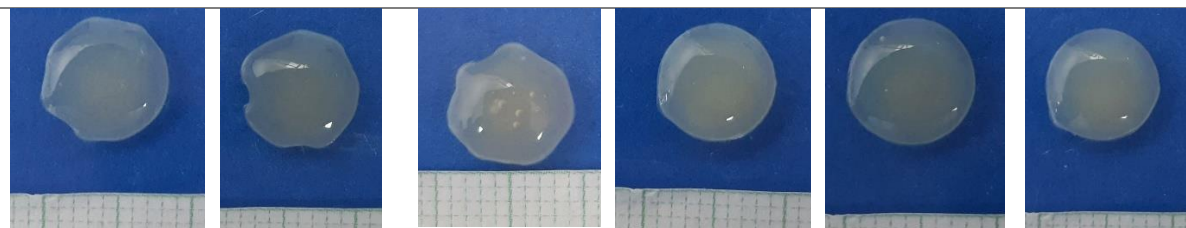
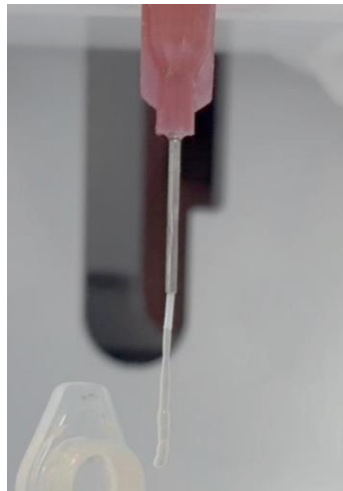


Figura 18.

Prueba de caída de filamento (Tinta con PRP)

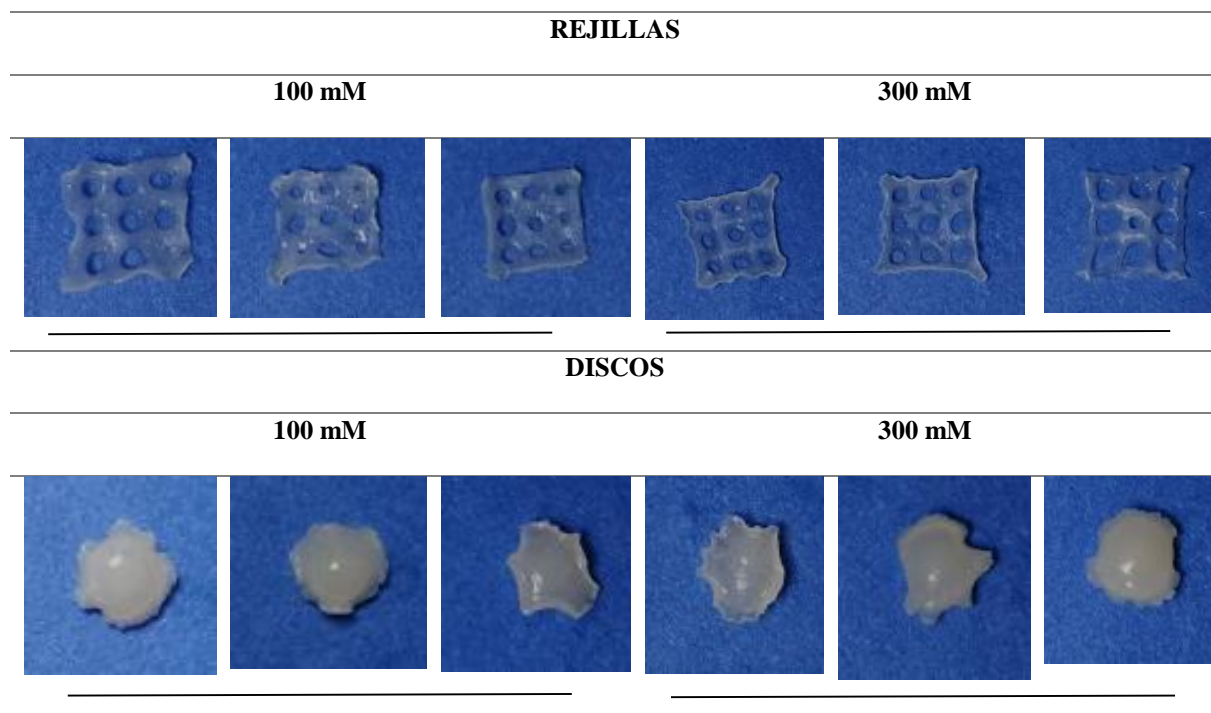


Nota: Se puede observar una correcta gelación en la tinta ya que forma el filamento deseado al ser extruido por la bioimpresora.

Como se visualiza en la Tabla 7, se obtuvo una gran reducción de las micro burbujas debido al vacío realizado manualmente en la jeringa, también, se obtuvieron estructuras con una mayor similitud a la estructura teórica debido a la eliminación de los grumos de la tinta. Estas estructuras fueron medidas en el programa ImageJ recién impresas (Tabla 7) y luego de la reticulación (Tabla 8), con el fin de ser comparadas con las mediciones de las estructuras realizadas con la tinta de control recién impresas (Tabla 9), reticuladas (Tabla 10) y los valores teóricos (Figura 8).

Tabla 8.

Estructuras para la cuantificación de proteínas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP reticuladas.

**Tabla 9.**

Estructuras para la cuantificación de proteínas (Tinta de control) recién impresas.

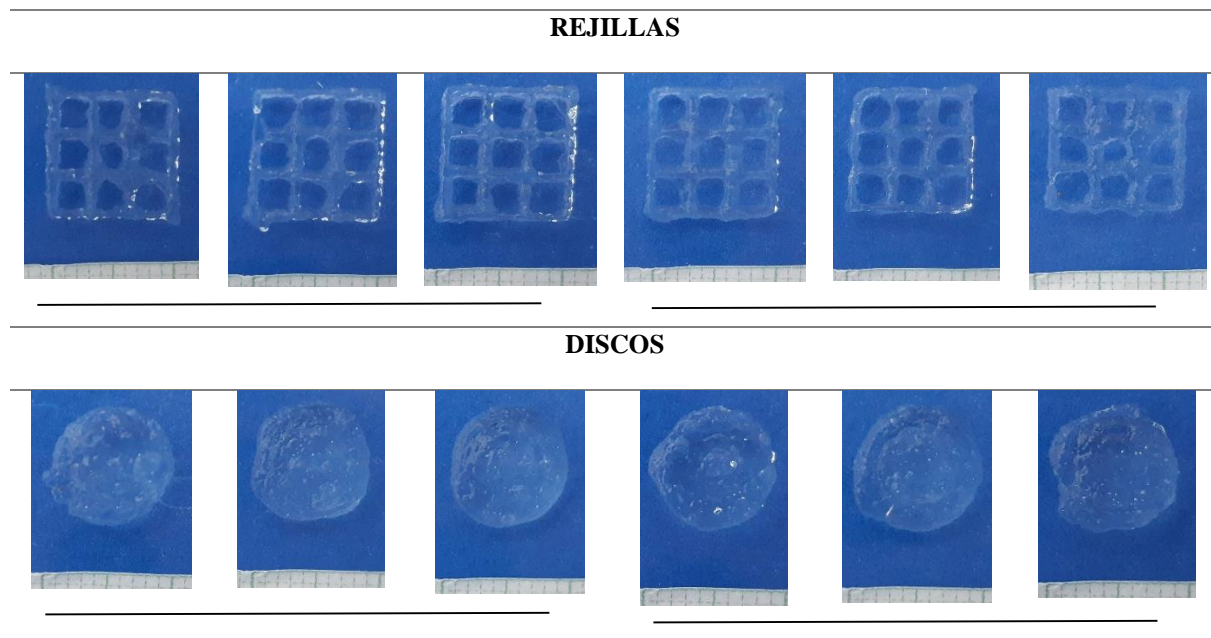
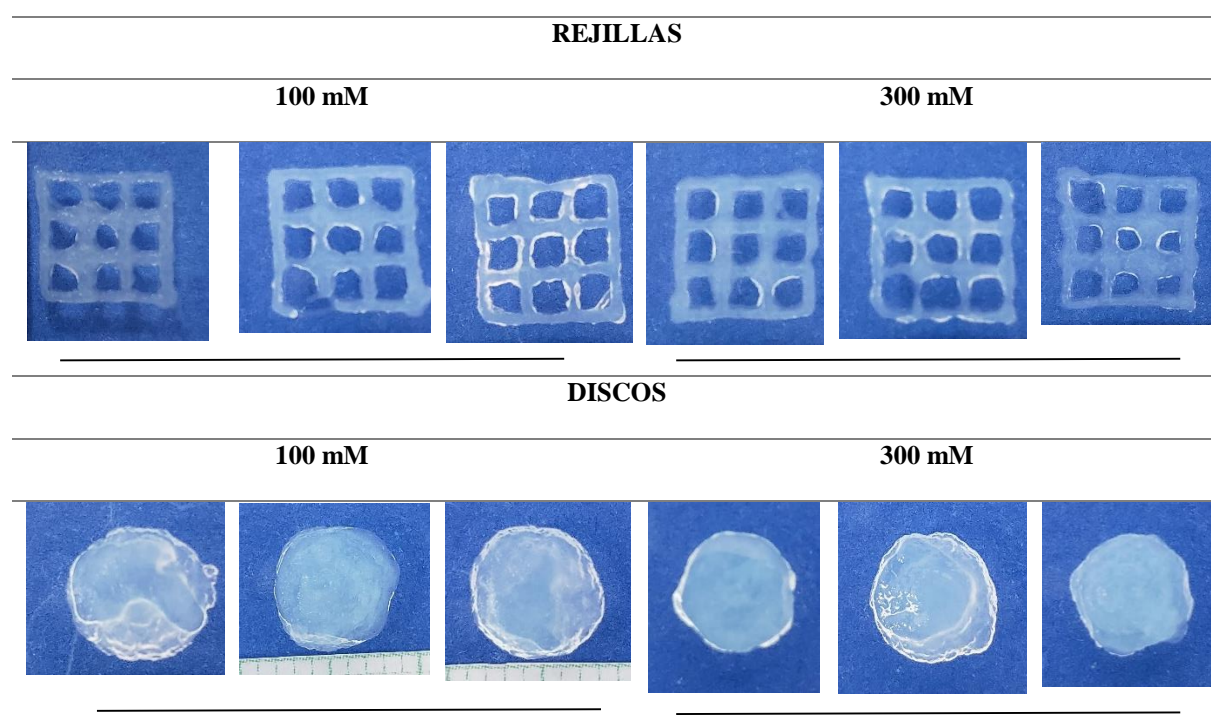


Tabla 10.

Estructuras para la cuantificación de proteínas (Tinta de control) reticuladas.



Imprimibilidad de la tinta de alginato funcionalizada con PRP

Se realizó el análisis de las estructuras recién impresas y reticuladas en CaCl_2 durante 16 horas de la tinta de biomaterial funcionalizada con PRP y la tinta de control por medio del software ImageJ.

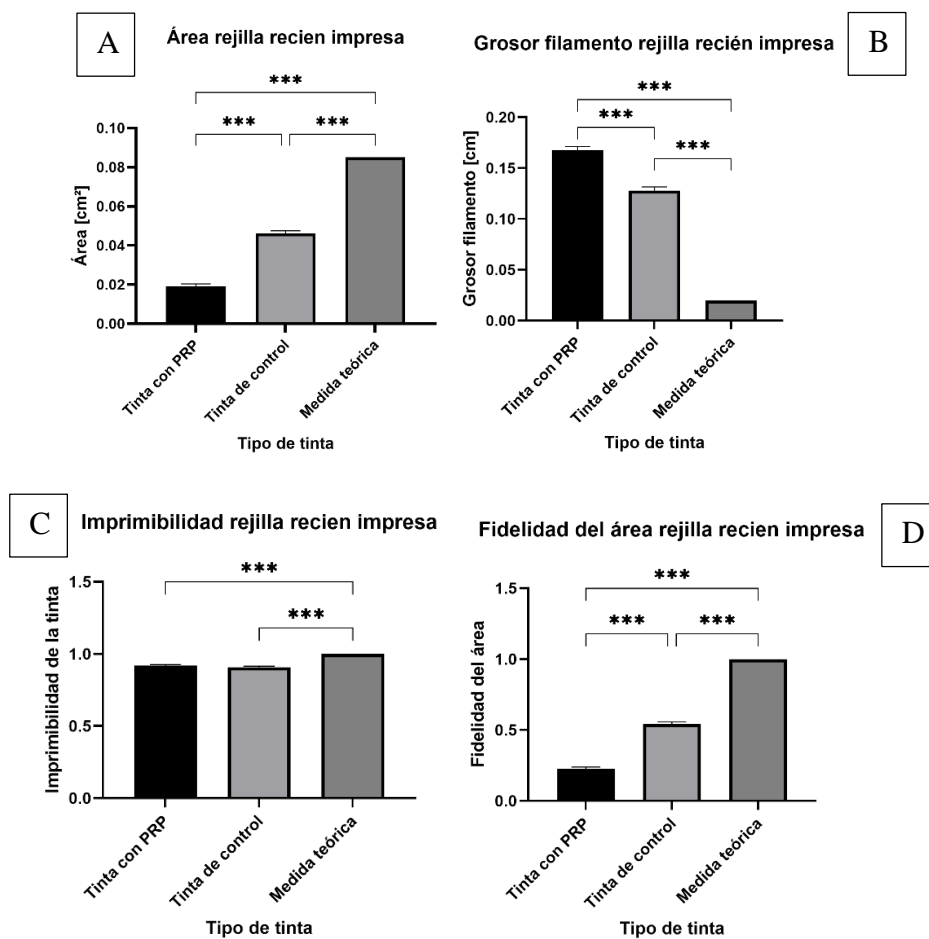
Imprimibilidad de rejillas

Las rejillas se imprimieron con una altura de 0,2 cm. El análisis de sus medidas se puede visualizar en la Figura 19 para las rejillas recién impresas y en la Figura 20 para las rejillas reticuladas.

Figura 19.

Rejillas recién impresas con tinta de biomaterial funcionalizada con PRP y tinta de control.

A. Área de la rejilla. B. Grosor del filamento de la rejilla. C. Imprimibilidad de la rejilla. D. Fidelidad del área.



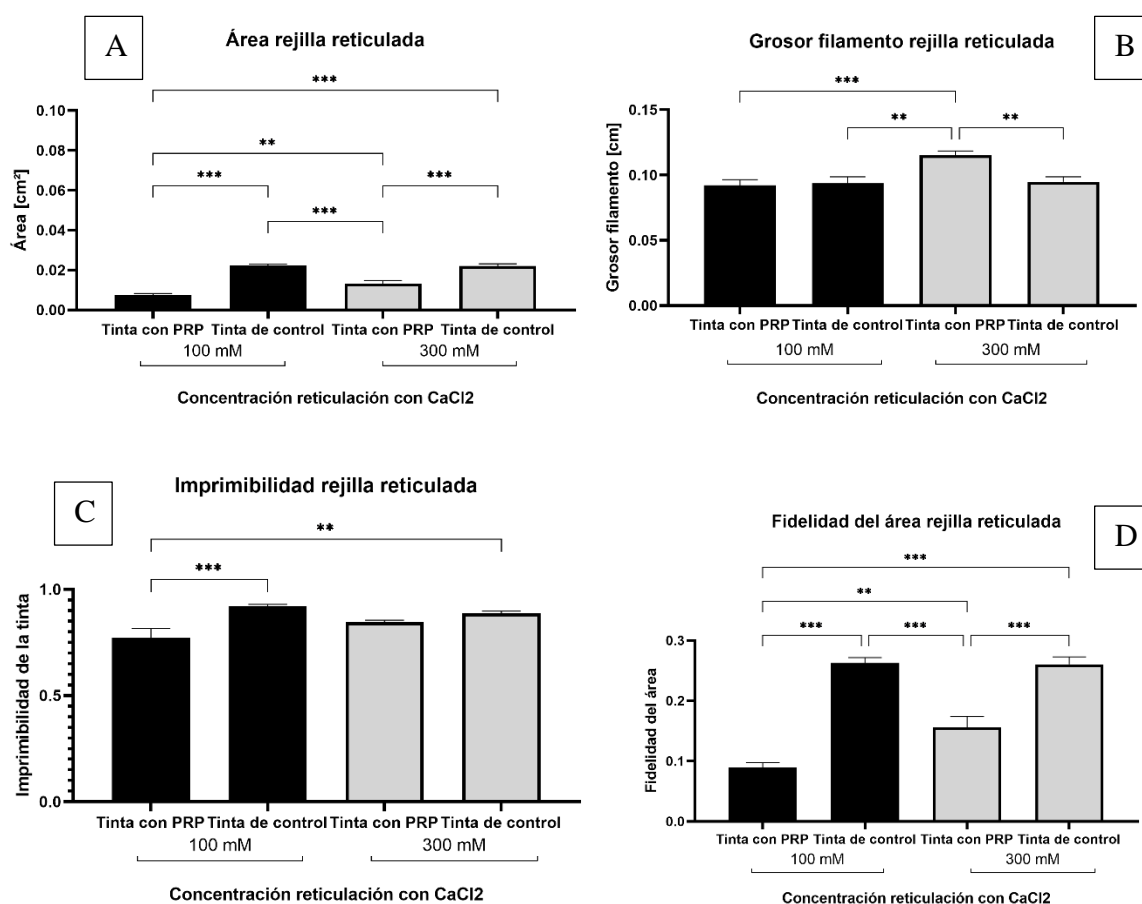
Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=54$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, *** para $p < 0.001$.

Las rejillas recién impresas con la tinta de biomaterial funcionalizada con PRP y la tinta de control no presentan diferencias estadísticamente significativas en su imprimibilidad, sin embargo, en el resto de parámetros (área, grosor de filamento y fidelidad del área) presentan

una alta diferencia ($p < 0.001$), en la cual se visualiza que la tinta de control tiene medidas más cercanas a los valores teóricos.

Figura 20.

Rejillas con tinta de biomaterial funcionalizada con PRP y tinta de control reticuladas con CaCl₂. A. Área de la rejilla. B. Grosor del filamento de la rejilla. C. Imprimibilidad de la rejilla. D. Fidelidad del área.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=27$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, ** para $p < 0.002$, *** para $p < 0.001$.

En la Figura 20 A, podemos observar que todos los tipos de tinta reticulados representan diferencias estadísticamente significativas en el área ($p < 0.001$) ($p < 0.002$), a excepción de la tinta de control reticulada a 100 mM y 300 mM. En la Figura 20 B, podemos visualizar que

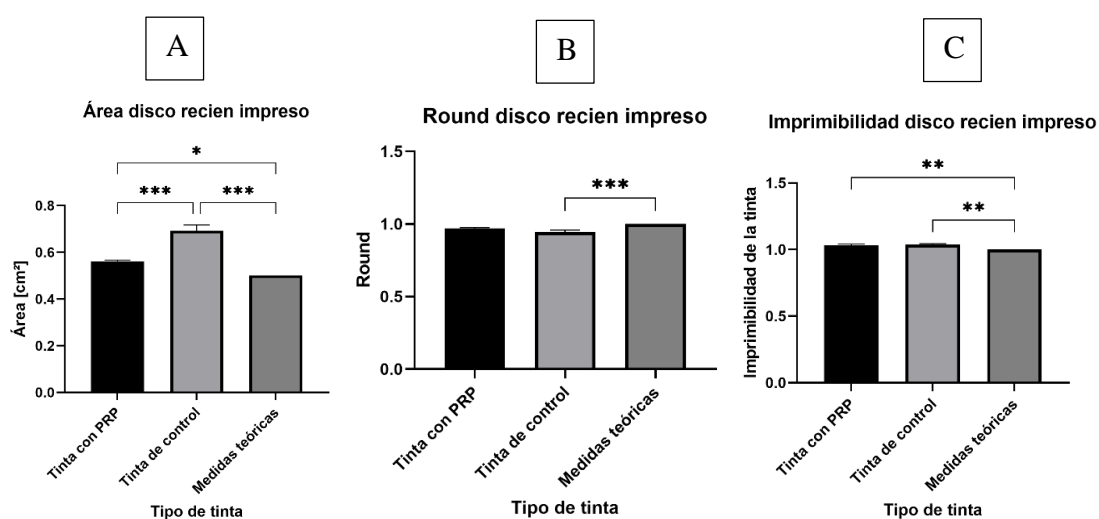
las tintas reticuladas a 100 mM no representan una diferencia significativa en el grosor de filamento, al igual que la tinta de control reticulada con ambos valores de concentraciones de CaCl_2 , sin embargo, la tinta de con PRP reticulada con ambas concentraciones si presenta una diferencia significativa ($p < 0.001$). En cuanto a la imprimibilidad y fidelidad del área, podemos concluir que la tinta de control no presenta una diferencia significativa sin importar la concentración de CaCl_2 en su reticulación, en cambio, la tinta con PRP reticulada con ambas concentraciones, representa una diferencia significativa en la fidelidad del área ($p < 0.002$).

Imprimibilidad de los discos

Los discos se imprimieron con una altura de 0,2 cm. El análisis de sus medidas se puede visualizar en la Figura 21 para los discos recién impresos, y en la Figura 22 para los discos reticulados.

Figura 21.

Discos recién impresos con tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP y tinta de control. A. Área disco. B. Round disco. C. Imprimibilidad disco.

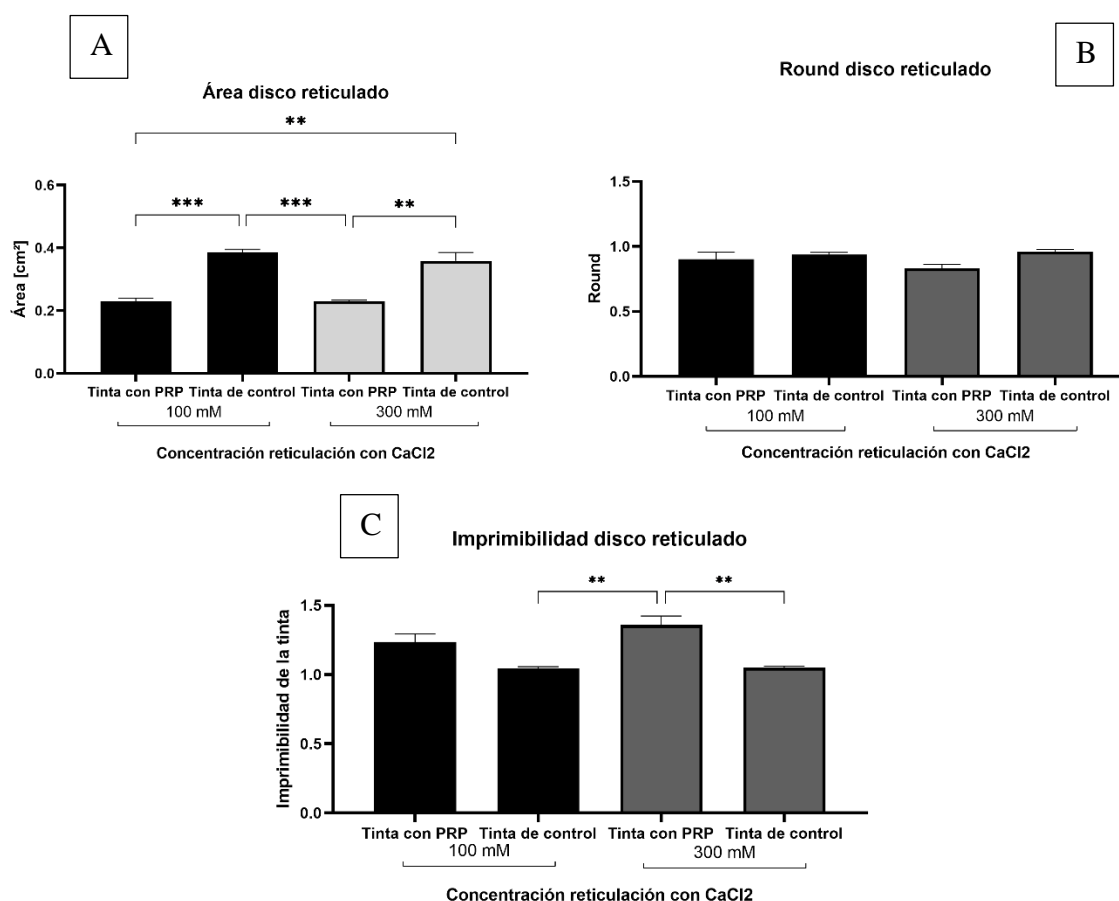


Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=6$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, * para $p < 0.033$, ** para $p < 0.002$, *** para $p < 0.001$.

Como se puede observar en la Figura 21 A, la tinta con PRP presento una baja diferencia estadística en el área del disco con respecto a la medida teórica ($p < 0.033$), al igual que en el round, en el cual no represento una diferencia significativa, en cambio, en la imprimibilidad presentó una diferencia un poco mayor ($p < 0.002$), comportándose similar a la tinta de control con la cual no represento una diferencia significativa.

Figura 22.

Discos con la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP y tinta de control reticulados con CaCl₂. A. Área disco. B. Round disco. C. Imprimibilidad disco.



Nota: Los datos fueron reportadas como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, ** para $p < 0.002$, *** para $p < 0.001$.

Como se puede observar en la Figura 22 B y C, sin importar el tipo de tinta o la concentración en la reticulación, mantienen valores similares de round e imprimibilidad sin

representar diferencias significativas, o representando una diferencia de $p < 0.002$. En cambio, en la Figura 22 A, si se varía el tipo de tinta se encuentra una diferencia significativa ($p < 0.001$) ($p < 0.002$), solo mantiene valores sin diferencias significativas cuando es el mismo tipo de tinta sin importar la concentración de CaCl_2 con la que se reticulen.

Hinchamiento de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP

Se realizó la impresión de 3 discos de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP y 3 discos de control (solo alginato), como se observa en la Tabla 11. A dichos discos, se les realizó la medición del peso recién impresos (W_i), posteriormente, se colocaron en un baño de CaCl_2 durante 16 horas aproximadamente, para realizar la medición del peso hinchado (W_s), luego, se secaron y se dejaron durante 72 horas en un horno de convección a 37°C para realizar la medición del peso seco (W_d).

Tabla 11.

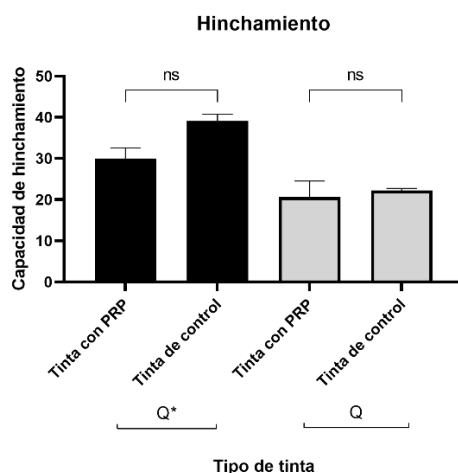
Discos prueba de hinchamiento



Los resultados obtenidos de la prueba del hinchamiento son los que se observan en la Figura 23. En la cual podemos notar una mayor capacidad de hinchamiento en las estructuras realizadas con la tinta de control, sin embargo, no representan diferencias significativas con los valores obtenidos en las estructuras impresas con la tinta con PRP, esto aplica para el análisis de la capacidad de hinchamiento en estado relajado (Q^*) y para la capacidad de hinchamiento en estado de equilibrio (Q), los cuales se obtuvieron según la Ecuación 6 y 7 respectivamente.

Figura 23.

Prueba de hinchamiento



Nota: Q^* hace referencia a la capacidad de hinchamiento en estado relajado, Q hace referencia a la capacidad de hinchamiento en estado de equilibrio. Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar, para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas.

Propiedades mecánicas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP

Se realizó la impresión de tres repeticiones de discos y anillos con una velocidad de 5 mm/s y un flujo de 250%, los cuales fueron reticulados con CaCl_2 a 300 Mm, posteriormente se les realizaron dos baños de PBS de 10 minutos cada uno para la tinta de biomaterial de

alginato funcionalizada con PRP y la tinta de control. Sin embargo, la tinta de control presentó degradación al momento de realizar el baño con PBS, destruyendo las estructuras necesarias para la prueba, también, se pudo visualizar que los discos impresos al reticularse presentaban un bajo grosor, como se visualiza en la Figura 24, imposibilitando la realización de la prueba de compresión, ya que dicha prueba, requiere un disco con un grosor de aproximadamente 0,5 cm, debido a esto, se realizaron únicamente las pruebas de tensión para los anillos de la tinta biomaterial de alginato funcionalizada con PRP, como se visualiza en la Figura 25.

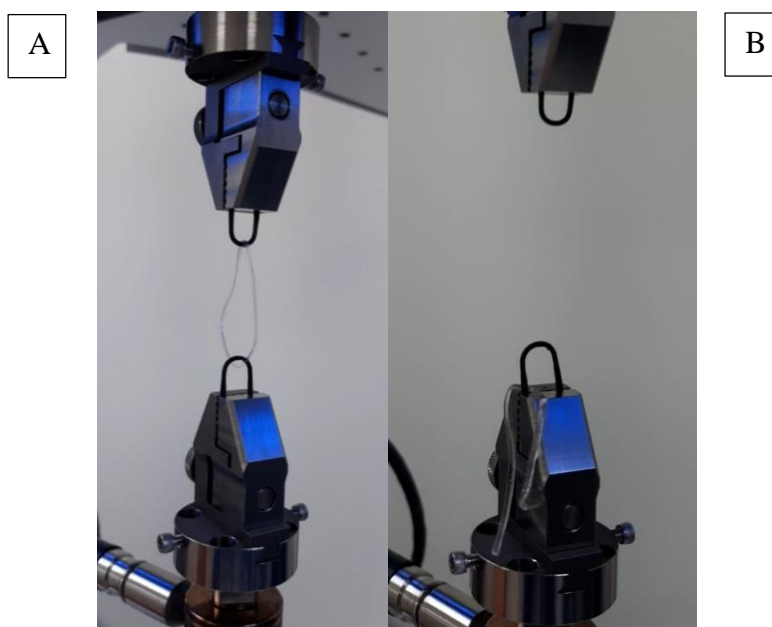
Figura 24.

Disco reticulado para prueba de compresión



Figura 25.

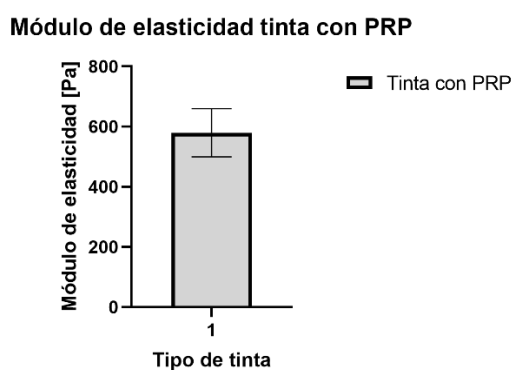
Prueba de tensión. A. Anillo inicial. B. Anillo luego de la fractura



Con los datos resultantes de la prueba de tensión, se realizó el análisis calculando la deformación y esfuerzo realizado por el banco de carga hasta la fractura de la estructura, con el fin de calcular el módulo de elasticidad de cada una de las muestras, como se observa en la Figura 26.

Figura 26.

Módulo de elasticidad tinta de biomaterial de alginato funcionalizado con PRP.



Nota: Los datos fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes.

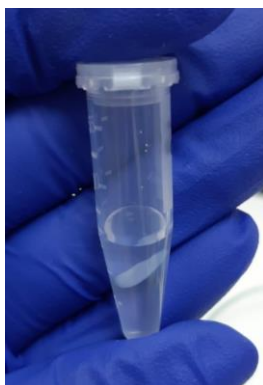
Cuantificación de proteínas de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP

Se realizó la impresión de rejillas y discos, los cuales fueron reticulados con CaCl_2 a 100 mM, así como rejillas y discos reticulados con CaCl_2 a 300 mM con la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP y con la tinta de control, como se visualiza en la Tabla 8 y Tabla 10 respectivamente, con el fin de evaluar la concentración de proteínas presente en cada tinta, así como el efecto de la reticulación en la encapsulación de los factores de crecimiento. Para esta prueba, se hizo uso del Nanodrop, el cual es un espectrofotómetro que expone la muestra a una longitud de onda de 280 nm para determinar la cantidad de proteína presente en la misma; dicho equipo requiere la muestra en estado líquido, por lo tanto, se realizó la impresión de las estructuras nombradas anteriormente, se reticularon en un

baño de CaCl_2 por 16 horas, y se colocaron a degradar en tubos eppendorf con agua destilada a 37°C , como se observa en la Figura 27. Sin embargo, las estructuras no tuvieron una completa degradación, por lo tanto, las gotas extraídas para la cuantificación de proteínas se obtuvieron del sobrenadante del baño de agua destilada en el cual se encontraban las estructuras en degradación, lo que nos permitió medir la concentración de proteínas liberadas por las mismas en un periodo de 2 semanas.

Figura 27.

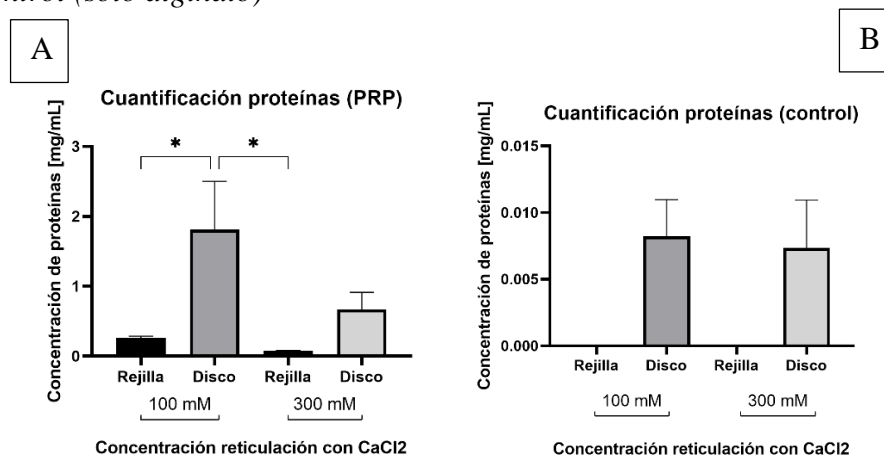
Estructura en degradación



Los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas se muestran en la Figura 28.

Figura 28.

Cuantificación de proteínas. A. Tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP. B. Tinta de control (solo alginato)



Nota: Los resultados fueron reportados como el promedio \pm el error estándar para $n=3$ muestras independientes. Las diferencias estadísticas están representadas por: ns para diferencias no significativas, * para $p<0.033$.

Como se observa en la Figura 28 A, la encapsulación de las proteínas no se obtuvo de forma similar en todas las estructuras impresas, esto debido a que la tinta resultante no se encontraba homogénea producto de la preparación mecánica, la cual dificultó la dilución del CaCl₂ en la tinta al momento de la pre-reticulación formando microgeles que no lograron ser tamizados por la tela tul, y produciendo que algunas estructuras encapsularan mayor concentración de factores de crecimiento que otras. En la Figura 28 B, se puede observar que algunas estructuras impresas con la tinta de control obtuvieron un valor bajo de proteínas, lo cual puede ser resultante de residuos o de la gelación de la tinta.

Análisis de Resultados

Lograr un tratamiento para la OA a largo plazo es un reto, ya que se deben tener en cuenta diferentes aspectos y parámetros para lograrlo. Durante el desarrollo de este proyecto, se pudo observar el desarrollo de una tinta de alginato a una concentración del 3%, la cual permite la impresión de estructuras uniformes, esto se pudo concluir tras realizar análisis

estadísticos, donde se observó que, a comparación de las demás concentraciones, la concentración del 3% presentaba una mejor fidelidad.

Con los resultados estadísticos obtenidos tras la impresión de diferentes estructuras, se logró concluir que los discos y las rejillas son las estructuras que presentan mayor cantidad de datos para posterior análisis, esto debido a que permiten evaluar la imprimibilidad y no sólo las mediciones obtenidas mediante el software ImageJ. Por otro lado, se observó que la cantidad de capas impresas influye directamente en las mediciones de las estructuras, ya que la tinta no mantiene su forma, sino que tiende a disiparse, de tal forma que el grosor del filamento es mayor, y el área de los cuadrados internos de la rejilla va disminuyendo, al igual que el área del círculo interno de los anillos, esto también se pudo observar en la prueba de fusión de filamento realizada, ya que al imprimir con varias capas de diferente color, estas se fusionaron entre sí. La fusión de filamentos podría mejorarse usando un método de reticulación diferente al usado, ya que al imprimir directamente sobre un baño de CaCl_2 se produciría una reticulación inmediata, y esto permitiría que las estructuras se mantuvieran a lo largo de la impresión como ocurrió en el estudio realizado por Tabriz et al (Tabriz et al, 2015).

En la bioimpresión, no sólo es importante lograr una tinta con buenas propiedades reológicas, sino también establecer los parámetros de impresión indicados que permitan replicar estructuras; por lo tanto, se realizó un estudio de variación de velocidad de impresión y flujo de salida para determinar los parámetros indicados. En diferentes estudios realizaban variaciones de velocidad de 0 mm/s a 16 mm/s (Myoung et al, 2019), sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados, la velocidad final de impresión era 5 mm/s o 6 mm/s (Di Guiseppe et al, 2017) (Tabriz et al, 2015), es por ello, que se escogió realizar una variación en un rango de 2mm/s y 10 mm/s, observando que, al imprimir con alta velocidad, se generaba vibración en la cama y esto no permitía una buena reproducibilidad en la impresión de las

estructuras, por lo tanto, se seleccionó el valor de 5 mm/s coincidiendo con la velocidad de impresión utilizada en el estudio realizado por Giuseppe et al (Giuseppe et al., 2018), ya que con la velocidad de 2 mm/s se obtuvo una alta variabilidad, además que representaba mayor tiempo de impresión por estructura. El flujo se varió en un rango de 250% y 450%, y se concluyó que, a mayor flujo, mayor es la disipación de la biotinta en la estructura, por lo tanto, se seleccionó el flujo de 250%.

La mezcla de alginato con plasma se estandarizó usando PPP, se mezcló manualmente debido a que, a diferencia de la biotinta de alginato, la biotinta con plasma no se puede mantener durante tiempos prolongados a temperaturas altas. Con la mezcla manual se obtuvo una biotinta de alginato con PPP que contenía microgeles, los cuales no permitieron una deposición uniforme de la tinta, obteniendo como resultado estructuras sin formas continuas. Fue posible solucionar este problema usando tela tul como método de tamizaje de la tinta, la cual removió la mayor cantidad de microgeles, logrando la impresión de estructuras uniformes, sin embargo, se presentaron microgeles que no se pudieron retirar con la tela tul debido a que el alginato gela de forma inmediata al entrar en contacto con iones positivos como el CaCl_2 , esto generando la necesidad de desarrollar un método de mezcla automática que permita la obtención de una biotinta homogénea.

Para la biotinta de alginato sin plasma se usó la centrifugación como método de eliminación de burbujas que se formaban por la mezcla de la misma, sin embargo, este método no pudo ser aplicado en la biotinta de alginato con plasma, pues al centrifugar se formaba espuma debido a la presencia del plasma, por lo tanto, se eliminaron la mayor cantidad posible de burbujas de forma manual.

La prueba de hinchamiento no mostró diferencias estadísticas, sin embargo, se pudo observar que la biotinta de control tiene una mayor capacidad de hinchamiento en

comparación con la biotinta de plasma, esto debido a que la biotinta de plasma tiene una alta densidad de reticulación y resistencia (Naghieh et al, 2019).

Para el análisis de propiedades mecánicas, inicialmente se planteó realizar prueba de tensión y compresión imprimiendo discos y anillos. La prueba de compresión no se pudo realizar debido a que se requiere un disco de aproximadamente 0,5 cm, para lograr esto se necesita la impresión de varias capas, y esto no es posible debido a la composición de la tinta, pues no mantiene su altura. La prueba de tensión se realizó con discos reticulados previamente, y se realizó únicamente con los anillos impresos con la biotinta de alginato funcionalizada con plasma, ya que los anillos de la biotinta de control se degradaron al momento de realizar los lavados con PBS. La prueba de tensión se realizó con una celda de carga de 2,5 N con el fin de tener una sensibilidad mayor debido al grosor del anillo, sin embargo, se recomienda realizar la prueba con una celda de menor fuerza o realizar impresiones de mayor tamaño para obtener una gráfica con menos ruido; para eliminar el ruido de los datos se implementó un filtro pasabajos en el software Matlab y se obtuvo un módulo de elasticidad de 576 Pa.

Las mediciones para la cuantificación de proteínas se realizaron después de mantener las estructuras durante dos semanas en agua destilada, debido a que no se degradaban lo suficiente para mostrar resultados significativos, ya que el alginato de sodio es un biomaterial que presenta una degradación lenta (Eneko Axpe, Michelle L. Oyen, 2016). Después de dos semanas, las estructuras no se degradaron en su totalidad, sin embargo, se realizó la lectura con el baño de PBS en el que fueron suspendidas. Los resultados mostraron datos muy variables, debido a la consistencia de la biotinta, ya que en los microgeles formados por la preparación manual de la misma se concentraba mayor cantidad de proteínas en algunas estructuras con respecto a otras, generando una baja reproducibilidad en las muestras.

Capítulo 6. Conclusiones y Recomendaciones

En el presente estudio, se desarrolló inicialmente una tinta de biomaterial de alginato, con la cual se pudo comprobar que la concentración más apta para trabajar era de 3% p/v de alginato de sodio pre-reticulado con CaCl_2 a 20 mM, sin embargo, al momento de realizar la funcionalización con PRP, se pudo observar que dicha concentración de CaCl_2 era muy alta, ya que el plasma también presenta propiedades gelificantes, lo cual pudo ser solucionado manejando una concentración de 0,2% p/v. La preparación de la tinta de biomaterial de alginato funcionalizada con PRP se realizó de forma mecánica (manual), ya que los métodos de agitación disponibles no permitían la correcta dilución de todos sus componentes en un tiempo corto, este método de preparación nos permitió la encapsulación de los factores de crecimiento en la tinta, sin embargo, dicha encapsulación no se realizó de forma homogénea, por lo tanto, es requerido un método de preparación automatizado de la tinta, en el cual haya un rotor que permita realizar la mezcla de todos los componentes de la biotinta con altos valores de rpm permitiendo obtener una mezcla homogénea y de esta manera evitar que se cuantifiquen cantidades que difieren significativamente de proteínas en las estructuras impresas, también, permitiría reticular la tinta con una mayor concentración de CaCl_2 , lo cual se vería reflejado en una mejoría en la imprimibilidad de la tinta, en conjunto con lo mencionado anteriormente, es necesaria de igual manera un método de vacío más efectivo que el manual, ya que, de esta manera se podrían eliminar las microburbujas resultantes de la mezcla de la tinta generando una impresión más uniforme.

Pese a la estandarización de los parámetros de impresión y resultados favorables de imprimibilidad en algunas estructuras, es necesaria una profundización en los análisis de dicho procedimiento de tal forma que puedan ser impresas una alta cantidad de capas por estructura sin que se vean significativamente afectadas las figuras internas, como en las rejillas y anillos. Finalmente, se recomienda la revisión de la cuantificación de proteínas en un

período más largo de tiempo, con el objetivo de conocer si los andamios fabricados pueden ser aplicados en un futuro como un tratamiento para la OA a largo plazo.

Referencias

- Ahmed, E. M. (2013). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advance Research*, 106-109.
- Allan G. Gornall, Charles J. Bardawill & Maxima M. David. (1948). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
- Arias, A. (2014). Osteoarthritis. *Revista Cubana De Medicina Física Y Rehabilitación*, 173-186.
- Atabak, T., Hermida, M., Leslie, N., & Shu, W. (2015). Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *IOP Science*.
- Bayona, G. (2020). Evaluación de las propiedades mecánicas de hidrogeles biodegradables a base de polietilenglicol diacrilado, con potencial uso en el diseño de matrices para úlceras crónicas.
- Beigi, M.-H., Atefi, A., Ghanaei, H.-R., Labbaf, S., Ejeian, F., & Nasr-Esfahani, M.-H. (2018). Activated platelet-rich plasma improves cartilage regeneration using adipose stem cells encapsulated in a 3D alginate scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1327-1338. doi:<https://doi.org/10.1002/term.2663>
- Choe, G., Oh, S., Seok, J. M., Park, S. A., & Lee, J. Y. (2019). Graphene oxide/alginate composites as novel bioinks for three-dimensional mesenchymal stem cell printing and bone regeneration applications. *Nanoscale*, 23275-23285. doi:<https://doi.org/10.1039/c9nr07643c>
- Dernek, B., & Kesiktas, F. N. (2019). Efficacy of combined ozone and platelet-rich-plasma treatment versus platelet-rich-plasma treatment alone in early stage knee osteoarthritis. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, 305-311. doi:<https://doi.org/10.3233/bmr-181301>
- Di Giuseppe, M., Law, N., Webb, B., Macrae, R., Liew, L. J., Sercombe, T. B., . . . Doyle, B. J. (2017). Mechanical Behaviour of Alginate-Gelatin. *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials*.
- Di Martino, A., Di Matteo, B., Papio, T., Tentoni, F., Selleri, F., Cenacchi, A., Kon, E., & Filardo, G. (2018). Platelet-Rich Plasma Versus Hyaluronic Acid Injections for the Treatment of Knee Osteoarthritis: Results at 5 Years of a Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *The American Journal of Sports Medicine*, 347-354. doi:<https://doi.org/10.1177/0363546518814532>

- Eneko Axpe, Michelle L. Oyen. (2016). Applications of Alginate-Based Bioinks in. *International Journal of molecular sciences*. doi:10.3390/ijms17121976
- Faramarzi, N., Yazdi, I., Nabavinia, M., Gemma, A., Fanelli, A., & Caizzone, A. et al. (2018). Patient-Specific Bioinks for 3D Bioprinting of Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*. doi:10.1002/adhm.201701347
- Fernández, J. M. (2020). *Desarrollo de matrices a base de alginatos con aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo y Cartilaginoso*. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/98347>
- Galeano, M. (2021). Desarrollo de una tinta de biomaterial a base de PEGDA, dirigido al diseño de apósitos para úlceras crónicas de pie diabético.
- Hözl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L., & Ovsianikov, A. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *International Society for Biofabrication*.
- Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., & Wang, J. (2018). Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Royal Society of Chemistry*.
- I-Kung, P., Borg, J., & Díaz, R. (2016). Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 827.
- Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Gu, K., Bavoux, M. M., Flores-Torres, S., Kort-Mascort, J., Grant, J., Vijayakumar, S., De Leon-Rodriguez, A., Ehrlicher, A. J., & Kinsella, J. M. (2019). Engineering bioprintable alginate/gelatin composite hydrogels with tunable mechanical and cell adhesive properties to modulate tumor spheroid growth kinetics. *Biofabrication*. doi:<https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab3a5c>
- Katja, H., & al, e. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *International Society for Biofabrication*.
- Lin, S. S., Landesberg, R., Chin, H. S., Lin, J., Eisig, S. B., & Lu, H. H. (2006). Controlled Release of PRP-Derived Growth Factors Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 4358-4361. doi:<https://doi.org/10.1109/iembs.2006.260847>
- Londoño, J., Peláez Ballestas, I., Cuervo, F., Angarita, I., Giraldo, R., & Rueda, J. et al. (2018). Prevalencia de la enfermedad reumática en Colombia, según estrategia COPCORD-Asociación Colombiana de Reumatología. Estudio de prevalencia de enfermedad reumática en población colombiana mayor de 18 años. *Revista Colombiana De Reumatología*, 245-256. doi:10.1016/j.rcreu.2018.08.003

- Louis, M. L., Magalon, J., Jouve, E., Bornet, C. E., Mattei, J. C., Chagnaud, C., Rochwerger, A., Veran, J., & Sabatier, F. (2018). Growth Factors Levels Determine Efficacy of Platelets Rich Plasma Injection in Knee Osteoarthritis: A Randomized Double Blind Noninferiority Trial Compared With Viscosupplementation. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 1530-1540. doi:<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2017.11.035>
- Ma, P. X. (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, 30-40. doi:[https://doi.org/10.1016/s1369-7021\(04\)00233-0](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(04)00233-0)
- Mancha, E., Gómez, C., López, E., Casado, J., Macias, A., Díaz, M., . . . Pagador, B. (2020). Hydrogeles for bioprinting: A systematic review of hydrogeles synthesis, bioprinting parameters, and bioprinted structures behavior. . *Frontiers ins bioengineering and biotechnology*, 2-12.
- Marx, R. E. (2001). Plasma rico en plaquetas (PRP): ¿Qué es PRP y qué no es PRP?
- Michael Di Giuseppe, Nicholas Law, Braeden Webb, Ryley A. Macrae, Lawrence J. Liew, Timothy B. Sercombe, Rodney J. Dilley, Barry J. Doyle. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 150-157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.12.018>
- Mifune, Y., Matsumoto, T., Takayama, K., Ota, S., Li, H., Meszaros, L. B., Usas, A., Nagamune, K., Gharaibeh, B., Fu, F. H., & Huard, J. (2013). The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, 175-185. doi:<https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.09.018>
- Mironov, V., Reis, N., & Derby, B. (2006). Review: Bioprinting: A Beginning. *Tissue Engineering*, 631-634. doi:<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.631>
- Mohammad-Hossein Beigi, Atefeh Atefi, Hamid-Reza Ghanaei, Sheyda Labbaf, Fatemeh, Mohammad-Hossein Nasr-Esfahani. (2018). Activated platelet-rich plasma (PRP) improves cartilage regeneration using. doi:10.1002/term.2663
- Monika Hospodiuk, Madhuri Dey, Donna Sosnoski, Ibrahim T. (2016). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.006
- Muchedzi, T. A., & Roberts, S. B. (2018). A systematic review of the effects of platelet rich plasma on outcomes for patients with knee osteoarthritis and following total knee arthroplasty. *The Surgeon*, 250-258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.surge.2017.08.004>

- Myoung, K., Yong, L., Won-Kyo, J., Junghwan, O., & Seung, Y. N. (2019). Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion based bioprinting. *Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.
- Naghieh, S., Sarker, M. D., Abelseth, E., & Chen, X. (2019). Indirect 3D bioprinting and characterization of alginate scaffolds for potential nerve tissue engineering applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 183-193. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.02.014>
- NCBI, M. . (2020). *Bioprinting*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=bioprinting>
- NCBI., M. . (2003). *Intercellular Signaling Peptides and Proteins*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68036341>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materialstoday*, 88-95.
- O'Brien, D., Kia, C., Beebe, R., Macken, C., Bell, R., & Cote, M. et al. (2019). Evaluating the Effects of Platelet-Rich Plasma and Amniotic Viscous Fluid on Inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *Arthroscopy: The Journal Of Arthroscopic & Related Surgery*, 2421-2433. doi:10.1016/j.arthro.2019.03.021
- Ouyang, L., Highley, C. B., Sun, W., & Burdick, J. A. (2017). A generalizable strategy for the 3D bioprinting of hydrogels from nonviscous photo-crosslinkable inks. *Advanced Materials*. doi:10.1002/adma.201604983
- Percano, G. (2018). *Osteoarthritis, alta incidencia y prevalencia*. Retrieved from <https://percano.mx/blog-percano/osteoarthritis-alta-incidencia-y-prevalencia>
- Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H. (2016). Osteoarthritis. *The Clinician's Handbook of Natural Medicine*, 706-720. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-5514-0.00067-1>
- Rathan, S., Dejob, L., Schipani, R., Haffner, B., Möbius, M. E., & Kelly, D. J. (2019). Fiber Reinforced Cartilage ECM Functionalized Bioinks for Functional Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. doi:<https://doi.org/10.1002/adhm.201801501>
- S.J.V. Franklanda, V.M. Harikb, G.M. Odegarda. (2003). The stress–strain behavior of polymer–nanotube composites. *Composites Science and Technology*, 1655–1661. doi:10.1016/S0266-3538(03)00059-9
- Sean V Murphy & Anthony Atala. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 3-6. doi:doi:10.1038/nbt.2958

- Sean V. Murphy, Aleksander Skardal, Anthony Atala. (2012). Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *Society for Biomaterials*, 2.
- Shen, L., Yuan, T., Chen, S. et al. (2017). The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res*. doi:<https://doi.org/10.1186/s13018-017-0521-3>
- Soltan, N., Ning, L., Mohabatpour, F., Papagerakis, P., & Chen, X. (2019). Printability and Cell Viability in Bioprinting Alginate Dialdehyde-Gelatin Scaffolds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2976-2987. doi:<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00167>
- Sundman, E. A., Cole, B. J., Karas, V., Della Valle, C., Tetreault, M. W., Mohammed, H. O., & Fortier, L. A. (2013). The Anti-inflammatory and Matrix Restorative Mechanisms of Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*, 35-41. doi:<https://doi.org/10.1177/0363546513507766>
- Xiang Gao¹, Liyang Gao, Thomas Groth, Feng Tian. (2019). Fabrication and properties of an injectable sodium alginate/PRP. doi:10.1002 / jbm.a.36720
- Yao, B., Hu, T., Cui, X., Song, W., Fu, X., & Huang, S. (2019). enzymatically degradable alginate/gelatin bioink promotes cellular behavior and degradation in vitro and in vivo. *Biofabrication*. doi:<https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab38ef>
- Zhang, J., Wehrle, E., Vetsch, J. R., Paul, G. R., Rubert, M., & Müller, R. (2019). Alginate dependent changes of physical properties in 3D bioprinted cell-laden porous scaffolds affect cell viability and cell morphology. *Biomedical Materials*. doi:<https://doi.org/10.1088/1748-605x/ab3c74>
- Zhao, J., Huang, H., Liang, G. et al. (2020). Effects and safety of the combination of platelet-rich plasma (PRP) and hyaluronic acid (HA) in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. doi:<https://doi.org/10.1186/s12891-020-03262-w>

