

# TESIS DOCTORAL



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

*Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud*

---

Diseño, desarrollo, caracterización y validación de dos novedosos biocomposites porosos y degradables impresos en 3D basados en policaprolactona con actividad regeneradora y antimicrobiana para aplicaciones en Bioingeniería del tejido óseo

*Autor/a:*

Iván López González

*Directores/as:*

Dr. D. Luis Meseguer Olmo

*Murcia, septiembre de 2023*



# TESIS DOCTORAL



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

*Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud*

---

Diseño, desarrollo, caracterización y validación de dos novedosos biocomposites porosos y degradables impresos en 3D basados en policaprolactona con actividad regeneradora y antimicrobiana para aplicaciones en Bioingeniería del tejido óseo

*Autor/a:*

Iván López González

*Directores/as:*

Dr. D. Luis Meseguer Olmo

*Murcia, septiembre de 2023*





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Luis Ramón Meseguer Olmo, como Director de la Tesis Doctoral titulada “Diseño, desarrollo, caracterización y validación de dos novedosos biocomposites porosos y degradables impresos en 3D basados en policaprolactona con actividad regeneradora y antimicrobiana para aplicaciones en Bioingeniería del tejido óseo” realizada por D. Iván López González en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia a 19 de septiembre de 2023.

Dr. D. Luis Meseguer Olmo

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Meseguer Olmo', is written over a horizontal line.



## RESUMEN

Los dos estudios en los que se fundamenta este proyecto de investigación proporcionan suficiente originalidad e interés científico en cuanto a las posibilidades de que puedan ser incorporados, en un futuro no muy lejano, al amplio arsenal terapéutico imperante dentro del campo de la cirugía ósea reconstructiva.

A pesar de que el injerto óseo autólogo está considerado como el *gold standard* para el tratamiento de defectos óseos, su uso se ve limitado por una disponibilidad insuficiente y la morbilidad ocasionada en la zona de extracción. Como consecuencia y con la intención de obviar estos importantes inconvenientes, en las últimas décadas, se ha planteado el desarrollo de diversos tipos de materiales híbridos que imitan al tejido óseo, como una alternativa al uso de injertos óseos. No obstante, continúan existiendo obstáculos en el diseño de estos materiales en cuanto a la dificultad de integrar con una estrategia rápida y cómoda, componentes fundamentales como las propiedades de la matriz extracelular ósea, las células osteogénicas y las macromoléculas osteoinductoras.

Los dos materiales desarrollados en este proyecto están basados en una matriz tridimensional (scaffold) polimérica de policaprolactona (PCL), y se han combinado, por un lado, con micropartículas cerámicas de  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) para estudiar su potencial efecto osteoinductor, y por otro, con un hidrogel de quitosano (CS) cargado con un antibiótico glucopéptido de espectro reducido (vancomicina, Van) para estudiar su efecto bactericida frente a dos de las cepas de bacterias Gram positivas con mayor prevalencia en infecciones óseas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*).

El primer material estudiado (PCL/ $\beta$ -TCP) resultó ser biocompatible y bioactivo, tal como lo demostraron sus efectos satisfactorios tanto sobre la viabilidad de un cultivo de células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSCs*) como sobre la producción de matriz extracelular. Los ensayos de mineralización, actividad fosfatasa alcalina, y la cuantificación de los niveles de expresión génica de proteínas relacionadas con los procesos de osificación, revelaron un aumento en la diferenciación osteogénica en presencia de los scaffolds cargados con  $\beta$ -TCP con respecto a un grupo control de PCL nativa.

El segundo material desarrollado (PCL/CS/Van) demostró ser biocompatible, bioactivo y bactericida, siendo capaz de inhibir el crecimiento de dos cepas de bacterias Gram + (*S. aureus* y *S. epidermidis*) a distintas concentraciones de Van. Además, se evaluó la respuesta celular de las *ahMSCs* cultivadas en presencia de los scaffolds fabricados, en relación con su citotoxicidad y proliferación, constatándose que la liberación de Van no causó una alteración funcional del cultivo celular.

Los resultados obtenidos en ambos estudios sugieren que biocomposites híbridos biomiméticos óseos similares a los desarrollados en este proyecto, podrían ser excelentes candidatos para ser utilizados como scaffolds de uso común en Ingeniería de Tejidos con un potencial osteoinductivo y osteogénico.

## **PALABRAS CLAVE**

Policaprolactona,  $\beta$ -Fosfato Tricálcico, Quitosano, Vancomicina, Impresión 3D, Células Madre Mesenquimales, Diferenciación Osteoblástica, Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos, Ingeniería de Tejidos, Medicina Regenerativa

## **ABSTRACT**

The two studies on which this research project is based provide sufficient originality and scientific interest because of the possibilities of being incorporated, in the not-too-distant future, into the broad therapeutic arsenal prevailing in the field of reconstructive bone surgery.

Although autologous bone grafts are considered the gold standard for the treatment of bone defects, its use is limited by insufficient availability and the morbidity caused in the extraction area. As a consequence, the development of various types of hybrid materials that mimic bone tissue has been proposed in recent decades as an alternative to the use of bone grafts. However, there are still some obstacles in the design of these materials in a rapid and convenient strategy in terms of the difficulty of integrating fundamental components such as the properties of the bone extracellular matrix, osteogenic cells and osteoinductive macromolecules.

The two materials developed in this project are based on a three-dimensional polymeric polycaprolactone (PCL) scaffold, and have been combined, on the one hand, with  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) ceramic microparticles to study their potential osteoinductive effect, and on the other, with a chitosan (CS) hydrogel loaded with a reduced-spectrum glycopeptide antibiotic (vancomycin, Van) to study its bactericidal effect against two of the most prevalent strains of Gram positive bacteria in bone infections (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*).

The first material studied (PCL/ $\beta$ -TCP) proved to be biocompatible and bioactive, as demonstrated by its satisfactory effects on both the viability of a culture of adult human mesenchymal stem cells (*ahMSCs*) and on extracellular matrix production. Mineralization assays, alkaline phosphatase activity, and quantification of gene expression levels of proteins related to ossification processes, revealed an increase in osteogenic differentiation in the presence of PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds relative to the control group (native PCL).

The second material developed (PCL/CS/Van) proved to be biocompatible, bioactive and bactericide, by inhibiting the growth of two strains of Gram + bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*) at different vancomycin concentrations. The biological response of the cultured *ahMSCs* in the presence of the manufactured scaffolds was also evaluated in relation to their cytotoxicity and proliferation, and it was found that the release of Van did not cause any functional alteration to the cultured cells.

The results obtained in both studies suggest that bone biomimetic hybrid composite materials similar to those developed in this project could be excellent candidates for use as scaffolds with osteoinductive and osteogenic potential in tissue engineering applications.

## KEYWORDS

Polycaprolactone,  $\beta$ -Tricalcium Phosphate, Chitosan, Vancomycin, 3D printing, Mesenchymal Stem Cells, Osteoblastic Differentiation, Drug Delivery Systems, Tissue Engineering, Regenerative Medicine.



"Hasta las mejores pistas solo conducen a otras"  
De la película: *Seven (Se7en)* (1995) — David Fincher



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
<b>I - INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>1.1. Antecedentes .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2. El tejido óseo .....</b>	<b>32</b>
1.2.1. Osteobiología .....	32
1.2.2. Remodelación ósea.....	38
1.2.3. Estructura histológica del hueso .....	40
1.2.4. Infecciones óseas .....	43
1.2.5. Injertos óseos.....	45
<b>1.3. Ingeniería de Tejidos.....</b>	<b>48</b>
1.3.1. Triada de la Ingeniería de Tejidos.....	49
1.3.2. Procedimientos básicos en Ingeniería de Tejidos .....	54
<b>1.4. Impresión y Bioimpresión 3D .....</b>	<b>56</b>
1.4.1. Introducción a la Impresión 3D.....	56
1.4.2. Tipos de Impresión 3D .....	57
1.4.3. Tipos de Bioimpresión 3D.....	61
<b>1.5. Diseño e Impresión 3D scaffolds personalizados.....</b>	<b>65</b>
1.5.1. Adquisición de imágenes médicas de un paciente.....	66
1.5.2. Obtención de un modelo 3D a partir de imágenes médicas .....	67
1.5.3. Impresión 3D de los modelos obtenidos.....	68
<b>1.6. Biomateriales en Ingeniería de Tejidos .....</b>	<b>69</b>
1.6.1. Polímeros curables como soporte estructural .....	70
1.6.2. Biomateriales blandos e hidrogeles .....	70

1.6.3.	Metales.....	71
1.6.4.	Cerámicas .....	72
<b>II -</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>75</b>
<b>III -</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>79</b>
3.1.	Objetivo general.....	79
3.2.	Objetivos específicos.....	79
<b>IV -</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>83</b>
4.1.	<b>Estudio sobre las modificaciones de la expresión génica en el proceso de diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales humanas multipotentes derivadas de la médula ósea inducidas por un novedoso material poroso de grado médico impreso en 3D a base de policaprolactona y <math>\beta</math>-fosfato tricálcico .....</b>	<b>83</b>
4.1.1.	Fabricación de scaffolds porosos poliméricos impresos en 3D .....	86
4.1.2.	Caracterización de los filamentos compuestos y de los scaffolds de PCL impresos en 3D .....	88
4.1.3.	Adhesión de proteínas: Ensayo con Azul Brillante Coomassie.....	89
4.1.4.	Cinética de degradación <i>in vitro</i> .....	89
4.1.5.	Aislamiento, caracterización y cultivo de células madre mesenquimales humanas adultas ( <i>ahMSCs</i> ) derivadas de la médula ósea .....	90
4.1.6.	Caracterización de las <i>ahMSCs</i> .....	91
4.1.7.	Métodos de siembra celular.....	91
4.1.8.	Ensayos de viabilidad, adhesión y proliferación celular .....	92
4.1.9.	Ensayos de diferenciación osteoblástica .....	93
4.1.10.	Estadística.....	95
4.2.	<b>Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>epidermidis</i> de un novedoso sistema de liberación de fármacos degradable impreso en 3D basado en policaprolactona/quitosano/vancomicina. Estudio preclínico .....</b>	<b>95</b>

---

4.2.1.	Fabricación de scaffolds porosos de policaprolactona/quitosano cargados con vancomicina.....	98
4.2.2.	Caracterización de los scaffolds impresos en 3D.....	101
4.2.3.	Ensayo de absorción de agua .....	102
4.2.4.	Cuantificación de la liberación de vancomicina. ....	103
4.2.5.	Evaluación de propiedades antimicrobianas. ....	103
4.2.6.	Ensayos biológicos .....	104
4.2.7.	Ensayos de viabilidad y proliferación celular .....	105
4.2.8.	Ensayo de actividad metabólica celular.....	107
4.2.9.	Ensayos de diferenciación osteoblástica .....	107
4.2.10.	Estadística.....	108
<b>V -</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>5.1.</b>	<b>Estudio sobre las modificaciones de la expresión génica en el proceso de diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales humanas multipotentes derivadas de la médula ósea inducidas por un novedoso material poroso de grado médico impreso en 3D a base de policaprolactona y <math>\beta</math>-fosfato tricálcico.....</b>	<b>111</b>
5.1.1.	Diseño del estudio.....	111
5.1.2.	Composición y caracterización del material .....	112
5.1.3.	Caracterización de la estructura porosa mediante $\mu$ CT .....	113
5.1.4.	Influencia de la composición del scaffold.....	115
5.1.5.	Viabilidad y proliferación celular .....	117
5.1.6.	Estudios de diferenciación celular .....	120
<b>5.2.</b>	<b>Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>epidermidis</i> de un novedoso sistema de liberación de fármacos degradable impreso en 3D basado en policaprolactona/quitosano/vancomicina. Estudio preclínico .....</b>	<b>126</b>
5.1.7.	Caracterización de los scaffolds impresos en 3D.....	126

---

5.1.8.	Ensayos biológicos .....	133
5.1.9.	Ensayos de diferenciación osteoblástica .....	135
<b>VI -</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>6.1.</b>	<b>Contextualización.....</b>	<b>141</b>
<b>6.2.</b>	<b>Conclusiones relacionadas con los objetivos específicos.....</b>	<b>142</b>
6.2.1.	En relación con el biocomposite PCL/ $\beta$ -TCP.....	142
6.2.2.	En relación con el biocomposite PCL/CS/Van.....	143
<b>6.3.</b>	<b>Contextualization .....</b>	<b>144</b>
<b>6.4.</b>	<b>Conclusions related to the specific objectives.....</b>	<b>145</b>
6.4.1.	In relation to the PCL/ $\beta$ -TCP biocomposites.....	145
6.4.2.	In relation to the PCL/CS/Van biocomposite .....	146
<b>VII -</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>149</b>
<b>VIII -</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>173</b>

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

Las siglas y abreviaturas que aparecen en el manuscrito se han reseñado por orden alfabético.

<b>ABS</b>	Acrilonitrilo Butadieno Estireno
<b>ahMSCs</b>	Adult Human Mesenchymal Stem cells (Células Madre Mesenquimales humanas adultas)
<b>ALP</b>	Alkaline Phosphatase (Fosfatasa Alcalina)
<b>AR-s</b>	Alizarin Red Solution (Solución Rojo Alizarina)
<b>BMPs</b>	Proteínas Óseas Morfogenéticas
<b>β-TCP</b>	β-Fosfato Tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato Cálcico
<b>CAD</b>	Diseño Asistido por Computadora
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CMEB</b>	Concentración Mínima de Erradicación de Biopelículas
<b>Col</b>	Colágeno
<b>Col I</b>	Colágeno tipo I
<b>CS</b>	Quitosano
<b>μCT</b>	Microtomografía computarizada
<b>DDS</b>	Drug Delivery System (Sistema de Liberación de Fármacos)
<b>DICOM</b>	Estándar en Imagenología Digital y Comunicaciones en Medicina
<b>DMEM</b>	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
<b>EDX</b>	Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FCs</b>	Factores de Crecimiento
<b>FDM</b>	Modelado por Deposición Fundida

---

<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
<b>GA</b>	Grado de Acetilación
<b>GFs</b>	Growth Factors (Factores de Crecimiento)
<b>GM</b>	Medio de Crecimiento
<b>HA</b>	Hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
<b>HE</b>	Hematoxilina Eosina
<b>IGF-I y II</b>	Factores de crecimiento insulínicos I y II
<b>ISCT</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
<b>LAB</b>	Bioimpresión Asistida por Láser
<b>LDH</b>	Lactato Deshidrogenasa
<b>MEB</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>MET</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>MEx</b>	Matriz Extracelular
<b>MO</b>	Microscopía Óptica
<b>MSCs</b>	Mesenchymal Stem Cells (Células Madre Mesenquimales)
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>NSC</b>	National Science Foundation (Fundación Nacional de Ciencias)
<b>Ob</b>	Osteoblastos
<b>Oc</b>	Osteocitos
<b>OCN</b>	Osteocalcina
<b>OM</b>	Osteogenic medium (Medio Osteogénico)
<b>ON</b>	Osteonectina
<b>OPN</b>	Osteopontina
<b>PA</b>	Poliamidas
<b>PCL</b>	Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (Policaprolactona)
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PGA</b>	Ácido Poliglicólico
<b>PLA</b>	Ácido Poliláctico
<b>PMMA</b>	Polimetilmetacrilato

---

<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Fosfato
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RER</b>	Retículo Endoplasmático Rugoso
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
<b>RUNX2</b>	Runt-related transcription factor 2 (Factor de Transcripción Runx-2)
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Barrido)
<b>SLA</b>	Estereolitografía
<b>SLF</b>	Sistemas de Liberación de Fármacos
<b>SLC</b>	Sistemas de Liberación Controlada
<b>SLS</b>	Sinterizado Selectivo por Láser
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factores de Crecimiento Transformantes- $\beta$
<b>TPE</b>	Elastómeros Termoplásticos
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar (Agar Triptona-Soja)
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth (Caldo de Triptona de Soja)
<b>Van</b>	Vancomycin (Vancomicina)
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular



## ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes representativas que detallan las principales afecciones musculoesqueléticas que afectan a la población moderna. ....	32
Figura 2. Imágenes representativas del tejido óseo obtenidas con microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB)....	34
Figura 3. Aspecto morfológico de los osteoblastos (Ob) mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET). ....	35
Figura 4. Imágenes histológicas mediante MO y MET de osteocitos (Oc).....	36
Figura 5. Imágenes histológicas obtenidas mediante MO y MEB de células osteoclasticas. ....	37
Figura 6. Esquema e imágenes representativas de las diferentes fases que conforman el proceso de remodelación ósea. ....	39
Figura 7. Estructura y divisiones del hueso. ....	40
Figura 8. Organización del tejido óseo compacto. ....	41
Figura 9. Organización del tejido óseo esponjoso. ....	42
Figura 10. Imágenes clínicas radiográficas representativas de una infección ósea crónica secundaria a la implantación de placas de osteosíntesis utilizadas para contención de una fractura de codo. ....	44
Figura 11. Principales tipos de injerto utilizados en clínica para tratar defectos óseos. ....	47
Figura 12. Ingeniería de Tejidos: un campo multidisciplinar estrechamente coordinado. ....	48
Figura 13. Componentes básicos de la Triada de la Ingeniería Tisular. ....	49
Figura 14. Representación esquemática del proceso de sustitución progresiva ( <i>creeping substitution</i> ). ....	51
Figura 15. Capacidad de autorrenovación y diferenciación de las MSCs. ....	52

---

Figura 16. Procedimientos básicos en Ingeniería de Tejidos.....	54
Figura 17. Imágenes representativas conseguidas mediante MEB de un modelo de ingeniería tisular.....	55
Figura 18. Esquema representativo de las tecnologías de fabricación sustractiva y aditiva. ....	57
Figura 19. Modelado por Deposición Fundida (FDM). ....	58
Figura 20. Estereolitografía (SLA).....	59
Figura 21. Sinterizado Selectivo por Láser (SLS). ....	60
Figura 22. Bioimpresión por extrusión. ....	62
Figura 23. Bioimpresión por inyección. ....	63
Figura 24. Bioimpresión asistida por láser. ....	64
Figura 25. Bioimpresión por estereolitografía.....	65
Figura 26. Etapas a seguir para la obtención de modelos 3D personalizados.....	66
Figura 27. Ejemplo de adquisición de imágenes médicas mediante tomografía computarizada (CT).....	67
Figura 28. Ejemplo de segmentación realizado con el programa Invesalius 3.1, para la obtención del modelo 3D del cráneo de un paciente. ....	68
Figura 29. Impresión 3D de un cráneo humano a partir de un modelo CAD obtenido por microtomografía computarizada.. ....	69
Figura 30. Dispositivo utilizado para la bioimpresión 3D de los composites y proceso de fabricación de los scaffolds. ....	87
Figura 31. Representación esquemática de las estrategias actuales de tratamiento antibiótico utilizadas para controlar las infecciones óseas.....	96
Figura 32. Micrografías de (A) scaffolds porosos y (B) sólidos de PCL impresos con la bioimpresora REGEMAT 3D Bio V1®.....	99
Figura 33. Tratamientos con plasma aplicados sobre los scaffolds sólidos de policaprolactona. ....	101
Figura 34. Determinación de la concentración óptima de <i>ahMSCs</i> .....	106
Figura 35. Representación esquemática del diseño del estudio, que incluye la planificación de los experimentos realizados. ....	111

Figura 36. Imágenes de los scaffolds de (A,B) PCL y (C,D) PCL/ $\beta$ -TCP tomadas con un estereomicroscopio a diferentes aumentos.....	113
Figura 37. Reconstrucción 3D de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP (vista superior: (A,B); lateral: (C,D); e inferior: (E,F)). .....	114
Figura 38. Ensayo con Azul Brillante de Coomassie realizado en los scaffolds de PCL (fila superior) y PCL/ $\beta$ -TCP (fila inferior).....	116
Figura 39. Viabilidad celular mediante el ensayo AlamarBlue tras 24 y 72 h de siembra directa de <i>ahMSCs</i> en scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP.....	119
Figura 40. Ensayo de actividad metabólica celular (AlamarBlue®) en <i>ahMSCs</i> sembradas sobre los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP a diferentes periodos de estudio. ....	120
Figura 41. Actividad fosfatasa alcalina de las <i>ahMSCs</i> sembradas en presencia de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP tras 7 y 14 días de cultivo.....	121
Figura 42. Ensayo de cuantificación de Rojo Alizarina S de <i>ahMSCs</i> sembradas en presencia de scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP tras 7 y 14 días de cultivo.....	122
Figura 43. Expresión de los marcadores de membrana (A) CD73, (B) CD90 y (C) CD105 de las células sembradas en contacto indirecto con los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP. ....	123
Figura 44. Resultados de la cuantificación de la expresión de los marcadores osteogénicos por qRT-PCR tras 7 y 14 días de cultivo.....	125
Figura 45. Micrografías MEB de los scaffolds de (1) PCL, (2) PCL/CS y (3, 4, 5, 6) PCL/CS/Van cargados con 1%, 5%, 10% y 20% w/t de vancomicina.....	127
Figura 46. (A) Ángulo de contacto $\theta$ (AC,) con el agua en scaffolds de PCL sólidos (no porosos) impresos en 3D antes y después de los tratamientos con plasma... 129	
Figura 47. Absorción de PBS en función del tiempo de los scaffolds de PCL/CS y PCL/CS/Van (1, 5, 10 y 20%) en contacto con el medio PBS (pH = 7,4). ....	130
Figura 48. Perfiles de liberación acumulada de vancomicina de scaffolds de PCL/CS cargados con vancomicina al 1, 5, 10 y 20 % durante 14 días (336 h). ....	131
Figura 49. Halos de inhibición (mm) producidos por los scaffolds de PCL/CS/Van cargados con 1, 5, 10 y 20 % p/t de vancomicina frente a <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> . ....	132

---

Figura 50. Resultados de citotoxicidad utilizando el ensayo de LDH después de colocar los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/Van en contacto indirecto con <i>ahMSCs</i> durante 24 y 72 h. ....	133
Figura 51. Actividad metabólica celular de las <i>ahMSCs</i> utilizando el ensayo AlamarBlue® en diferentes períodos de tiempo. ....	134
Figura 52. Actividad Fosfatasa Alcalina de las <i>ahMSCs</i> después de ser cultivadas durante 7 y 14 días en contacto indirecto con scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%Van.....	135
Figura 53. Tinción con Rojo Alizarina de <i>ahMSCs</i> después de cultivarlas durante 21 días en presencia de scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%Van.....	136

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Principales características, ventajas, y desventajas de las tecnologías de impresión 3D más utilizadas en la actualidad .....	61
Tabla 2. Cuantificación de la expresión de marcadores (CD) de las <i>ah</i> MSC en los países 3-4 mediante citometría de flujo.....	118



**ÍNDICE DE ANEXOS**

ANEXO 1. Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human MSC Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Composite .....	173
ANEXO 2. Evaluation of the In Vitro Antimicrobial Efficacy against <i>Staphylococcus aureus</i> and epidermidis of a Novel 3D-Printed Degradable Drug Delivery System Based on Polycaprolactone/Chitosan/Vancomycin—Preclinical Study .....	194



# I – INTRODUCCIÓN

---



## I - INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

El desarrollo de la dinámica social, que engloba la estructura, las interacciones y las normas culturales de una sociedad, puede tener una influencia significativa en la expectativa de vida de sus individuos. Aunque desde el año 2000 la esperanza de vida haya aumentado en cinco años, factores socioeconómicos, el incremento del parque automovilístico, las nuevas ocupaciones laborales y las actividades recreativas, pueden tener consecuencias en la salud ósea de la población, aumentando las posibilidades de padecer problemas osteoarticulares y accidentes de alcance significativo. Asimismo, el envejecimiento generalizado de la población se ha visto acompañado por un notable incremento de las afecciones musculoesqueléticas de diversa etiología que requieren su reparación (1) (**Figura 1**).

En la actualidad, el conocimiento y las estrategias óptimas para llevar a cabo la reparación del tejido óseo siguen suponiendo todo un desafío para clínicos e investigadores, haciéndose cada día más patente la aparición de lesiones óseas causadas por malformaciones congénitas, politraumatismos, infecciones, resecciones tumorales y problemas circulatorios (2). Por ello, durante los últimos 30 años, la comunidad científica se ha volcado en el desarrollo de nuevos materiales y dispositivos capaces de sustituir tejidos vivos del cuerpo humano, proporcionando a los pacientes los beneficios de una recuperación rápida y completa, y en muchos casos, una mayor longevidad y mejor calidad de vida (3, 4). Esto ha provocado una gran revolución en el campo emergente de la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos, y más concretamente en el campo de los biomateriales, que han experimentado una gran evolución desde su aparición en la década de los 60 hasta su aplicación en la medicina moderna (5).

Por otro lado, los avances en biotecnología y la aparición de nuevas tecnologías como la impresión y la bioimpresión 3D, han permitido ir un paso más allá en la fabricación de implantes capaces de adaptarse a las necesidades únicas de cada paciente, impulsando el desarrollo de nuevos biomateriales para la fabricación de tejidos y órganos personalizados.

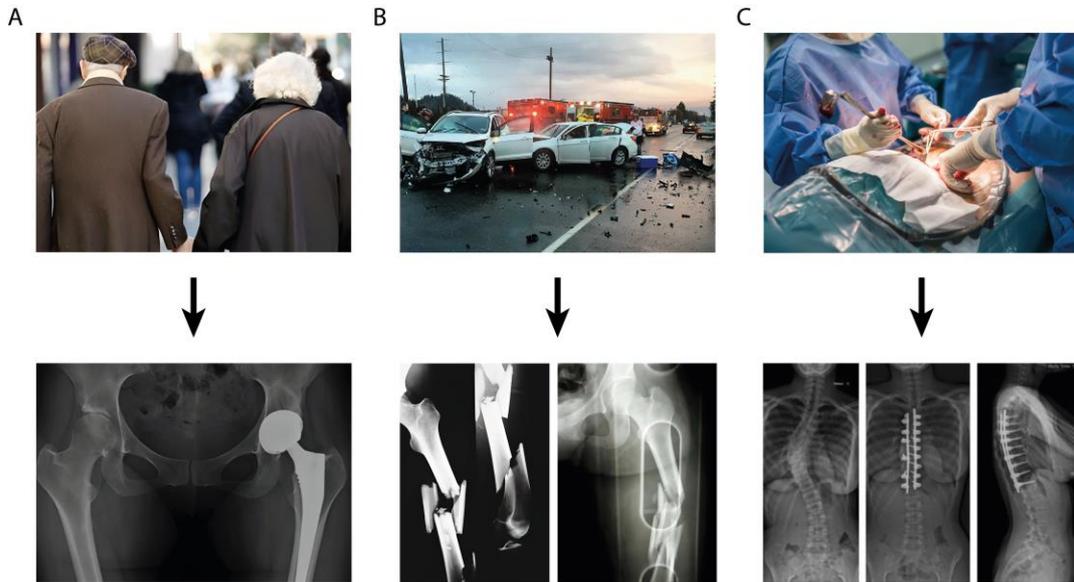


Figura 1. Imágenes representativas que detallan las principales afecciones musculoesqueléticas que afectan a la población moderna. (a) Envejecimiento generalizado de la población, (b) Accidentes de tráfico, (c) Trastornos musculoesqueléticos. [Elaboración propia]

## 1.2. EL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es una variedad de tejido conjuntivo que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. Se trata de un tejido complejo y dinámico cuyas funciones más importantes son: (i) proporcionar un soporte estructural para la locomoción, (ii) proteger los órganos internos vitales (como el cerebro, el corazón y los pulmones), y (iii) preservar minerales esenciales, como son el calcio y el fósforo, que resultan esenciales en numerosos procesos fisiológicos (6). Además, el tejido óseo desempeña un papel vital en la producción de células sanguíneas, ya que alberga la médula ósea roja en su interior, donde tiene lugar la hematopoyesis (7, 8).

### 1.2.1. Osteobiología

El tejido óseo está formado por tres elementos fundamentales, que incluyen: (i) una **matriz ósea inorgánica**, inicialmente no calcificada (osteóide), y que más tarde se calcifica por depósito de minerales de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) dando lugar a cristales de hidroxapatita (HA), (ii) una **matriz ósea**

**orgánica**, formada en un 90% por colágeno tipo I (Col I) y macromoléculas señalizadoras (proteoglicanos y glucosaminoglicanos), y (iii) una **fase celular**, integrada por osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, y células hematopoyéticas.

#### 1.2.1.1. *Matriz ósea inorgánica*

El componente inorgánico del tejido óseo está constituido por una alta concentración de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y fósforo ( $\text{P}^{3-}$ ) y, en menor medida, de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), flúor ( $\text{F}^-$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ), representando alrededor del 60-70% del peso seco del hueso. Su principal componente es la hidroxiapatita (HA), un mineral de fórmula  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  que se presenta en forma de cristal plano de 20-80 nm de largo y 2-5 nm de espesor (9). Estos cristales de HA se depositan sobre las fibras de colágeno que constituyen la matriz extracelular (MEx) del hueso, confiriéndole rigidez y resistencia a la compresión (10, 11).

#### 1.2.1.2. *Matriz ósea orgánica*

La fase orgánica de la matriz extracelular representa alrededor del 30-40% del peso seco del hueso, y está compuesta principalmente por colágeno (~90% Col I), proteínas no-colágenas (~5%) y lípidos (~2%) (12). A su vez, las proteínas de la MEx pueden dividirse en: (i) **proteínas estructurales**, como el colágeno y la fibronectina, que desempeñan un papel fundamental en la adhesión celular y en la regulación de la mineralización ósea, y (ii) **proteínas con funciones específicas**, entre las cuales destacan: (a) las que actúan en la comunicación intercelular en los focos de reparación de tejidos, más conocidas como factores de crecimiento (FCs), (b) las que actúan como moléculas señalizadoras, (c) las que poseen función enzimática, y (d) las encargadas de regular el diámetro de las fibras de colágeno (13). Estas fibras de colágeno se organizan en haces y forman la base de la matriz extracelular, proporcionando resistencia a la tracción y flexibilidad al tejido óseo (**Figura 2**)

En conjunto, la combinación de minerales (fase inorgánica) y fibras de colágeno (fase orgánica) en la matriz extracelular otorga al tejido óseo una combinación única de resistencia, rigidez y flexibilidad.

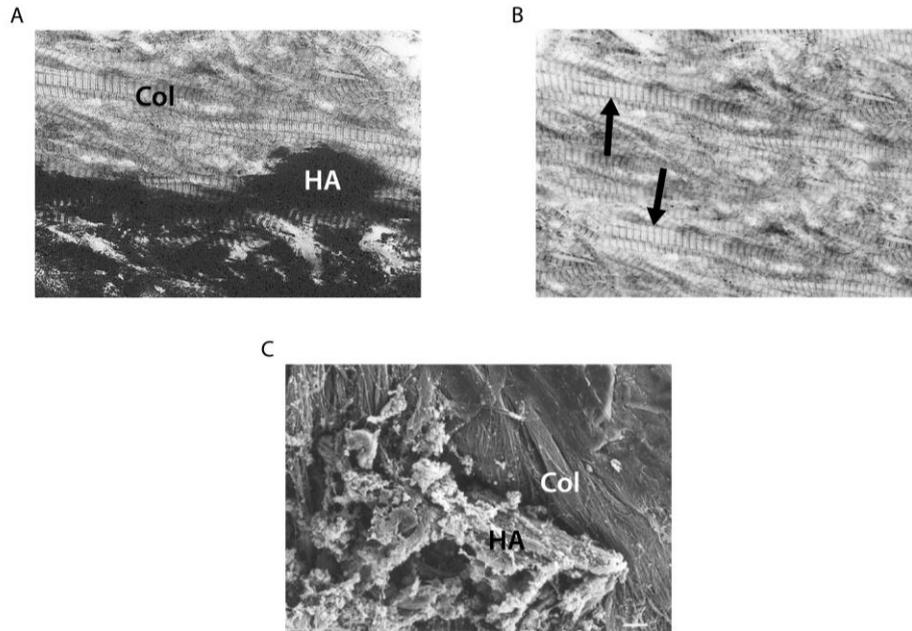


Figura 2. Imágenes representativas del tejido óseo obtenidas con microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Imágenes tomadas con MET representativas de: (a) Fibras de colágeno con estriación característica sobre material electrodens correspondiente a cristales de hidroxapatita (Col: colágeno; HA: hidroxapatita), (b) Detalle característico de las bandas de estriación de las fibras de colágeno (flechas: estriaciones). (c) Aspecto morfológico mediante MEB correspondiente a la imagen A. [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

### 1.2.1.3. Fase celular

El tejido óseo contiene varios tipos de células con una morfología y función específica. Las principales células del hueso son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, pero el tejido óseo también contiene células progenitoras que pueden diferenciarse en osteoblastos, y células del sistema inmunológico. En conjunto, estas células trabajan de manera coordinada para formar, mantener y remodelar el tejido óseo, garantizando su función estructural y metabólica en el organismo (6). A continuación, se describen las características de los principales tipos celulares presentes en el tejido óseo.

Los **osteoblastos** son células poliédricas con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas que derivan de los precursores osteogénicos residentes en la médula ósea. Son los responsables de la síntesis y secreción de la matriz ósea orgánica – denominada osteoide –, sintetizan factores de crecimiento, y median en la

reabsorción llevaba a cabo por los osteoclastos mediante la síntesis de citoquinas específicas (14, 15). Tienen un retículo endoplásmico rugoso (RER) bien desarrollado característico de su alta actividad de síntesis proteica, y un complejo de Golgi prominente debido a su función secretora. Cuando los osteoblastos terminan su función secretora, tienen dos destinos posibles: (i) quedar atrapados en la matriz osteoide que ellos mismos producen, sufriendo un proceso de diferenciación terminal, dejando de producir matriz y diferenciándose a osteocitos (16), o (ii) permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo (también denominadas células intermedias), que se corresponden con un tipo celular entre osteoblasto y osteocito, y pasan a revestir las superficies óseas del interior de los huesos (17) (Figura 3)

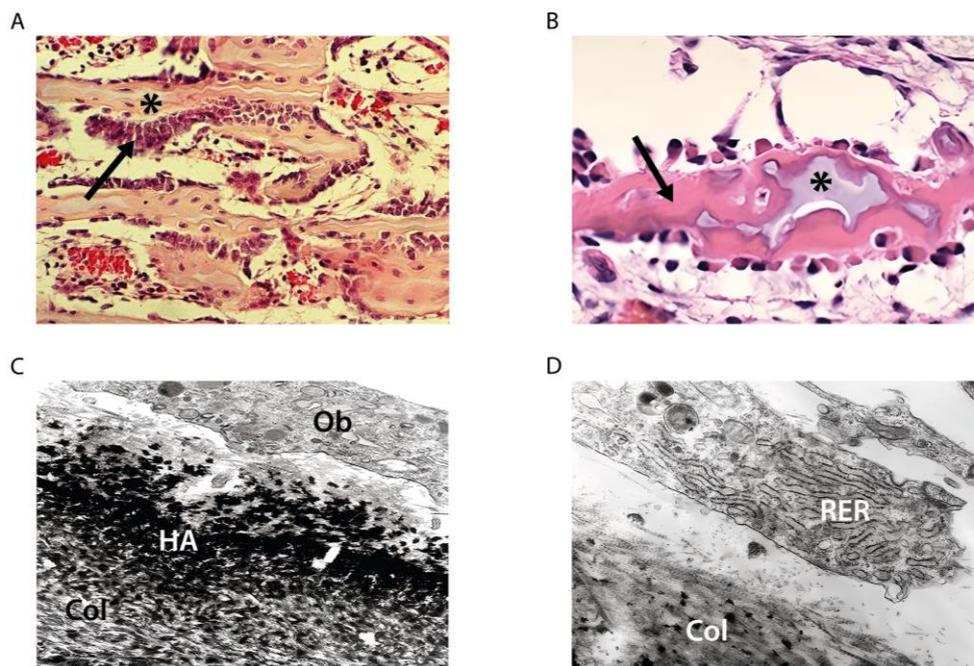


Figura 3. Aspecto morfológico de los osteoblastos (Ob) mediante microscopía óptica (MO) y MET. (a) Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina (HE) de células osteoblásticas sobre la superficie de trabéculas óseas dispuestas en empalizada (flecha: ribete osteoblástico, asterisco: trabéculas óseas) (b) Detalle del tejido óseo neoformado maduro (flecha: osificado, asterisco: inmaduro u osteoide) y osteoblastos en superficie; (c, d) Imágenes de un osteoblasto adquiridas con MET en las que se detalla un RER desarrollado próximo a fibras de colágeno, algunas de ellas mineralizadas. (Col: colágeno; HA: hidroxapatita, Ob: osteoblasto, RER: retículo endoplasmático rugoso) [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

Los **osteocitos** son las células propias del tejido óseo maduro. Son las células más abundantes del esqueleto, representando en torno al 90-95% del total de células óseas (18). Están rodeados de matriz ósea y se localizan dentro de pequeñas cavidades llamadas lagunas osteocíticas. Se caracterizan por tener una morfología estrellada con prolongaciones citoplasmáticas que se extienden por pequeños canales (llamados canalículos), a través de los cuales se comunican con osteocitos vecinos o con células de revestimiento óseo mediante uniones de comunicación (19). Los osteocitos no se dividen y pueden vivir durante décadas en la matriz ósea, estando su vida útil determinada por el proceso de remodelación ósea (20). Además, los osteocitos son los encargados de regular el balance entre la formación y la resorción de hueso, y actúan como reguladores de la resistencia ósea, mandando señales a las células que se encuentran en la superficie ósea (15) o modificando su entorno local (21) (**Figura 4**)

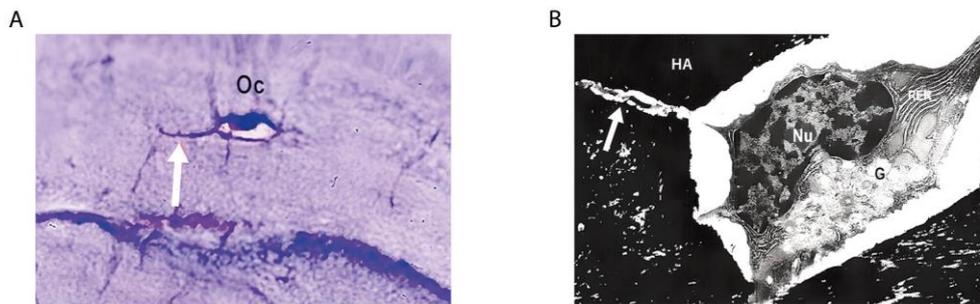


Figura 4. Imágenes histológicas mediante MO y MET de osteocitos (Oc). (a) Imagen histológica representativa utilizando la tinción Tricrómico de Masson de una célula osteocítica rodeada de matriz extracelular mineralizada. Adviértase la presencia de canalículos procedentes de la laguna osteocítica (Oc: osteocito; flecha: canalículo); (b) Imagen representativa adquirida mediante MET en la que destaca un osteocito rodeado de material electrodenso correspondiente a mineral de hidroxapatita depositado sobre fibras de colágeno (HA: hidroxapatita, Nu: núcleo, G: complejo de Golgi, RER: retículo endoplasmático rugoso, flecha: canalículo). [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

Por último, los **osteoclastos** son células de gran tamaño (20-200  $\mu\text{m}$ ), multinucleadas, y de morfología irregular que se encuentran adosadas a la superficie del tejido óseo que debe ser reabsorbido. En la superficie que está en contacto con la matriz a reabsorber se distinguen dos zonas: (i) un anillo externo (o zona clara) que se corresponde con una especialización de la superficie celular en la que la membrana se asocia estrechamente al hueso que delimita el área que se va a reabsorber,

y (ii) la región central (o borde estriado) que presenta profundos repliegues de la membrana celular, bajo los cuales se concentran una gran cantidad de lisosomas y mitocondrias, además del ergatoplasma y cisternas del Golgi (**Figura 5**). Los osteoclastos se originan por fusión de monocitos que han abandonado la sangre circulante, por lo que pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares. Cuando las células precursoras hematopoyéticas mononucleares migran a la superficie ósea, se fusionan entre sí, y se adhieren a la superficie del hueso para formar osteoclastos activos (20). Una vez activados, los osteoclastos degradan y eliminan la matriz ósea mineralizada liberando calcio y otros minerales al torrente sanguíneo. Para iniciar el proceso de resorción, los osteoclastos acidifican las lagunas para disolver el mineral óseo (bioapatita) y las proteínas de la matriz (22). Los osteoclastos suelen encontrarse en las lagunas de Howship o en los lugares de reabsorción del hueso y su actividad resulta esencial en el proceso de remodelación ósea.

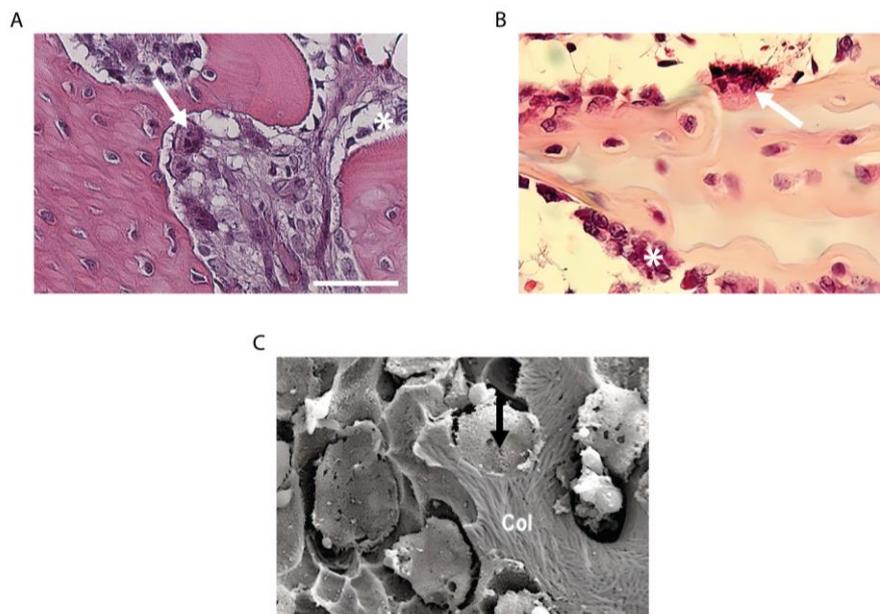


Figura 5. Imágenes histológicas obtenidas mediante MO y MEB de células osteoclásticas. (a, b) Imágenes histológicas obtenidas mediante tinción de HE de osteoclastos dispuestos en la superficie del tejido óseo alternando con un ribete de osteoblastos (flecha: osteoclastos, asterisco: ribete de osteoblastos). Destacar que el número de osteoclastos es muy inferior al de células osteoblásticas (barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ ); (c) Imagen adquirida mediante MEB en la que se advierte una fase de resorción activa de fibras de colágeno por parte de los osteoclastos (Col: colágeno, flecha: osteoclasto). [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

### 1.2.2. Remodelación ósea

La **remodelación ósea** es un proceso continuo que se produce en todo el esqueleto y que involucra a las células óseas, en particular a osteoclastos y osteoblastos, en el que se alternan ciclos de destrucción del hueso (**resorción ósea**) con ciclos de formación o reemplazo del hueso dañado por nuevo tejido óseo (**neoformación ósea**) (**Figura 6**). Este proceso es esencial para adaptarse a las demandas mecánicas cambiantes a lo largo de la vida y para mantener la salud y la integridad del esqueleto, ya que permite la reparación de pequeñas grietas o daños en el hueso. El proceso de remodelación ósea consta de varias fases, entre las cuales encontramos:

1. **Resorción:** La remodelación ósea comienza con la activación de los osteoclastos. Esta puede ocurrir en respuesta a factores hormonales, mecánicos o bioquímicos. Durante la fase de activación, los osteoclastos se unen a la superficie del hueso y forman una estructura similar a una "ventosa" conocida como "zona de sellado". Una vez activados, los osteoclastos destruyen el hueso mediante la producción de iones de hidrógeno por parte de sus endosomas (disolviendo la fase mineral) y mediante la secreción de enzimas proteolíticas (degradando la matriz orgánica), originando fragmentos de matriz que serán fagocitados por las células macrofágicas (23). Esto crea pequeñas cavidades en la superficie del hueso conocidas como "Lagunas de Howship".
2. **Reversión:** Una vez terminado el proceso de resorción, se produce una fase de reversión que dura alrededor de 9 días. En ella, los osteoclastos se retiran de las lagunas de Howship y los osteoblastos son reclutados en la zona de remodelación, donde formarán nuevo tejido óseo. Los mecanismos reguladores que detienen la actividad osteoclástica son aún desconocidos, pero se cree que podrían deberse a que: (i) los osteoclastos sufran apoptosis tras un periodo extenso de actividad resorptiva (24), (ii) la acumulación de calcio en las lagunas de resorción provoque una rápida retracción celular inhibiendo la liberación de enzimas y la resorción ósea (25), (iii) la liberación de TGF- $\beta$  u otros péptidos relacionados con la MEx inactiven a los osteoclastos y atraigan a los osteoblastos (26, 27).

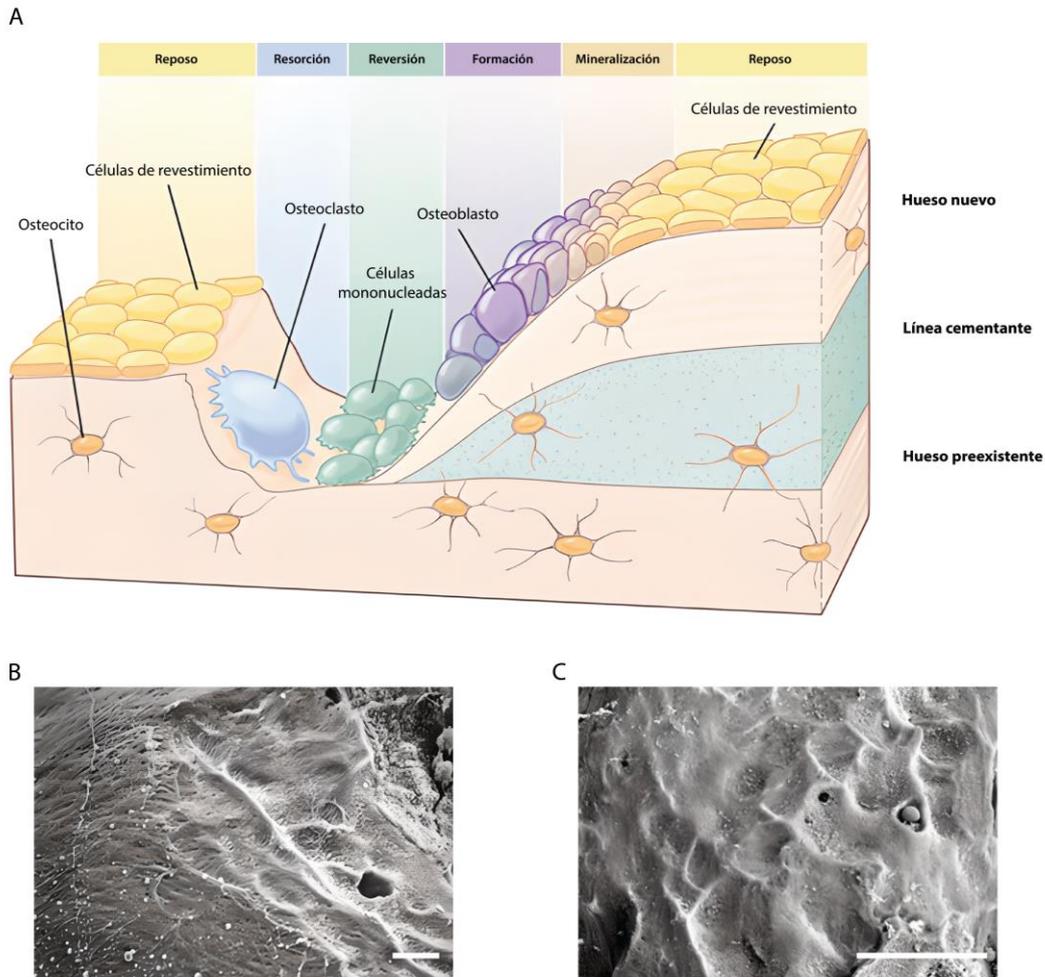


Figura 6. Esquema e imágenes representativas de las diferentes fases que conforman el proceso de remodelación ósea. (a) Imagen representativa mediante MEB del límite del frente de remodelación. La zona rugosa indica el área de resorción ósea (barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ). (b) Detalle de la imagen anterior en la que puede observarse un osteoclasto en su laguna de Howship (barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ ). [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

3. **Formación:** La formación ósea puede tardar entre 4 y 6 meses en completarse. En esta fase, los osteoblastos comienzan a depositar una nueva matriz ósea (osteóide) compuesta por proteínas (Col I, entre otras) para rellenar las cavidades dejadas por los osteoclastos. A medida que la matriz se acumula, los osteoblastos liberan sustancias que atraen a los minerales, como el calcio y el fósforo, endureciéndola y mineralizándola (28).

4. **Mineralización:** La fase final es el proceso de mineralización (o calcificación), que comienza unos 30 días después de la formación del osteoide. En el hueso trabecular la mineralización finaliza 90 días después de la deposición del osteoide, mientras que en el hueso cortical finaliza a los 130 días (28). Tras la mineralización, el hueso entra en fase de reposo y la cantidad de hueso formado es igual a la cantidad reabsorbida (29).

### 1.2.3. Estructura histológica del hueso

Histológicamente, el tejido óseo puede clasificarse en dos tipos principales: (i) **tejido óseo compacto** (o cortical) y (ii) **tejido óseo esponjoso** (o trabecular). Ambos tipos se componen de células, matriz ósea y canales vasculares, pero difieren en su organización y distribución en el esqueleto (**Figura 7**).

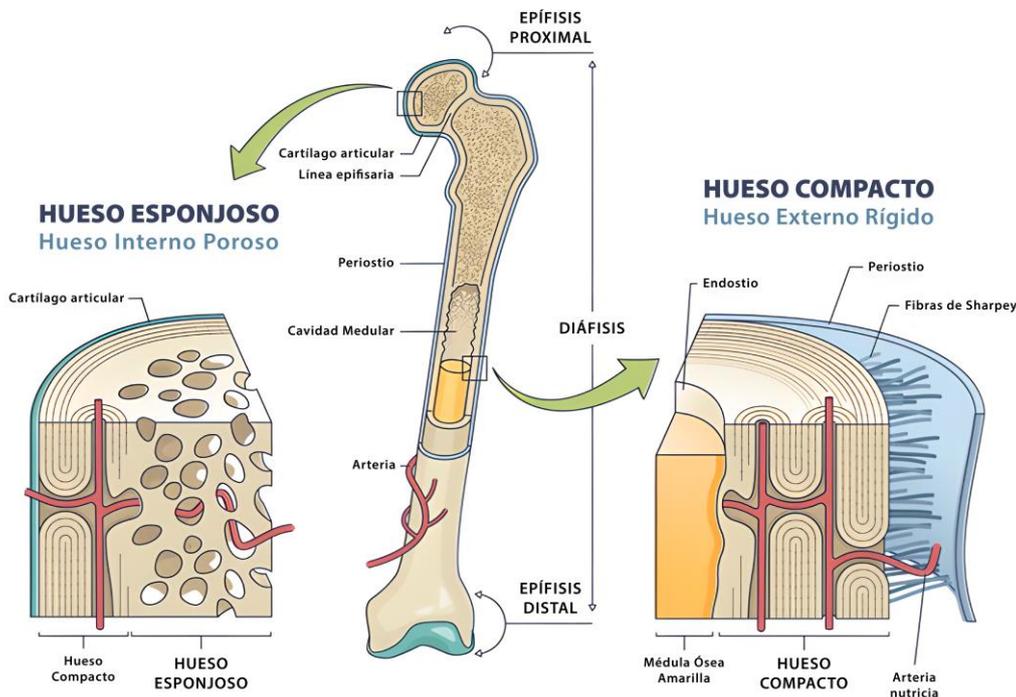


Figura 7. Estructura y divisiones del hueso. [Adaptada de: Encyclopaedia Britannica, Inc. (2013)]

### 1.2.3.1. *Tejido óseo compacto*

El tejido óseo compacto (o cortical) es denso y duro, y forma la capa externa de los huesos (**Figura 7**). Representa aproximadamente el 80% de la masa ósea total del esqueleto humano (30). Se caracteriza por tener una porosidad muy baja (entorno al 10%) y está organizado en unidades cilíndricas llamadas osteonas, que son paralelas al eje largo del hueso. Cada osteona está compuesta por varias láminas concéntricas de matriz ósea, llamadas canalículos (o láminas circunferenciales), que rodean un canal central (Conducto de Havers) que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (**Figura 8**).

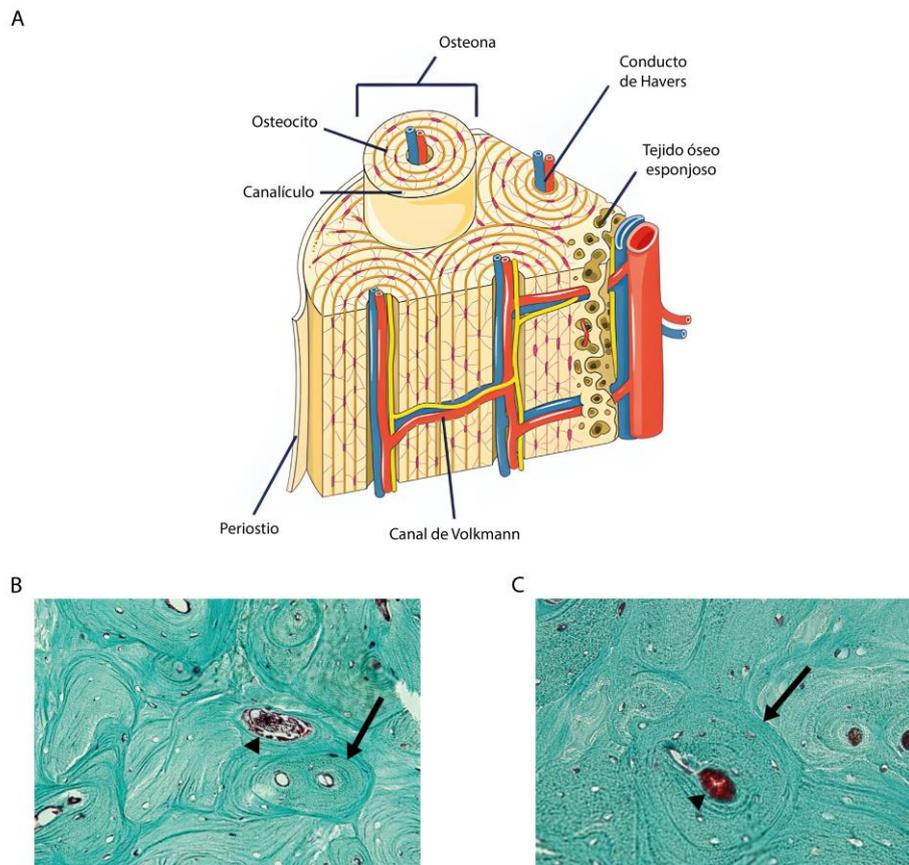


Figura 8. Organización del tejido óseo compacto. (a) Representación esquemática de la estructura del tejido óseo compacto. (b) Imágenes histológicas obtenidas mediante MO teñidas con Tricrómico de Masson en las que se observan diversas osteonas agrupadas por líneas de cementación (flecha negra) y un orificio central que se corresponde con un conducto de Havers (cabeza de flecha). (c) Detalle de la figura anterior en la que se observa un capilar ocupando el conducto de Havers. [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

Estos conductos están interconectados a lo largo de su trayectoria por canales de Volkmann. Entre las osteonas, existen espacios intersticiales llamados lagunas, que contienen osteocitos que comunican entre sí a través de canalículos. La superficie externa del hueso cortical está rodeada por una capa externa de tejido conectivo denso llamada periostio, que proporciona un sitio de unión para los tendones y ligamentos y contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos y células precursoras de osteoblastos y osteoclastos.

#### 1.2.3.2. Tejido óseo esponjoso

El tejido óseo esponjoso (o trabecular) se encuentra en el interior de los huesos, especialmente en los extremos de los huesos largos (epífisis proximal y distal) y en los huesos planos como el esternón, la pelvis y las vértebras (**Figura 7**).

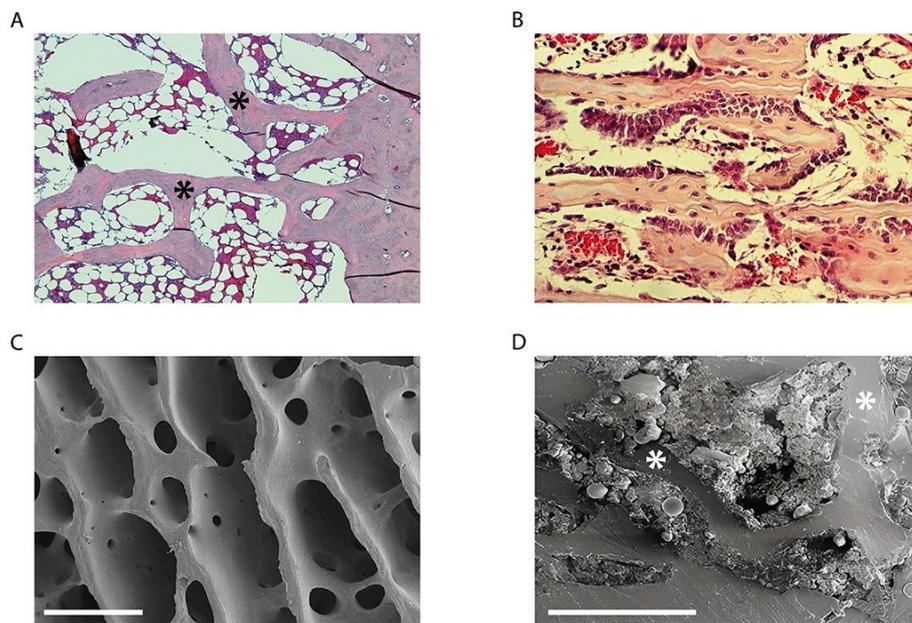


Figura 9. Organización del tejido óseo esponjoso. (a) Imagen histológica obtenida con tinción HE en la que destaca la orientación y disposición de las trabéculas óseas (asteriscos) del tejido esponjoso rodeadas de médula ósea hematopoyética. (b) Detalle a mayor aumento en el que se pueden identificar los elementos celulares característicos de este tejido. (c) Imagen obtenida mediante MEB en la que se detalla la disposición de las trabéculas óseas y los orificios que permiten la interconexión de los espacios intertrabeculares (barra de escala: 1 mm); (d) Detalle de los espacios trabeculares ocupados por elementos de la médula ósea hematopoyética (asteriscos: trabéculas) (barra de escala: 1 mm). [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

El compartimento trabecular representa aproximadamente un 20% de la masa total del esqueleto (30). Está formado por una red interconectada de trabéculas que le confieren una porosidad que oscila entre el 50 y el 90%, y el espacio restante está relleno de médula ósea hematopoyética y grasa. El tejido óseo esponjoso no tiene una estructura organizada en osteonas como el tejido óseo compacto. Sin embargo, la disposición de las trabéculas sigue las líneas de estrés para proporcionar resistencia y soporte con un peso mínimo (**Figura 9**).

#### 1.2.4. Infecciones óseas

La osteomielitis (del griego *osteon* - hueso, *mielos* - médula, *itis* - inflamación) es una enfermedad inflamatoria compleja causada por una infección bacteriana, y constituye una de las complicaciones más graves de la cirugía osteoarticular (31). El diagnóstico y tratamiento tempranos usualmente llevan a la resolución completa de la infección, no obstante, un retraso en el diagnóstico o una terapia inadecuada, pueden ocasionar el desarrollo de una infección crónica (osteomielitis persistente) acompañada de una pérdida de la estructura normal del hueso, que puede tener consecuencias graves en la calidad de vida de los individuos afectados, ya que conlleva repercusiones de tipo físico, social, laboral y económico (32, 33). En cuanto a su patogénesis, esta es compleja y variada debido a que el germen puede proceder del propio organismo e invadir el hueso por vía hematógena, o proceder de modo exógeno por traumatismos abiertos o por la infección de implantes quirúrgicos (34, 35). Las especies patógenas causantes más frecuentes en infecciones postquirúrgicas y de infecciones asociadas a dispositivos médicos son los estafilococos Gram positivos oportunistas ( $\approx 75\%$  de los casos), en particular *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) (31).

A esta complejidad en su mecanismo de producción, habría que añadirle el hecho de que el tejido óseo infectado suele estar escasamente vascularizado, por lo que conseguir una concentración antibiótica *in situ* con eficacia terapéutica y mantenida en el tiempo tras su administración parenteral sistémica es todo un reto. Hoy día, las estrategias desarrolladas para su tratamiento implican el uso de antibióticos por vía sistémica de forma prolongada, generalmente después de llevar a cabo el desbridamiento quirúrgico del tejido afectado y el relleno del espacio muerto resultante (36). Esta situación puede conducir u ocasionar efectos tóxicos sistémicos

(hígado, riñón, oído, etc.) no deseados y al mismo tiempo provocar la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos. Además, debemos tener presente que numerosas especies bacterianas relacionadas con las infecciones óseas son capaces de sintetizar *biofilms* que actúan como mecanismo de defensa frente a la acción de los antibióticos, limitando aún más la eficacia de los tratamientos antibióticos convencionales.

De un modo tradicional, el tratamiento de la osteomielitis implica la resección completa del hueso infectado, el relleno del espacio muerto y la administración sistémica de antibióticos durante varias semanas (36, 37). Si bien, en el caso de infecciones relacionadas con implantes de cualquier tipo (clavos, placas, prótesis articulares, etc.), el tratamiento requiere, en primer lugar, la extracción del implante seguido de una terapia antibiótica local y sistémica prolongada (36) (**Figura 10**). En cuanto a la administración sistémica de antibióticos, esta debe ser perdurable y deben emplearse grandes dosis debido a que la presencia de la placa bacteriana puede impedir la difusión del antibiótico desde el torrente sanguíneo hasta el lugar de la infección, por lo que en ocasiones la provisión o presencia local del antibiótico puede ser insuficiente para eliminar las bacterias (38, 39).

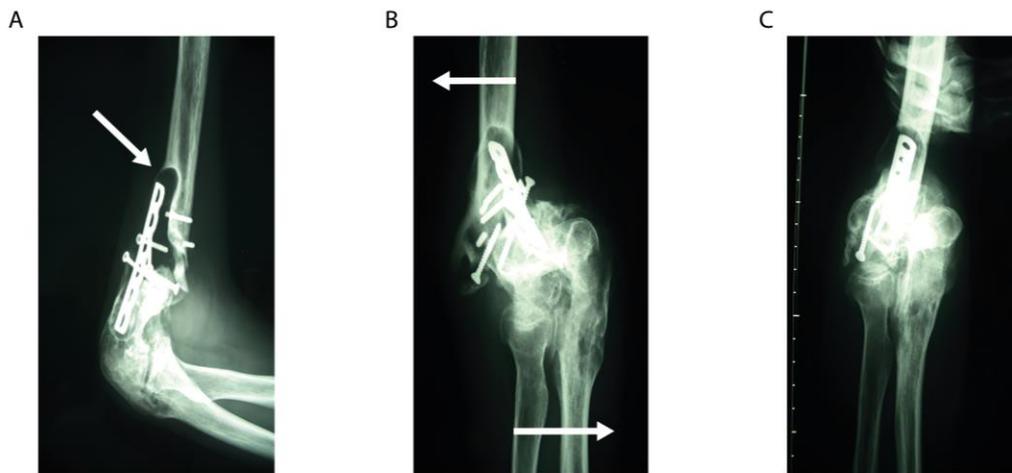


Figura 10. Imágenes clínicas radiográficas representativas de una infección ósea crónica secundaria a la implantación de placas de osteosíntesis utilizadas para contención de una fractura de codo. (a) Obsérvese la pérdida de tejido óseo (flecha) en las inmediaciones de la placa, (b, c) Movilidad anómala (flechas) en el foco de fractura como consecuencia de la pérdida ósea. [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

Uno de los primeros métodos aplicados en clínica y considerado como el estándar durante décadas para el tratamiento de infecciones óseas, fue el uso de bolas de cemento óseo polimetilmetacrilato (PMMA) cargadas con antibióticos, generalmente gentamicina, en el foco de infección. No obstante, este procedimiento no está exento de algunos inconvenientes, como la rápida difusividad térmica, la no biodegradabilidad del polímero, y la mala cinética de liberación del fármaco, hechos que pueden afectar a su eficacia terapéutica (40).

Para solventar estos inconvenientes, se han desarrollado diversos sistemas de administración local de antibióticos con la intención de establecer un enfoque terapéutico más eficiente (38). Asimismo, los nuevos sistemas de administración de fármacos deben ser biocompatibles y biodegradables y también disponer de una eficiencia en cuanto a la carga antibiótica deseada y una tasa de liberación adecuada tanto en su concentración como en tiempo de liberación, con la intención de llevar a cabo una lucha satisfactoria contra la infección ósea (41). Estos pueden conseguir niveles locales elevados de antibióticos superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) o a la concentración mínima de erradicación de biopelículas (CMEB) de los patógenos causantes de las infecciones óseas.

### 1.2.5. Injertos óseos

Tradicionalmente y hasta el día de hoy, las lesiones óseas causadas por traumatismos, enfermedades, infecciones, tumores o procedimientos quirúrgicos, que suelen llevar consigo una pérdida sustancial de tejido óseo, se tratan mediante cirugía reconstructiva por medio de injertos óseos (42). Estos pueden ser de varios tipos según su origen (autólogos, alogénicos y xenogénicos), sus características estructurales (corticales, esponjosos, cortico-esponjosos), y la forma de procesado y conservación (congelados, liofilizados, etc.). Los **injertos autólogos** (o autoinjertos) son injertos óseos que provienen del propio paciente. Generalmente, se toma un fragmento de hueso de una zona que no cause excesiva morbilidad al paciente, como puede ser la cresta ilíaca, el fémur o la tibia, para ser posteriormente trasplantado al lugar del defecto óseo. Estos injertos tienen la ventaja de ser altamente osteogénicos, biocompatibles, y por tanto no presentan riesgo de rechazo inmunológico. Sin embargo, su uso implica una cirugía adicional para obtener el injerto, lo que aumenta el tiempo de recuperación del individuo y el riesgo de complicaciones

locales. Los **injertos alogénicos** (o aloinjertos) provienen de un donante de la misma especie, pudiendo ser adquiridos en bancos de huesos donde se almacena tejido óseo procesado y esterilizado de donantes fallecidos. Estos poseen la ventaja de no requerir una cirugía adicional para obtener el injerto, sin embargo, existe un riesgo de transmisión de enfermedades y una mayor posibilidad de respuesta inmunológica. Por último, los **injertos xenogénicos** (o xenoinjertos) son injertos que provienen de una especie distinta a la del paciente, siendo generalmente de origen bovino o porcino. Estos injertos son los que se utilizan con menos frecuencia, ya que deben ser procesados extensamente para eliminar las proteínas inmunogénicas y reducir el riesgo de rechazo, por lo que suelen estar reservados para casos específicos. Asimismo, cabe destacar la existencia de los **isoinjertos**, que se realizan entre dos individuos genéticamente idénticos (gemelos homocigóticos), aunque este tipo de injertos es más frecuente en trasplantes de órganos (**Figura 11**).

Entre los tipos de injerto anteriormente descritos, el injerto de hueso autólogo (**autoinjerto**) es ampliamente reconocido como el más efectivo, siendo considerado como el “*gold standard*” por los cirujanos para el tratamiento de lesiones óseas (43, 44). Esto se debe a que cumple con los tres elementos fundamentales que debe tener un injerto para que se produzca la regeneración de hueso: ser osteogénico, osteoconductor, y osteoinductor.

Para que un injerto óseo sea **osteogénico**, debe contener células madre mesenquimales, osteoblastos y osteocitos viables que contribuyan a la formación de hueso nuevo (44). En este sentido, los injertos óseos autólogos poseen todos los elementos celulares, factores de crecimiento (FCs) y las estructuras de andamiaje necesarios para la neoformación de hueso. La **osteconductión** hace referencia a la capacidad del material de proporcionar un entorno con una porosidad y una arquitectura adecuadas para asegurar la adhesión y la proliferación celular. Para ello, el material debe tener una porosidad abierta (*open porosity*) e interconectada, asemejándose al máximo a la estructura del hueso esponjoso natural (45). El concepto de **osteoinducción** fue descrito por primera vez en el año 1965 por Urist tras el descubrimiento de las proteínas óseas morfogenéticas (BMPs, *Bone Morphogenetic Proteins*) (46). Un material osteoinductor debe ser capaz de inducir el proceso de reclutamiento, proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales del huésped en condroblastos y osteoblastos, acelerando así la regeneración del

hueso. Numerosas investigaciones han identificado las BMPs (concretamente la BMP-2, -4, -6, -7, -9 y -14), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como factores de crecimiento comunes implicados en el proceso de neoformación de hueso (44, 47).

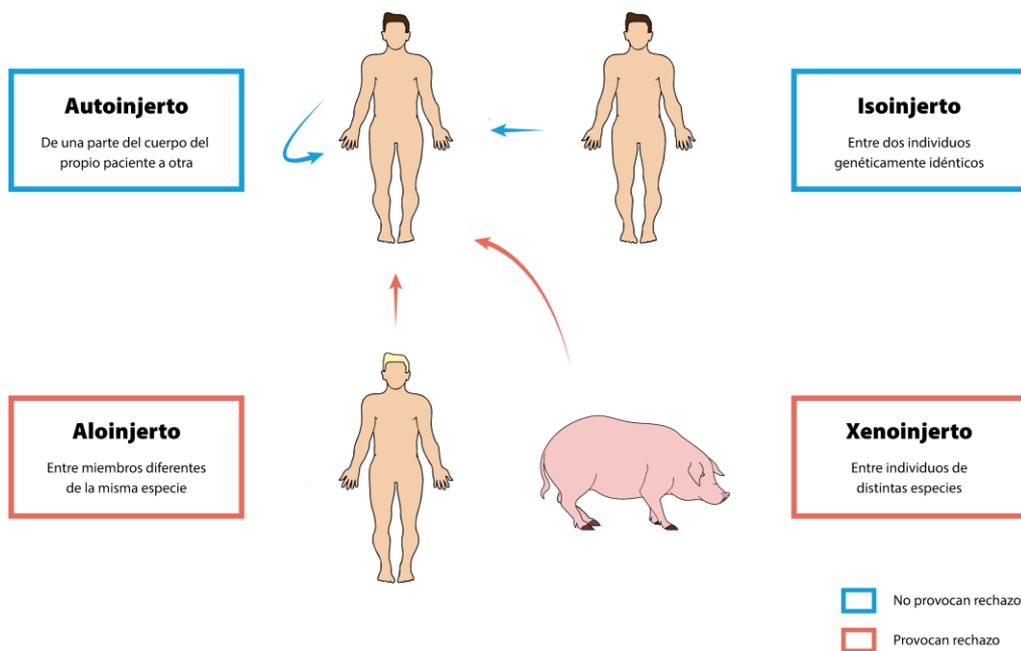


Figura 11. Principales tipos de injerto utilizados en clínica para tratar defectos óseos. [Elaboración propia]

En el área de la regeneración ósea, numerosos estudios se han enfocado en determinar las características ideales que debe poseer un biomaterial para ser utilizado como sustituto óseo. Según diversos autores, un scaffold 3D destinado al tratamiento de un defecto óseo debe cumplir los siguientes criterios: (i) ser biocompatible, es decir, no provocar una reacción inmunológica o inflamatoria adversa en el cuerpo del receptor, (ii) proporcionar un soporte estructural adecuado que imite la naturaleza del tejido a reparar, con el fin de proteger la zona de implantación de las cargas mecánicas a las que se ve sometido, (iii) ser capaz de prevenir la invasión por parte del tejido fibroso, (iv) poseer osteoconductividad para promover el crecimiento del tejido óseo, y (v) tener una porosidad y arquitectura que permitan una

buena vascularización y un flujo de células, nutrientes, y factores de crecimiento hacia las zonas internas del scaffold (48, 49). La fabricación de estructuras tridimensionales que cumplan todos estos requisitos requerirá de la aplicación de la Ingeniería de Tejidos, una rama relativamente nueva que tiene como objetivo la fabricación de órganos y tejidos “vivos” que sean capaces de sustituir tejidos dañados.

### 1.3. INGENIERÍA DE TEJIDOS

La **Ingeniería de Tejidos** es una disciplina emergente cuyo principal objetivo es restaurar, mantener, mejorar o reemplazar la función de órganos y tejidos biológicos gracias al uso combinado de biomateriales, células y moléculas bioactivas. Este término fue definido por primera vez en el año 1987 por la *National Science Foundation* (NSC), que discutió de forma crítica los objetivos futuros de la investigación en el campo de la bioingeniería y sus consecuencias. Unos años más tarde, Robert Langer y Joseph Vacanti – considerados como los padres de la Ingeniería de Tejidos – publicaron el artículo *Tissue Engineering* (1993), donde la definieron como “un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan, o mejoren la función de los tejidos” (50).

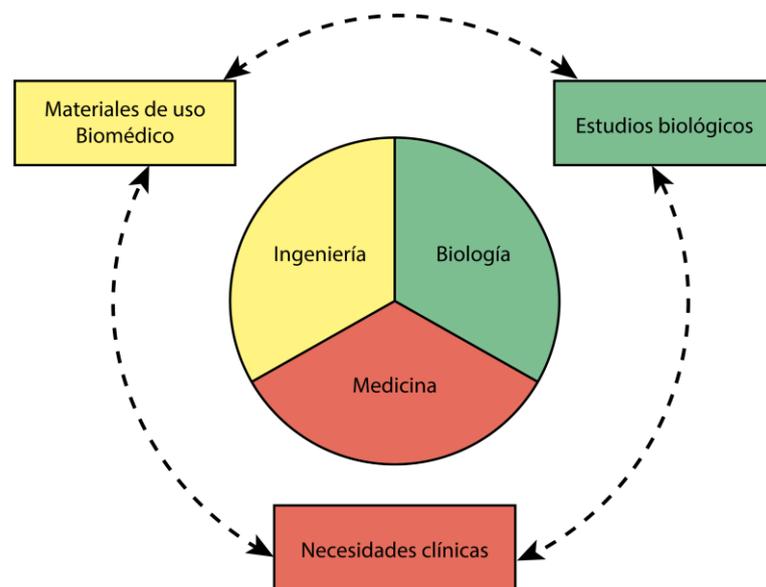


Figura 12. Ingeniería de Tejidos: un campo multidisciplinar estrechamente coordinado. [Meseguer-Olmo, 2019]

En la actualidad, la Ingeniería de Tejidos es considerada como una de las tres grandes ramas de la Medicina Regenerativa junto con la Terapia Celular y la Terapia Génica, y tiene como principal objetivo la búsqueda de tratamientos y/o curas frente a enfermedades complejas. Su aplicación requiere de grupos de investigación profundamente multidisciplinares que cuenten con especialistas de diversas ramas científicas – como la Ingeniería, la Biología, y la Medicina – que colaboren en el diseño, el desarrollo y la validación de los biomateriales (**Figura 12**).

### 1.3.1. Triada de la Ingeniería de Tejidos

Para reparar o regenerar tejidos biológicos sin necesidad de realizar injertos de la naturaleza que sea, se necesitan tres elementos fundamentales que se recogen en la **Triada de la Ingeniería de Tejidos** (51) (**Figura 13**).

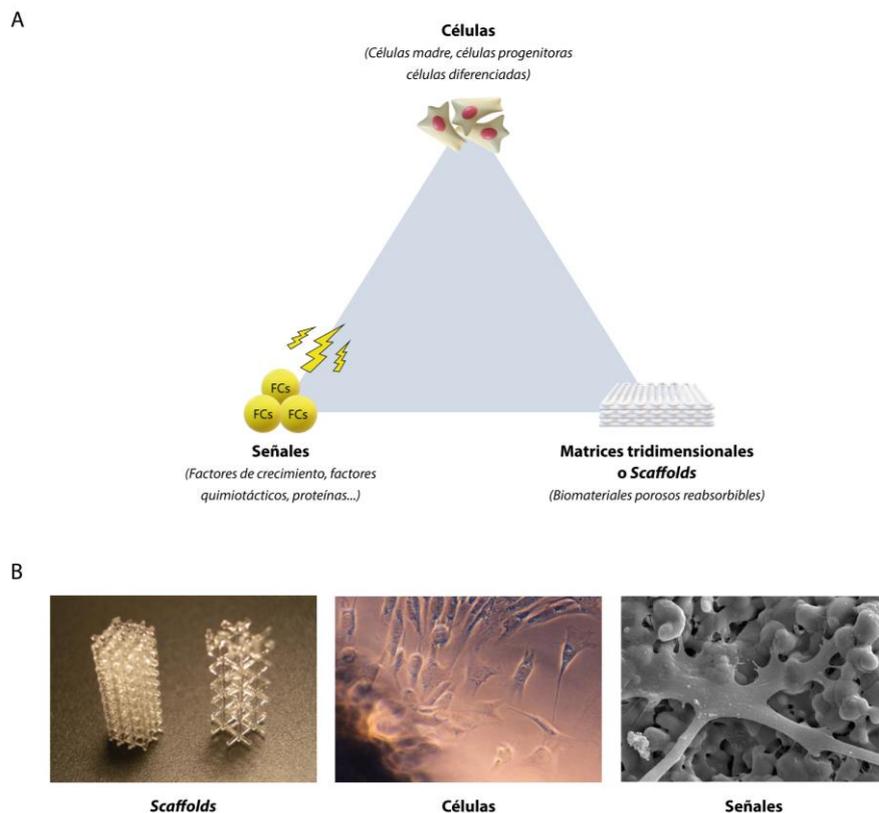


Figura 13. Componentes básicos de la Triada de la Ingeniería Tisular. (a) Esquema representativo, (b) Imágenes reales de los tres elementos que la conforman. [Meseguer-Olmo, 2020]

En primer lugar, necesitamos un material poroso reabsorbible – conocido comúnmente como matriz tridimensional o *scaffold* – que sirva como soporte para guiar la neoformación del tejido. En segundo lugar, y como elemento más importante de la Triada, necesitamos células (diferenciadas o indiferenciadas) que serán las encargadas de fabricar el tejido a reparar. Por último, se necesitan una serie de factores de crecimiento (FCs) encargados de mandar señales a las células anteriormente mencionadas, para indicarles a qué tipo celular deben diferenciarse según la naturaleza del tejido a reparar, y que en el caso del tejido óseo facilitaría su diferenciación a células de estirpe osteoblástica.

#### 1.3.1.1. *Matrices tridimensionales o scaffolds*

Las características fisicoquímicas y estructurales de las matrices tridimensionales (o scaffolds) utilizadas en Ingeniería de Tejidos, pueden afectar significativamente a la respuesta celular, por lo que deben ser diseñadas para soportar la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular (52, 53). Por ello, la elección del biomaterial y del método de fabricación (impresión 3D, electrohilado, etc.) por parte del investigador, son dos puntos clave en esta disciplina, y van a depender siempre de la naturaleza del tejido a reparar.

En el campo de la reparación ósea, la búsqueda de un material “ideal” que imite al máximo a la matriz extracelular del hueso ha llevado consigo a toda una revolución en el campo de los biomateriales en los últimos 50 años. Esta evolución puede identificarse a lo largo de tres generaciones, que dependen principalmente del tipo de respuesta (biocompatibilidad) del material una vez implantado (54). En la primera generación – allá por la década de los 60-70 –, la función principal de los materiales utilizados era sustituir el tejido dañado. Para ello, se utilizaban materiales biocompatibles que tuvieran unas propiedades físicas semejantes a las del tejido huésped. Esto dio lugar a los primeros diseños de prótesis articulares, que se fabricaban principalmente con metales y eran totalmente inertes (no interactuaban con el lecho receptor). En la segunda generación – años 80 –, los biomateriales utilizados estaban centrados en la reparación tisular. En esta fase aparecen los materiales cerámicos, que se utilizan tanto para el relleno de defectos óseos como para el recubrimiento de implantes, y que tienen la particularidad de ser bioactivos, biodegradables, y reabsorbibles (55). Por último, en la tercera generación – en la que nos

encontramos actualmente –, se buscan biomateriales porosos y reabsorbibles de diversa naturaleza que imiten a la matriz extracelular, y que sean capaces de participar en el proceso de reparación o regeneración de un tejido, constituyendo un elemento esencial en el campo de la Ingeniería de Tejidos (56).

Asimismo, la fabricación de un sustituto óseo capaz de promover la regeneración tisular implica la utilización de materiales biodegradables que puedan reabsorberse de forma proporcional a la neoformación de hueso, en un proceso que se conoce como *creeping substitution* o sustitución progresiva (57) (**Figura 14**).

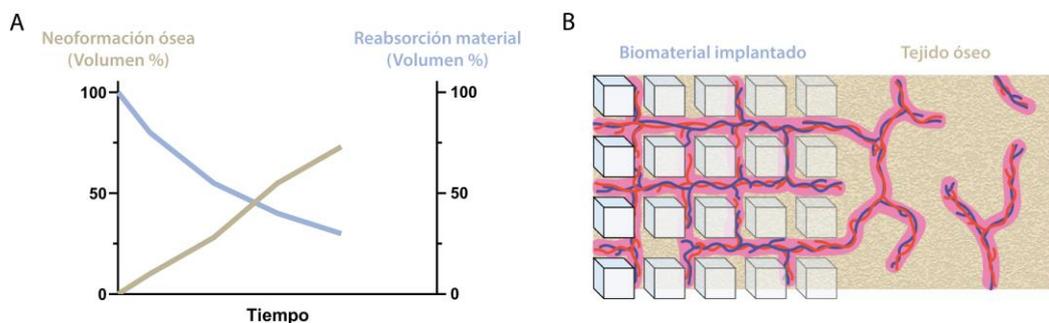


Figura 14. Representación esquemática del proceso de sustitución progresiva (*creeping substitution*). (a) Gráfica representativa del volumen de neoformación de hueso (volumen %) VS la reabsorción del material implantado (volumen %). (b) Esquema representativo del proceso de sustitución progresiva. Obsérvese cómo tanto los vasos sanguíneos como el tejido óseo van colonizando los poros del biomaterial y sustituyéndolo conforme este se va degradando. [Elaboración propia]

### 1.3.1.2. Células (diferenciadas o indiferenciadas)

En segundo lugar, se requieren células, que podrán utilizarse bajo dos formas. Por un lado, podemos utilizar **células diferenciadas** – como son los osteoblastos – es decir, células maduras que ya no pueden convertirse en otro tipo celular y cuya principal función es la de fabricar tejido óseo. Por otro lado, podemos utilizar **células indiferenciadas** – como son las células madre mesenquimales (MSCs, del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*) – que son capaces de autorrenovarse y poseen una característica exclusiva que se conoce como multipotencialidad, que les permite diferenciarse a cualquier tipo celular que forme parte de los tejidos mesenquimales (hueso, cartílago, grasa, músculo, tendón, etc.) (58), constituyendo una herramienta potencial para regenerar tejidos (**Figura 15**).

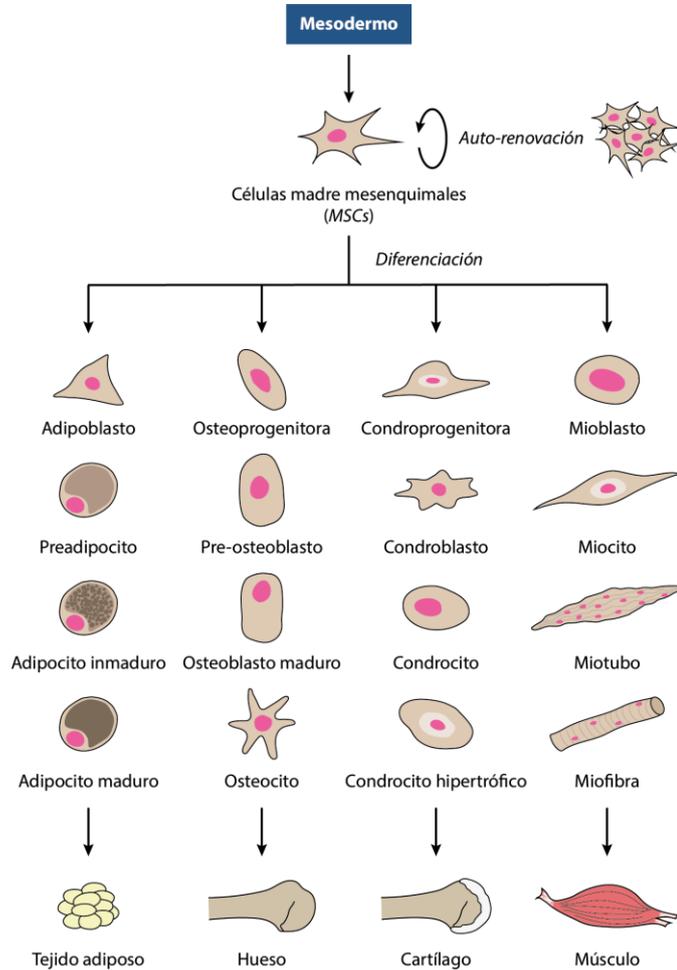


Figura 15. Capacidad de autorrenovación y diferenciación de las MSCs. [Elaboración propia]

Las MSCs presentan una amplia distribución *in vivo*, de modo que pueden aislarse del periostio (59), pericondrio (60), del tejido conectivo de la dermis y del músculo esquelético (61), de la grasa (62), del cordón umbilical y la sangre periférica (63), de la membrana amniótica (64) e incluso del propio cartílago articular (65). De todas ellas, la médula ósea es la fuente tisular más utilizada (66). Una vez aisladas, las MSCs pueden cultivarse *in vitro* hasta obtener cantidades apropiadas para aplicaciones clínicas y ser implantadas en el mismo paciente (67).

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció un conjunto de criterios para definir y caracterizar las MSCs, de forma que, para que una célula sea considerada como célula madre mesenquimal, debe cumplir con tres

criterios fundamentales: (1) Deben ser adherentes al plástico en condiciones normales de cultivo; (2) Deben tener capacidad de diferenciación en los tres linajes básicos: hueso, cartílago y tejido graso, y (3) Sus marcadores fenotípicos de membrana deben ser positivos para el CD105, CD73 y CD90; y negativos para el CD45, el CD34, el CD11b, el CD14, el CD79a y HLA-DR. Sin embargo, estos criterios se basan en la caracterización de las células cultivadas *in vitro* y no se aplican al fenotipo nativo *in vivo* (68).

#### 1.3.1.3. Factores de crecimiento o quimiotácticos

Los factores de crecimiento (FCs) o factores quimiotácticos son polipéptidos que actúan como moduladores de distintas funciones celulares, como pueden ser la migración, la proliferación y la diferenciación celular. Estas moléculas son liberadas en el entorno celular por las propias células óseas (o en tejidos extra-óseos), y se unen a receptores específicos de la superficie de las células activando vías de señalización intracelular que resultan esenciales en la regulación del proceso de formación y reabsorción de hueso. Algunos de los principales FCs relacionados el proceso de remodelación ósea son: (i) los **factores de crecimiento insulínicos I y II** (IGF-I y II), que se hayan en gran concentración en la matriz osteoide y que son los encargados de incrementar el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno (69); (ii) los **factores de crecimiento transformantes  $\beta$**  (TGF- $\beta$ ), una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo que están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica; (iii) las **proteínas óseas morfogenéticas** (BMPs), que constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, y de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes linajes celulares (grasa, cartílago y hueso), (iv) el **factor de crecimiento de fibroblastos** (FGF), considerado como un anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos; (v) el **factor de crecimiento derivado de plaquetas** (PDGF), encargado por un lado, de estimular la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos (70), y por otro, de favorecer la reabsorción ósea, y (vi) el **factor de crecimiento endotelial vascular** (VEGF), que induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular (44, 47).

### 1.3.2. Procedimientos básicos en Ingeniería de Tejidos

Para crear un implante “vivo” y/o funcionalizado, pueden utilizarse dos enfoques básicos dependiendo del tejido diana que se quiera reparar (71) (**Figura 16**).

El primer enfoque (**Enfoque 1**) consiste en extraer células del propio paciente mediante biopsia de tejidos. Generalmente, el número de células obtenido por esta técnica es bastante bajo, por lo que las células obtenidas suelen subcultivarse y expandirse *in vitro* en el laboratorio con el fin de obtener un número mucho mayor. Una vez se obtiene la cantidad de células deseada, estas pueden sembrarse sobre los scaffolds tridimensionales (naturales o sintéticos) que hayamos fabricado, de forma que puedan adherirse y crecer sobre el biomaterial. Además, el scaffold podrá doparse con proteínas o factores de crecimiento (péptidos bioactivos exógenos), que aportarán las señales necesarias para que las células segreguen diversos componentes de la matriz extracelular. Esto dará lugar a fabricación de un tejido “vivo” que podrá ser implantarlo en el lugar del defecto del paciente, sirviendo como tejido de sustitución.

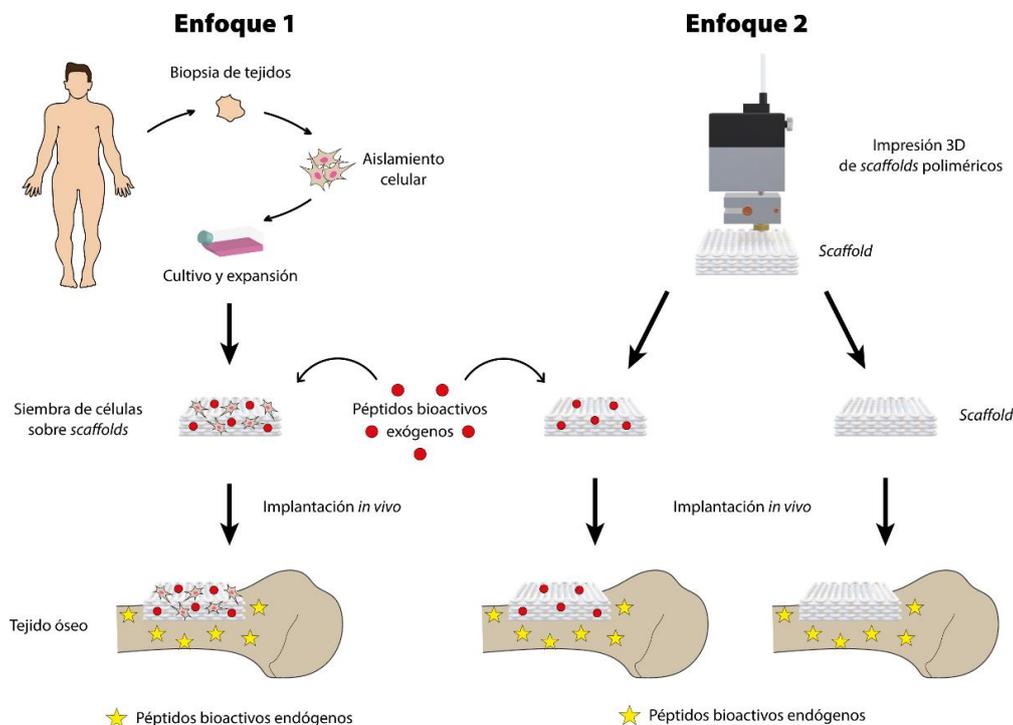


Figura 16. Procedimientos básicos en Ingeniería de Tejidos. [López González y Meseguer Olmo, 2020]

En el segundo enfoque (**Enfoque 2**), el scaffold puede o no haber sido funcionalizado con los péptidos bioactivos mencionados anteriormente, y se implanta directamente en el defecto del paciente. En este caso, el scaffold guiará la neoformación de hueso *in situ*, y podrá ayudarse tanto de los FCs endógenos (del propio tejido), como de los exógenos (en el caso de que los hayamos añadido).

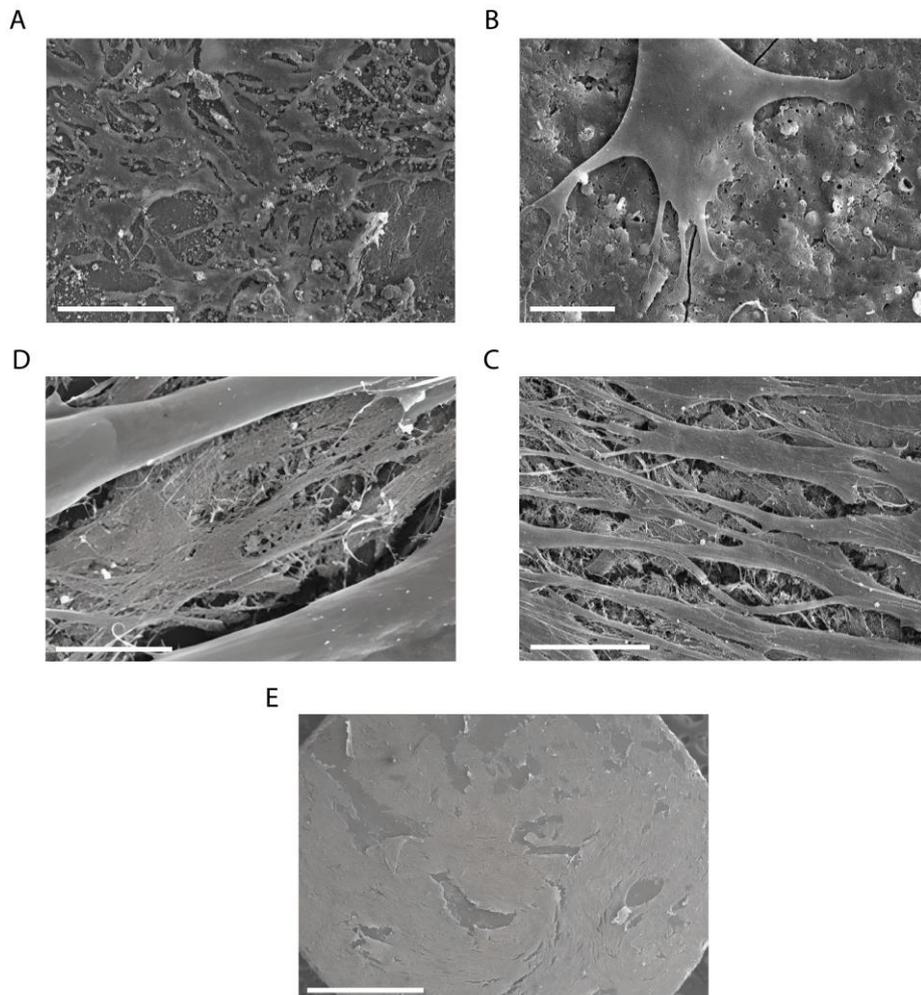


Figura 17. Imágenes representativas conseguidas mediante MEB de un modelo de ingeniería tisular. (a) Siembra celular sobre una matriz tridimensional o scaffold (barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ ); (b) Detalle de la adhesión celular sobre el scaffold (barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ ), (c) Fase de proliferación celular (barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ ), (d) Síntesis de matriz extracelular de morfología fibrilar observada en los espacios intercelulares (barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ), (e) Aspecto general de la superficie del scaffold completamente recubierto por las células (barra de escala: 2 mm). [Imágenes cedidas por Luis Meseguer-Olmo, MD]

Por otro lado, los procedimientos anteriormente mencionados pueden ser clasificados según el lugar donde vaya a ocurrir la regeneración del tejido, destacando: (i) la **regeneración *in vitro***, en la cual el nuevo tejido se diseña y desarrolla fuera del cuerpo con la finalidad de ser implantado para reparar o reemplazar tejidos dañados, (ii) la **regeneración *in vivo***, en la cual el nuevo tejido se genera en el organismo por el aporte celular del tejido huésped y por la acción de factores de crecimiento o genes endógenos, o simplemente por la implantación de un scaffold capaz de guiar la neoformación tisular, y (iii) la **regeneración parcial**, en la cual solo una parte del tejido se regenera *in vitro* o *in vivo* para sustituir la función de los tejidos dañados.

El desarrollo cada vez mayor alcanzado por la Ingeniería de Tejidos pone de manifiesto la potencialidad de esta estrategia, consistente en desarrollar nuevas terapias que aprovechen la acción combinada de biomateriales, células, y moléculas bioactivas (**Figura 17**). En este contexto, la identificación de materiales adecuados que satisfagan las diversas funciones que debe cumplir el scaffold tisular, se ha convertido en uno de los puntos fundamentales para el desarrollo de este nuevo campo.

#### 1.4. IMPRESIÓN Y BIOIMPRESIÓN 3D

##### 1.4.1. Introducción a la Impresión 3D

En la última década, la Impresión 3D se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para desarrollar biomateriales con aplicación en Medicina Regenerativa. Esta tecnología, también conocida como fabricación aditiva, tiene como objetivo la fabricación de objetos físicos tridimensionales a partir de modelos digitalizados. A diferencia de los métodos tradicionales de fabricación que suelen implicar la sustracción de material a partir de un bloque (fabricación sustractiva), la impresión 3D construye objetos físicos mediante la adición (o superposición) de capas 2-dimensionales hasta la obtención de un objeto 3D (**Figura 18**). Esto le confiere una gran versatilidad, dado que permite controlar al usuario tanto la estructura interna como la estructura externa del objeto fabricado.

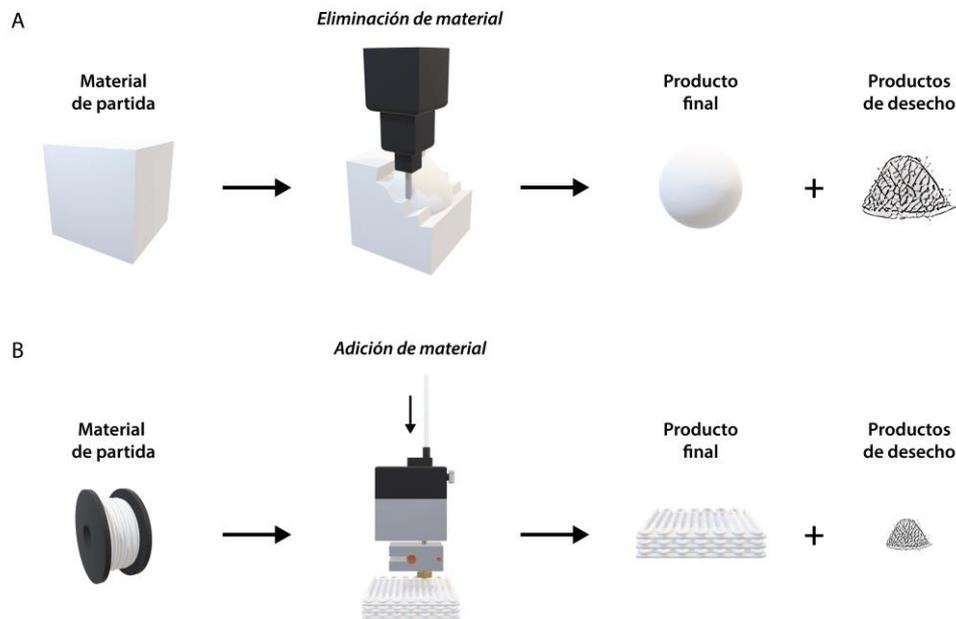


Figura 18. Esquema representativo de las tecnologías de fabricación sustractiva y aditiva. a) Ejemplo de fabricación sustractiva. A partir de un bloque cúbico, se obtiene una esfera 3D eliminando parte del material de partida. b) Ejemplo de fabricación aditiva. A partir de una bobina de filamento, se obtiene un objeto 3D mediante la adición (o acumulación) de material. [Elaboración propia]

A continuación, se detallan los principales tipos de impresión 3D existentes en el mercado, haciendo especial hincapié en la tecnología de Modelado por Deposición Fundida (FDM), utilizada para fabricar los dos biomateriales desarrollados y validados en esta Tesis Doctoral.

## 1.4.2. Tipos de Impresión 3D

### 1.4.2.1. Modelado por deposición fundida (FDM)

El Modelado por Deposición Fundida (FDM), conocido en inglés como “*Fused Deposition Modeling*” es una de las tecnologías más utilizadas en impresión 3D y constituye la base del proceso de fabricación de nuestros materiales. Un sistema FDM utiliza una función aditiva, depositando material fundido capa a capa sobre una cama de impresión con el fin de construir un objeto en tres dimensiones. Generalmente, un filamento termoplástico (que se almacena en rollos o bobinas) se

utiliza para alimentar un módulo extrusor, que empuja el filamento hasta una boquilla o *nozzle* que se encuentra por encima de la temperatura de fusión del material. El módulo extrusor puede desplazarse en un sistema de coordenadas 3D, en el que los desplazamientos horizontales (ejes X e Y) y verticales (eje Z) permitirán depositar el material capa a capa en puntos concretos del espacio, construyendo así un objeto en dimensiones (**Figura 19**).

La impresión FDM funciona con varios termoplásticos estándar, como el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL) y sus diversas mezclas. Es una técnica ampliamente utilizada en la industria para el prototipado, la fabricación de herramientas, modelos educativos, y en algunos casos, la producción final de piezas. En el mundo de la investigación, suelen utilizarse principalmente el PLA y la PCL para la fabricación de scaffolds, debido a su biocompatibilidad, y a que la tecnología FDM permite controlar tanto la estructura externa como la estructura interna de las matrices tridimensionales producidas (72). Sin embargo, solo suele utilizarse para la fabricación de scaffolds que sirvan como soporte (mecánico) para la regeneración de tejidos, ya que las altas temperaturas utilizadas (160-250 °C) durante el proceso de impresión 3D, dificultan la incorporación de moléculas bioactivas (73).

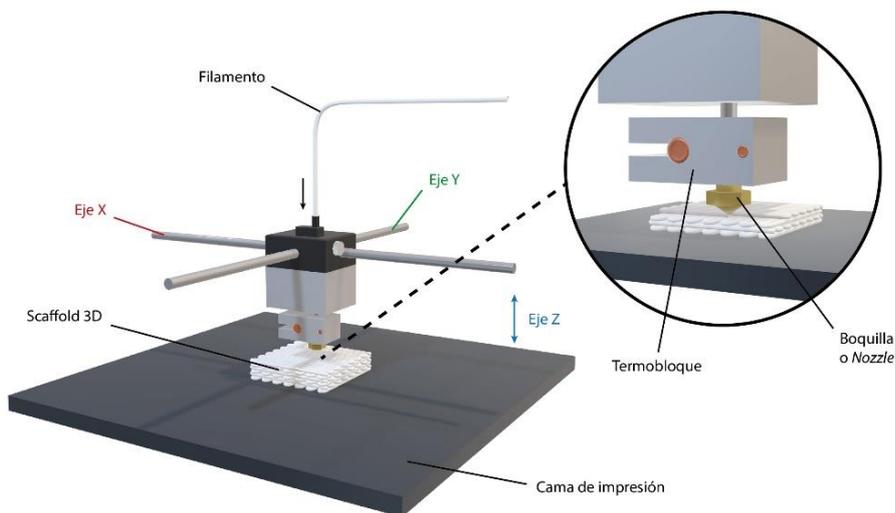


Figura 19. Modelado por Deposición Fundida (FDM). [Elaboración propia]

#### 1.4.2.2. Estereolitografía (SLA)

La estereolitografía (SLA) fue inventada en los años 80, siendo la tecnología de impresión 3D más antigua y utilizada. Esta tecnología utiliza la polimerización inducida por luz ultravioleta (UV) para convertir resinas líquidas fotopolimerizables en sólidos, construyendo objetos tridimensionales capa por capa. Inicialmente, la resina líquida se carga en un tanque y la plataforma de impresión se posiciona en la interfase resina-aire. En este punto, el láser UV interactúa de forma selectiva con la resina para polimerizarla, y una vez que se termina la capa, la cama de impresión se eleva unas micras gracias a la acción de un elevador (eje Z) para fotopolimerizar la siguiente capa (**Figura 20**).

Las piezas realizadas mediante SLA ofrecen el mayor grado de resolución y precisión, los detalles más nítidos y el acabado de la superficie más liso de todas las tecnologías de impresión 3D (hasta 70  $\mu\text{m}$ ), pero el principal beneficio de la SLA se encuentra en su versatilidad. La impresión por SLA es una excelente opción para prototipos con un alto nivel de detalle que requieren una escasa tolerancia y superficies lisas, como moldes, patrones y piezas funcionales. Es una técnica que se utiliza en diversas industrias, desde la ingeniería y el diseño de productos a la fabricación, la odontología, la joyería, la elaboración de maquetas y la educación.

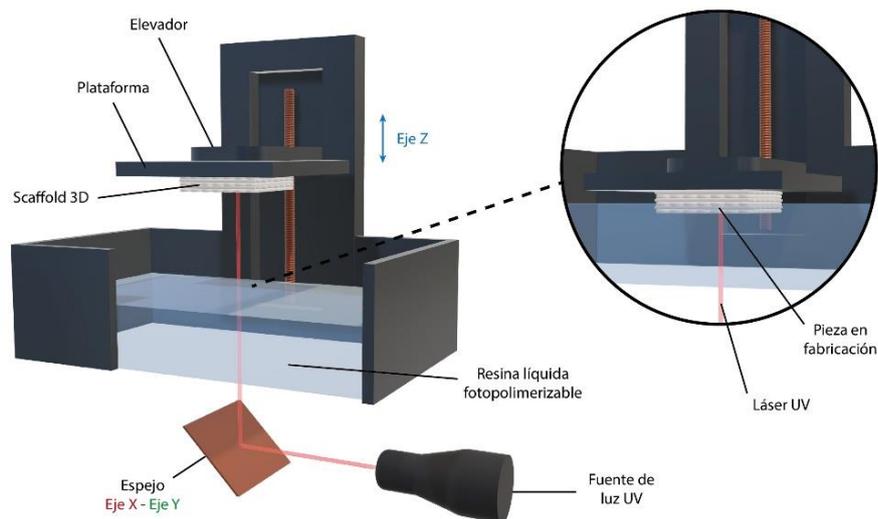


Figura 20. Estereolitografía (SLA). [Elaboración propia]

### 1.4.2.3. Sinterizado Selectivo por Láser (SLS)

El sinterizado selectivo por láser (del inglés, *Selective Laser Sintering*, o SLS) es otra técnica de impresión por adición en la cual un tanque se rellena de polvo que se ha calentado a una temperatura ligeramente inferior a su punto de fusión. Seguidamente, se deposita una capa de polvo de unas décimas de milímetro que es nivelada por un rodillo de nivelación, y un láser de alta potencia (por ejemplo, de CO<sub>2</sub>) sinteriza el polvo en los puntos seleccionados (causando que las partículas se fusionen y solidifiquen) (**Figura 21**). El polvo sin sinterizar sirve como soporte para la pieza durante la impresión y elimina la necesidad de agregar expresamente estructuras de soporte, lo que hace que la impresión por SLS sea ideal para geometrías complejas, como relieves interiores, socavados, paredes delgadas y negativos de piezas. Los materiales de uso común para SLS son el polipropileno (PP), elastómeros termoplásticos (TPE), y las poliamidas (PA), entre las cuales destaca el nylon, un popular termoplástico para ingeniería con excelentes propiedades mecánicas, aunque también existen sistemas SLS para metales y cerámicas. El sinterizado selectivo por láser es ampliamente utilizado en la fabricación de prototipos, piezas finales y aplicaciones donde se requiere una mayor resistencia mecánica y flexibilidad en el diseño.

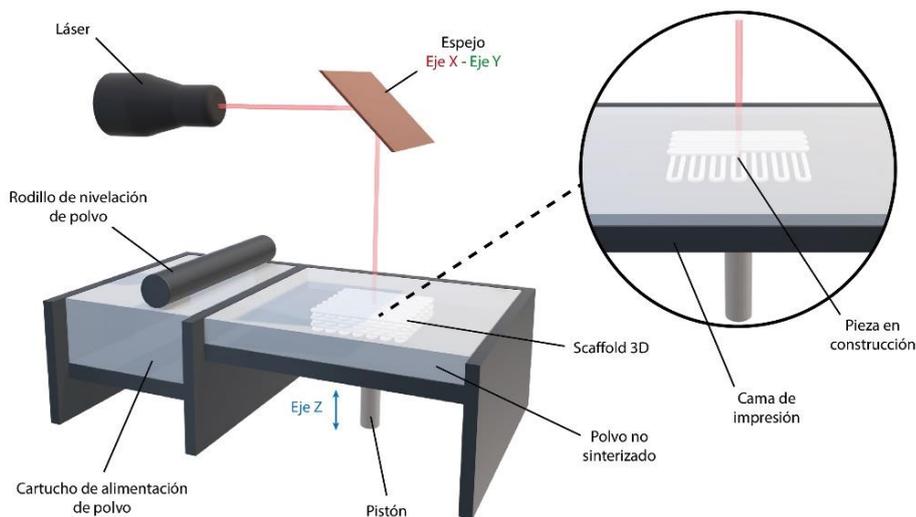


Figura 21. Sinterizado Selectivo por Láser (SLS). [Elaboración propia]

A continuación, se muestra una tabla a modo de resumen con las principales características de las tecnologías anteriormente descritas (**Tabla 1**):

*Tabla 1. Principales características, ventajas, y desventajas de las tecnologías de impresión 3D más utilizadas en la actualidad*

	FDM	SLA	SLS
<b>Resolución</b>	250-700 $\mu\text{m}$	70-250 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$
<b>Ventajas</b>	Buenas propiedades mecánicas, bajo coste	Buenas propiedades mecánicas, alta resolución y precisión, facilidad para eliminar los soportes	Buenas propiedades mecánicas, alta porosidad, alta definición, amplia gama de materiales disponibles, no necesita soportes
<b>Desventajas</b>	Alta temperatura durante el proceso, disponibilidad de materiales limitada debido a la necesidad de una fase fundida	Rango de biomateriales limitado debido a que requieren fotosensibilidad y biocompatibilidad, exposición del material al láser	Alta temperatura durante el proceso, resolución dependiente del diámetro del láser, porosidad no controlable
<b>Aplicaciones</b>	Hueso, cartílago, tejido adiposo	Corazón, Válvulas cardiacas	Hueso, Cartílago

#### 1.4.3. Tipos de Bioimpresión 3D

La Bioimpresión 3D es una tecnología relativamente nueva que ha surgido a partir de la necesidad de fabricar scaffolds biológicos capaces de transportar células y moléculas bioactivas. Esta tecnología podría describirse como un tipo de biofabricación aditiva con la capacidad de construir estructuras viables similares a órganos y tejidos (74). Generalmente, utiliza un dispositivo de impresión 3D controlado mediante software, que permite a la bioimpresora depositar células y biomateriales con gran precisión para crear estructuras biológicas anatómicamente similares al tejido que queremos reparar. Contrariamente a las impresoras 3D convencionales, los dispositivos descritos en los siguientes apartados tienen la capacidad de imprimir agregados celulares, células encapsuladas en hidrogeles, o fluidos viscosos

portadores de células – denominados “biotintas” –, así como polímeros sin células que proporcionen un soporte mecánico capaz de soportar cargas (75, 76). Hasta la fecha, no se ha logrado imprimir un órgano completo totalmente funcional, pero sigue siendo el principal objetivo de la Bioimpresión 3D a largo plazo (77).

#### 1.4.3.1. *Bioimpresión por extrusión*

La bioimpresión por extrusión se basa en la extrusión continua de una biotinta a través de una boquilla (*nozzle*) que puede ser una punta plástica o metálica. Es el método que más se asemeja a la tecnología FDM de impresión 3D, aunque en este caso la biotinta puede ser empujada por un sistema neumático, de pistón, o por un tornillo sin fin (**Figura 22**). Una vez extruida, la biotinta se deposita capa a capa sobre una cama de impresión hasta conformar el objeto 3D. Una vez completada (o mientras se lleva a cabo) la impresión, las estructuras bioimpresas a menudo requieren un proceso de reticulación (como la exposición a luz UV o a soluciones químicas) que permita solidificar o estabilizar la biotinta (o el hidrogel).

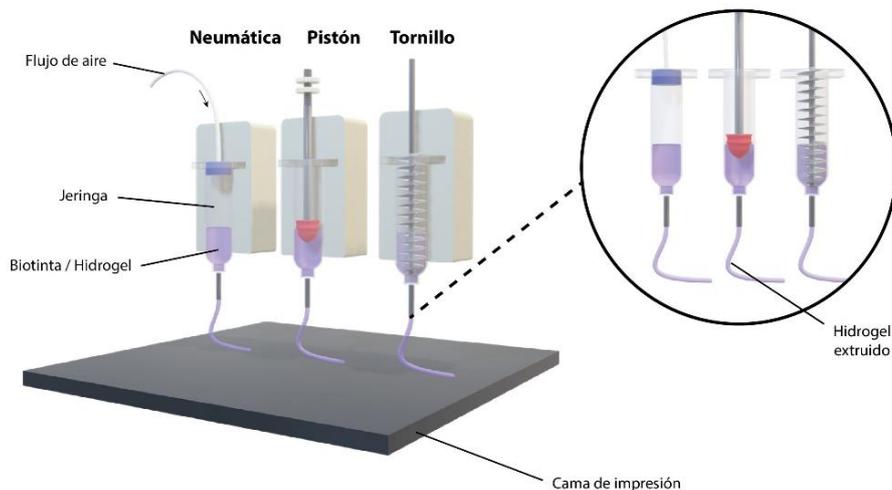


Figura 22. Bioimpresión por extrusión. [Elaboración propia]

#### 1.4.3.2. *Bioimpresión por inyección*

La bioimpresión por inyección es una tecnología que utiliza inyectores para depositar microgotas de la biotinta con alta precisión sobre una plataforma (o cama de impresión). Dentro de esta categoría, existen dos sistemas principales: (i) los de

inyección térmica, que trabajan con un sistema de calefacción (actuador térmico) que genera burbujas de aire y que al colapsar brindan la presión suficiente como para lograr expulsar las gotas de la biotinta, y (ii) los piezoeléctricos, que expulsan pequeñas gotas de la biotinta mediante el estímulo de una pequeña carga eléctrica (**Figura 23**).

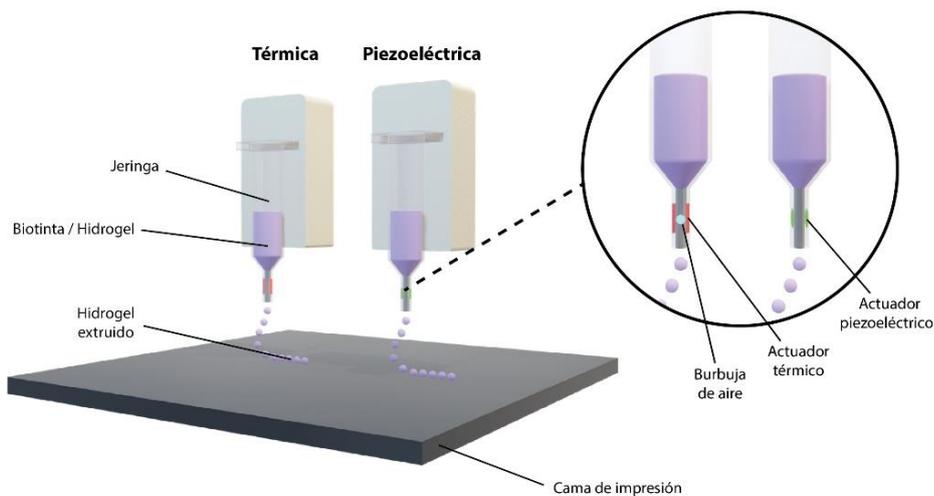


Figura 23. Bioimpresión por inyección. [Elaboración propia]

Esta tecnología ofrece una resolución muy elevada a bajo coste, pero no es compatible con biomateriales de alta viscosidad, y necesita de una etapa de reticulación para conseguir formar estructuras 3D. Además, los sistemas piezoeléctricos pueden ocasionar daños en la membrana celular si se utilizan de manera frecuente y a cargas demasiado elevadas.

#### 1.4.3.3. Bioimpresión asistida por láser

La bioimpresión asistida por láser, también conocida como LAB (*Laser-Assisted Bioprinting*), es una técnica avanzada de bioimpresión 3D que utiliza la energía de un láser para transferir células y otros biomateriales desde un sustrato donante (generalmente, la biotinta que contiene el material biológico) a un sustrato receptor. El punto en el cual incide el láser puede controlarse con alta precisión gracias a una lente de enfoque, y este incidirá sobre una capa donante (que contiene la biotinta) que a su vez está protegida por una capa absorbente de energía (**Figura 24**). Este proceso generará una burbuja por presión y la capa donante irá soltando gotas de

la biotinta en los puntos de interés, dando lugar a la formación de formas tridimensionales personalizadas. Esta técnica se está volviendo popular debido a su alta resolución y su capacidad para manejar células delicadas sin dañarlas ni contaminarlas, dado que es una técnica “sin contacto”.

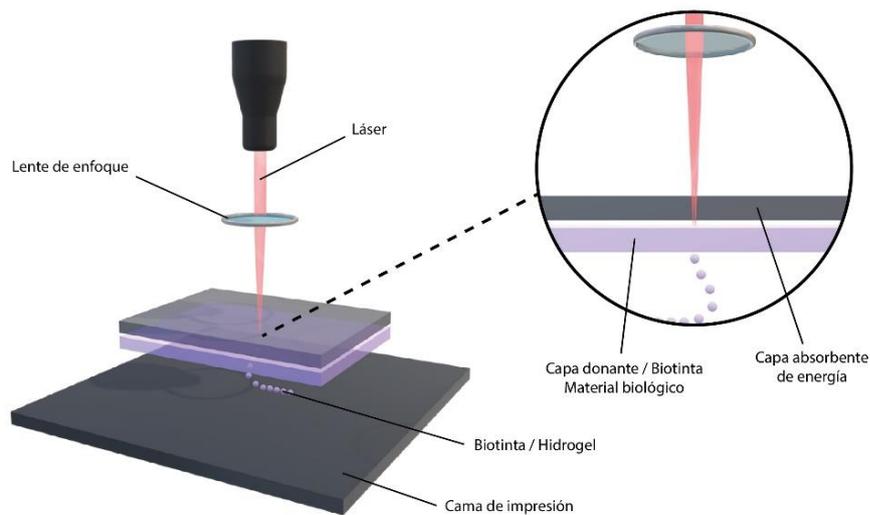


Figura 24. Bioimpresión Asistida por Láser. [Elaboración propia]

#### 1.4.3.4. Bioimpresión por estereolitografía

La bioimpresión por estereolitografía (*bio-SLA* o *SLA bioprinting*) es una técnica que emplea luz, a menudo en forma de un láser, para polimerizar y solidificar selectivamente una biotinta fotosensible capa por capa, construyendo así estructuras tridimensionales. Funciona de forma análoga a la estereolitografía 3D convencional, pero en este caso el tanque es rellenado con una biotinta en lugar de con una resina fotopolimerizable (Figura 25).

En esta tecnología, las biotintas/hidrogeles deben contener fotoiniciadores biocompatibles (como el LAP o el Irgacure) con el fin de poder reticular y formar estructuras 3D con propiedades físicas y químicas mejoradas. Cabe destacar que las zonas en las que no incide el láser quedan líquidas, dejando un exceso de volumen de biotinta no reticulada que puede quedar adherida a los scaffolds fabricados, por lo que esta tecnología a veces requiere de etapas intermedias de lavado con agua o con una solución de tampón fosfato salino (PBS) (78).

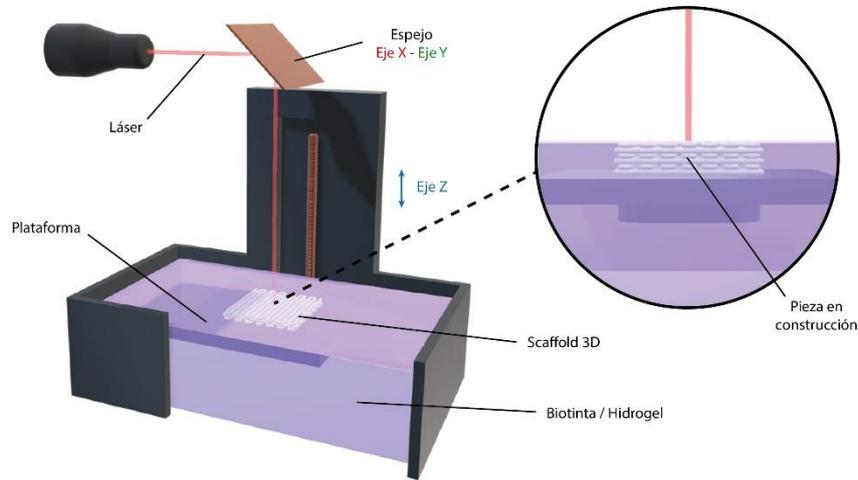


Figura 25. Bioimpresión por estereolitografía. [Elaboración propia]

### 1.5. DISEÑO E IMPRESIÓN 3D SCAFFOLDS PERSONALIZADOS

La fabricación de un scaffold 3D personalizado que se ajuste perfectamente a las características del defecto óseo de un paciente, implica la obtención previa de un modelo 3D digitalizado. Generalmente, para obtener estos modelos y poder imprimirlos, debemos seguir los siguientes pasos: (i) detectar la localización del defecto óseo, (ii) adquirir imágenes médicas de la zona de la lesión, que generalmente se basan en la adquisición de imágenes bidimensionales (2D), (iii) realizar la segmentación, es decir, convertir la información contenida en las imágenes 2D en un modelo 3D de alta calidad, (iv) exportar el archivo a STL o *Standard Triangle Language* (formato estándar legible por los programas de impresión 3D), y (v) realizar el “laminado” o *slicing*, generando un código G (.gcode) que contiene toda la información relativa a los parámetros de impresión (velocidad, temperatura, altura de capa, etc.) que deberá seguir la impresora para poder imprimir el objeto.

Una vez realizada la segmentación (paso *iii*), y siguiendo con el plan previamente establecido, podremos (a) imprimir el modelo escaneado que muestra el defecto del paciente en el caso de que pretendamos planificar una intervención quirúrgica; o bien, (b) diseñar, mediante el uso de un software de diseño asistido por computadora (CAD, *Computer Aided Design*), un implante personalizado que se ajuste a la realidad clínica, e imprimir el segmento que se utilizaría como implante para la reconstrucción del defecto óseo (**Figura 26**).

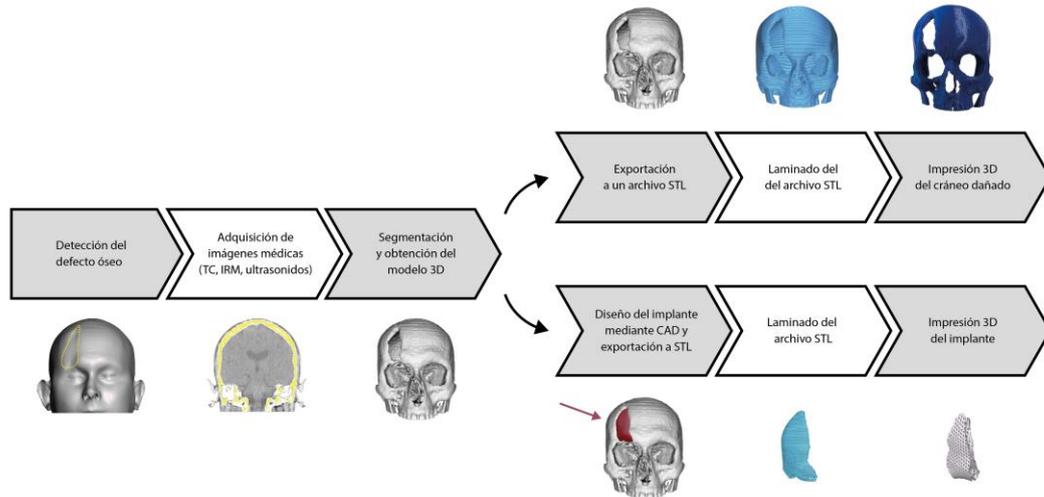


Figura 26. Etapas a seguir para la obtención de modelos 3D personalizados. [Elaboración propia]

En los siguientes apartados se proporciona una explicación más detallada de cómo funcionan los softwares de análisis de imagen, y cómo se realiza la segmentación y la impresión 3D de los modelos obtenidos.

### 1.5.1. Adquisición de imágenes médicas de un paciente

La adquisición de imágenes médicas se ha convertido en una herramienta fundamental en la práctica clínica. Las imágenes obtenidas por resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada (CT), mamografía digital, y ecografía 3D, proporcionan un medio eficaz para mapear de forma no invasiva la anatomía del sujeto, pudiendo utilizarse para planear intervenciones quirúrgicas, tomar decisiones en tiempo real durante una intervención, e incluso para prevenir y diagnosticar patologías con mayor precocidad (79, 80).

Estas imágenes son adquiridas en formato DICOM (del inglés, *Data Imaging and Communications On Medicine*), un estándar internacional de transmisión de datos e imágenes médicas entre hardware de uso médico (81). Este formato se diferencia de otros en que tiene la capacidad de agrupar, por un lado, datos e información sobre el paciente (ID del paciente, patología), y por otro, la toma de imágenes con sus respectivos datos (fecha y hora de la toma, calidad de la imagen, etc.), lo que hace que la imagen no pueda ser separada por error de su información.

Las principales modalidades de toma de imagen se basan en la adquisición de imágenes bidimensionales (2D) – denominadas “secciones” – en los tres planos que componen un sistema de coordenadas en 3D: (i) Corte axial (plano xy, movimiento en el eje Z), (ii) Corte sagital (plano xz, movimiento en el eje Y) y (iii) Corte coronal (plano yz, movimiento en el eje X) (**Figura 27**). En cada uno de los planos, la información queda almacenada mediante una escala de densidades tomográficas denominada escala de Unidades Hounsfield (UH). Esta escala asigna un valor numérico a dichas densidades que puede variar entre -1000UH (muy negro = aire) a +1000UH (muy blanco = metal), pasando por una escala de grises en la que los tejidos más densos se aproximarán al color blanco, y los menos densos al negro (82). Este valor dependerá principalmente de la naturaleza y densidad del tejido analizado, permitiendo diferenciar distintos tejidos en cada sección.

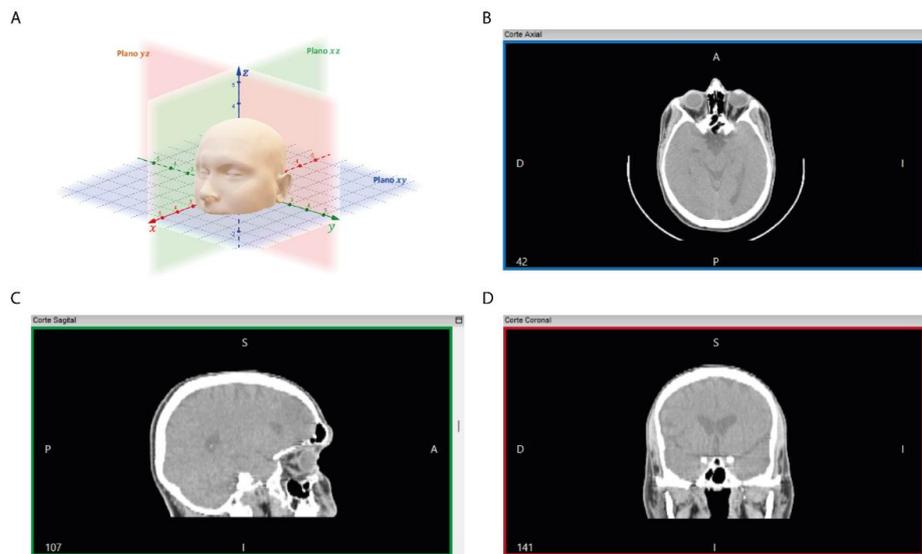
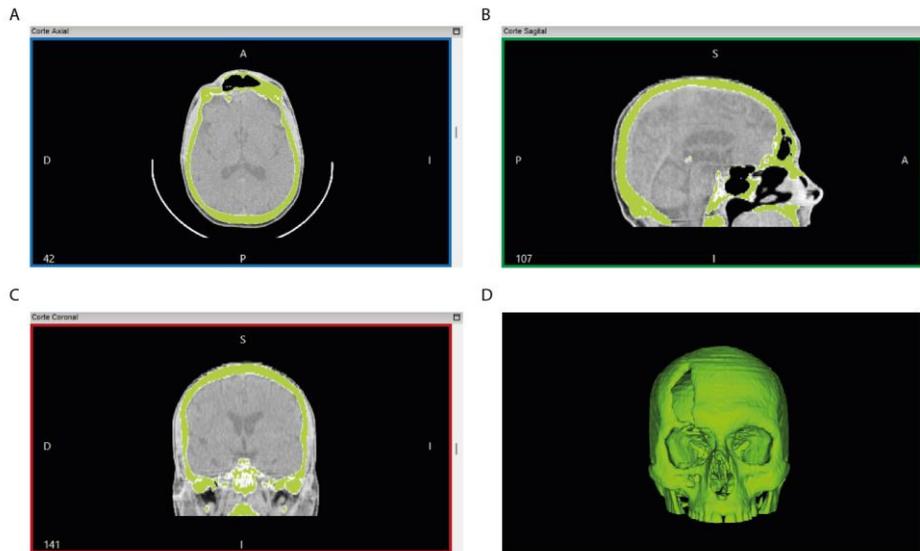


Figura 27. Ejemplo de adquisición de imágenes médicas mediante tomografía computarizada (CT). (A) Sistema de coordenadas en 3D, (B) Corte axial, (C) Corte sagital, (D) Corte coronal. [Elaboración propia]

### 1.5.2. Obtención de un modelo 3D a partir de imágenes médicas

Una vez adquiridas las imágenes médicas, podremos aislar las zonas de interés mediante el uso de un software de análisis de imágenes médicas (en esta Tesis Doctoral se ha utilizado el software Invesalius 3.1) que nos permitirá seleccionar

un rango de interés dentro de la escala de Unidades Hounsfield. Si queremos, por ejemplo, aislar el tejido óseo, debemos elegir un rango de densidades tomográficas próximo a +1000 UH (+1000 UH para el hueso cortical compacto y +700UH para el hueso esponjoso). En cambio, si queremos aislar tejidos blandos, tendremos que seleccionar un rango más próximo a 0 e incluso a -1000UH (+10 a +40 UH para el músculo, +30 UH para el riñón, -50 a -100 UH para la grasa, y -500 UH para el pulmón) (83-85). Una vez seleccionado el umbral deseado, el software se encargará de realizar el proceso de segmentación, es decir, generará un modelo 3D combinando toda la información (valores de grises) contenida en las imágenes 2D adquiridas (77) (**Figura 28**). El modelo 3D obtenido podrá ser exportado en distintos formatos, siendo los más comunes STL (.stl), Wavefront (.obj), X3D (.x3d), e Inventor (.iv), entre otros.



*Figura 28. Ejemplo de segmentación realizado con el programa Invesalius 3.1, para la obtención del modelo 3D del cráneo de un paciente. (A) Corte Axial, (B) Corte sagital, (C) Corte Coronal, (D) Modelo 3D obtenido. Como puede observarse en las imágenes tomográficas, la región aislada (próxima a +1000 UH) se ha coloreado en verde para una mejor visualización [Elaboración propia].*

### 1.5.3. Impresión 3D de los modelos obtenidos

Una vez se ha realizado la segmentación y disponemos de un modelo 3D en formato STL, podemos proceder a la última fase previa a la impresión 3D, conocida

como laminado o *slicing*. Esta etapa consiste en cargar el archivo STL en un software de laminado (laminador o *slicer*), que cortará el modelo 3D digital en secciones en bidimensionales generando un código G (.gcode) (Figura 29). Asimismo, este código G contendrá toda la información relativa a las coordenadas que debe seguir la impresora para formar el modelo 3D en el espacio, y se generará a partir de los parámetros de impresión que elija el usuario (temperatura, altura de capa, velocidad de impresión, etc.). En última instancia, solo tendremos que cargar el archivo .gcode en la impresora 3D, que se encargará de imprimir el objeto deseado.

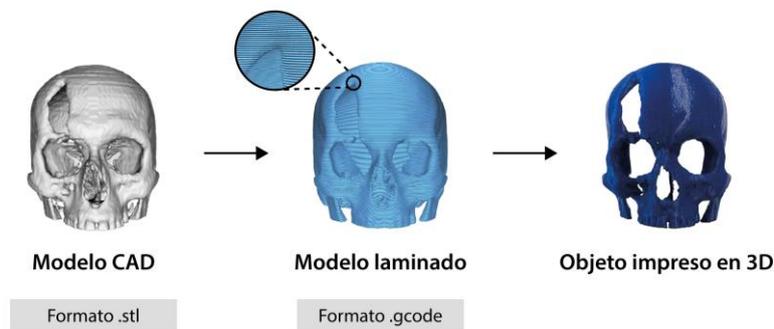


Figura 29. Impresión 3D de un cráneo humano a partir de un modelo CAD obtenido por microtomografía computarizada. En la etapa de laminado, se pueden apreciar (a mayor detalle) las líneas de impresión y el recorrido que realizará la impresora para fabricar el objeto 3D.

## 1.6. BIOMATERIALES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Hoy en día, el término Biomateriales abarca una amplia gama de materiales, que sigue aumentando día tras día con la aparición de nuevas tecnologías que ni siquiera existían hace una década. Los biomateriales abarcan desde biotintas (*bio-inks*) o hidrogeles blandos para el transporte celular hasta implantes rígidos de metal o cerámica, aunque estos últimos no son de uso habitual en Ingeniería de Tejidos dado que no son reabsorbibles o biodegradables. A medida que aumenta el dominio de la ciencia y la biología de los materiales, también lo hace el número de clasificaciones de los tipos de biomateriales (86, 87).

En el contexto de la bioimpresión, los biomateriales se limitan actualmente a dos categorías principales. La primera categoría es la de los **polímeros curables**, que dan lugar a materiales mecánicamente robustos que proporcionan rigidez a las

estructuras 3D impresas. La segunda categoría es la de los **biomateriales blandos**, como las biotintas o hidrogeles (generalmente con un alto contenido en agua) en cuyo interior pueden residir células. En los siguientes apartados se ofrece una visión general de estos tipos de materiales y se repasan los más utilizados actualmente en el campo de la Ingeniería de Tejidos.

### 1.6.1. Polímeros curables como soporte estructural

Las tecnologías de impresión 3D surgieron por la necesidad de fabricar estructuras complejas compuestas de metales y termoplásticos capaces de proporcionar un soporte estructural para la regeneración de tejidos. Sin embargo, estos métodos de fabricación suelen implicar el uso de altas temperaturas, disolventes orgánicos, o agentes reticulantes, lo que los hace incompatibles con el uso de células vivas y materiales biológicos, como las proteínas y las moléculas de señalización celular. Aun así, debido a sus interesantes propiedades mecánicas, se han utilizado ampliamente como componentes estructurales de scaffolds biológicos.

Uno de los polímeros curables más utilizados en impresión 3D es la polilactona (PCL), un termoplástico biodegradable elaborado a partir de los derivados del petróleo, caracterizado por tener un punto de fusión muy bajo (60 °C), baja viscosidad, y fácil procesabilidad. La PCL suele utilizarse a menudo para la fabricación de scaffolds que sirvan como soporte para la neoformación del tejido, y aunque es de naturaleza hidrofóbica, suele combinarse con otros materiales de origen natural o sintético con el fin de mejorar la adhesión celular. Su tiempo de reabsorción suele variar según su grado de pureza, aunque en la literatura se describen tiempos de biodegradación *in vivo* que van desde 6 meses a 2 años. Por ello, según la aplicación enfocada, suele combinarse con otros polímeros de uso común en Ingeniería de Tejidos, como el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), con el fin de modificar sus propiedades y acelerar su velocidad de reabsorción.

### 1.6.2. Biomateriales blandos e hidrogeles

Las tecnologías de Bioimpresión 3D surgieron a partir de aplicaciones que requerían la fabricación de estructuras capaces de transportar células, proteínas, factores de crecimiento, u otras moléculas bioactivas que pudieran verse afectadas

por las altas temperaturas utilizadas en las tecnologías de impresión 3D. Con la excepción del hueso y los dientes, los hidrogeles permiten imitar los módulos elásticos ( $E'$ ) asociados con los tejidos blandos del organismo. De hecho, los hidrogeles capaces de encapsular células son mucho más eficientes que los scaffolds 3D rígidos fabricados a base de polímeros curables. La mayoría de los hidrogeles utilizados en bioimpresión 3D suele pertenecer a una de las siguientes categorías: (1) **hidrogeles sintéticos**, completamente sintetizados en el laboratorio, o (2) **hidrogeles de origen natural**, que se obtienen y purifican a partir de fuentes naturales. Ejemplos comunes de hidrogeles sintéticos incluyen materiales basados en polietilenglicol (PEG), como el diacrilato de PEG (PEGDA), así como geles basados en poliacrilamida (PAAm). Algunos ejemplos de materiales de origen natural que se utilizan habitualmente para fabricar hidrogeles son el colágeno, el ácido hialurónico, el quitosano, el alginato y la fibrina.

Entre ellos, el quitosano (CS) se ha utilizado en esta tesis doctoral para la fabricación de uno de los dos biocomposites desarrollados. Se trata de un polímero semicristalino de origen natural que se obtiene por desacetilación parcial de la quitina en condiciones alcalinas, y es uno de los materiales más utilizados para preparar hidrogeles debido a su excelente biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad (160, 161).

### 1.6.3. Metales

Aunque no son de uso habitual en Ingeniería de Tejidos, metales como el acero inoxidable, titanio (Ti), cobalto (Co), cromo (Cr), níquel (Ni), y sus diversas aleaciones (Co-Cr, Ni-Ti, etc.) se utilizan en diversas aplicaciones y formas en este campo. Por ejemplo, en cirugía ortopédica y traumatología, se utilizan para la fabricación de implantes metálicos, como las prótesis articulares y los dispositivos de fijación ósea (clavos, tornillos, placas, etc.). Por otro lado, los metales en forma de nanopartículas (de oro y plata, por ejemplo), han generado un gran interés debido a sus interesantes propiedades antimicrobianas y a su capacidad para encapsular y liberar de forma controlada factores de crecimiento u otras moléculas bioactivas.

#### 1.6.4. Cerámicas

Hasta la fecha, alrededor del 60% de los sustitutos de los injertos óseos disponibles comercialmente están basados en cerámicas. En este sentido, se han propuesto diferentes precursores cerámicos, pero la familia de las cerámicas basadas en fosfato cálcico (CaP) merece especial atención debido a su biocompatibilidad y disponibilidad ilimitada (98-101). No obstante, estos materiales deben superar sus principales inconvenientes que tienen que ver con su estructura quebradiza y con su velocidad de degradación en el organismo, que dependerá de su composición.

Las principales cerámicas utilizadas en Ingeniería de Tejidos son la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP), los vidrios bioactivos (silicato de calcio), y las cerámicas a base de silicio, y suelen utilizarse para promover la adhesión celular y la formación de nuevo tejido óseo. Para la elaboración del primer material desarrollado en esta Tesis, se ha combinado una cerámica de  $\beta$ -Fosfato Tricálcico con una base polimérica de policaprolactona (PCL) con el fin de evaluar el efecto de esta cerámica en la diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSC*).

## II – HIPÓTESIS DE TRABAJO

---



## II - HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las combinaciones de policaprolactona (PCL) con una cerámica de fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), y de manera similar, policaprolactona con un hidrogel de quitosano (CS) cargado con vancomicina (Van), constituyen dos formulaciones efectivas para (i) promover la osteogénesis a partir de la diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales humanas adultas multipotentes y (ii) constituir un sistema de liberación controlada (SLC) de vancomicina con efecto bactericida frente a dos cepas de bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), respectivamente.



## **III – OBJETIVOS**

---



### III - OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es evaluar, mediante ensayos *in vitro*, la eficacia de dos biocomposites, anteriormente descritos, sobre (i) la diferenciación osteogénica de un cultivo secundario de células madre mesenquimales adultas humanas (*ahMSC*) multipotentes, y, por otro lado, sobre (ii) la actividad antimicrobiana como sistema de liberación controlada (SLC) de vancomicina frente a dos cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *epidermidis*).

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dicho objetivo general se articula en diversos objetivos específicos que se muestran detallados a continuación:

- Fabricar matrices tridimensionales poliméricas (scaffolds) a base de polilactona (PCL) de tamaño, sección, y porosidad controlada mediante el software de una bioimpresora 3D, capaces de proporcionar un soporte y un entorno de crecimiento adecuado para su posterior funcionalización con células.

- Generar materiales biodegradables y biocompatibles funcionalizados con factores de crecimiento u otras moléculas bioactivas, que interactúen con los sistemas biológicos de las células que componen el tejido diana.

- Elaborar materiales capaces de unirse covalentemente con moléculas poliméricas (quitosano) y fármacos con propiedades bactericidas (vancomicina), que actúen como sistemas degradables y que puedan ser liberados de forma controlada, gracias a su inclusión en matrices poliméricas.

- Determinar por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) y microanálisis con espectrometría de dispersión de rayos X (MEB-EDX) la morfología celular y la presencia de elementos químicos (Ca/P) en la matriz extracelular sintetizada por las *ahMSCs* sembradas sobre el material, evidencia de la fase de mineralización *in vitro* y que representa el estadio final de la diferenciación osteoblástica.

- Realizar una caracterización estructural de los materiales mediante estudios de imagen no invasivos (microtomografía computarizada,  $\mu$ CT), haciendo especial énfasis en el tamaño, la morfología de los poros y la porosidad global.

- Determinar la liberación de vancomicina *in vitro* a partir del biocomposite policaprolactona/quitosano/vancomicina (PCL/CS/Van) y evaluar su capacidad bactericida frente a dos cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*).

- Aislar, cultivar y caracterizar *ah*MSCs derivadas de la médula ósea con el fin de corroborar las propiedades de adhesión, proliferación, y diferenciación *in vitro* hacia el linaje osteoblástico en presencia de los biocomposites fabricados.

- Determinar la respuesta biológica provocada por las moléculas utilizadas en la fabricación de los biocomposites sobre un cultivo de *ah*MSCs en relación con su citotoxicidad, actividad metabólica y diferenciación a células de estirpe osteoblástica, mediante la cuantificación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH), el estudio de la actividad metabólica (AlamarBlue®) y la identificación de marcadores osteogénicos mediante técnicas histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas, qRT-PCR y citometría de flujo, comparándolas con diferentes controles (material no funcionalizado y poliestireno).

## **IV - MATERIAL Y MÉTODO**

---



## IV - MATERIAL Y MÉTODO

En este apartado quedan descritos de modo individualizado los **Materiales y Métodos** utilizados para la fabricación de los dos materiales objeto de estudio, tal como se detalla a continuación.

### 4.1. ESTUDIO SOBRE LAS MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEoblástica DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS MULTIPOTENTES DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA INDUCIDAS POR UN NOVEDOSO MATERIAL POROSO DE GRADO MÉDICO IMPRESO EN 3D A BASE DE POLICAPROLACTONA Y B-FOSFATO TRICÁLCICO

En la actualidad, los enfoques más comunes para la regeneración ósea se centran en la fabricación de sustitutos óseos que reemplacen el uso de los injertos óseos autólogos (88-93). En este contexto, en las últimas décadas, se han desarrollado con éxito un gran número de estrategias destinadas a producir biomateriales sintéticos a base de polímeros blandos (que pueden ser administrados como inyectables), scaffolds rígidos que actúan como matrices tridimensionales para imitar las estructuras óseas y sus funcionalidades, o una combinación de ambas estrategias (88, 92, 94). Una matriz sintética ideal para la regeneración y reparación de hueso no sólo debe ser bioactiva y reabsorbible, sino que también debe presentar características estructurales específicas (micro/macroporosidad) y propiedades mecánicas y bioquímicas que imiten a las de los tejidos nativos (95, 96), ya que estas propiedades modulan la respuesta biológica del scaffold e influyen en su rigidez, morfología superficial, hidrofiliidad y tiempo de degradación, así como en la adhesión, proliferación y diferenciación celular (97). De hecho, una porosidad abierta e interconectada facilita el flujo de células, fluidos, y nutrientes a las zonas internas del scaffold, aumentando la capacidad de proliferación celular (94).

Hasta la fecha, alrededor del 60% de los sustitutos de los injertos óseos disponibles comercialmente están basados en cerámicas. En este sentido, se han propuesto diferentes precursores cerámicos, pero la familia de las cerámicas basadas en fosfato cálcico (CaP) merece especial atención debido a su biocompatibilidad y

disponibilidad ilimitada (98-101). No obstante, estos materiales deben superar su principal inconveniente que tiene que ver con su estructura quebradiza. Además de los sustitutos basados en cerámica, otros de los biomateriales con estructuras tridimensionales más comunes, se basan en precursores naturales, sintéticos, o en una combinación de ambos (102). Entre los precursores de polímeros sintéticos más versátiles para su uso como sustitutos óseos, la policaprolactona (PCL) merece especial atención debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y ductilidad. En la actualidad, se utiliza ampliamente para aplicaciones en las industrias médica y farmacéutica.

En los últimos años, ha emergido una nueva vertiente en la búsqueda de nuevos biomateriales basada en la combinación de polímeros biocompatibles con cerámicas inorgánicas como el  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP,  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), principalmente debido a su gran potencial de aplicaciones en clínica (100, 101, 103-108). La asociación de polímeros con  $\beta$ -TCP no sólo ofrece la posibilidad de fabricar materiales a medida con propiedades fisicoquímicas mejoradas, sino también con una tasa de reabsorción modulable, facilitando la adhesión proteína/célula, la proliferación, la diferenciación osteogénica y la osteointegración (109-116). Estos materiales también podrían utilizarse como soporte para la liberación controlada de diversas moléculas, como factores de crecimiento (FCs), antibióticos, bifosfonatos y estatinas, que promoverían la osteogénesis y la regeneración del tejido óseo (90-92, 110, 117-122). La funcionalidad de los materiales anteriormente mencionados puede ser mejorada mediante el uso de moléculas biológicas como la gelatina, el quitosano, o la fibronectina, que suelen utilizarse para recubrir los scaffolds con el fin de aumentar la adhesión celular (123-126). En este contexto, Díaz-Arca y col. (89) informaron de la fabricación de scaffolds de fosfato tricálcico (TCP) y silicocarnotita (SC) mediante sinterizado, que imitan la microestructura interna del hueso esponjoso y pueden combinarse con factores osteogénicos para mejorar su rendimiento en aplicaciones de reconstrucción ósea (127). En dichos materiales, el TCP se encarga de liberar iones de calcio y fósforo, potenciando así la proliferación y la diferenciación celular (94). Del mismo modo, Shin y col. (128) informaron de la fabricación de scaffolds compuestos bifásicos de PCL/ $\beta$ -TCP (BCP) con una estructura porosa interconectada mediante lixiviación salina y liofilización. Demostraron que los materiales compuestos descritos eran biocompatibles y provocaban una mejora significativa

en la diferenciación osteogénica. Sin embargo, fueron incapaces de observar un aumento significativo de la proliferación de células madre mesenquimales humanas (*ahMSCs*) a partir de del séptimo día de cultivo. Otros hallazgos interesantes fueron reportados por Park y col. (129), quienes demostraron una diferenciación osteogénica positiva de *ahMSCs* bajo la estimulación mecánica de scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP impresos en 3D. Sorprendentemente, los composites con un menor contenido de  $\beta$ -TCP mostraron una menor expresión de marcadores osteogénicos en comparación con los composites con un mayor contenido de  $\beta$ -TCP. Sin embargo, sólo investigaron los efectos del  $\beta$ -TCP en la proliferación y diferenciación *in vitro* durante un periodo de nueve días. Más recientemente, Yang y col. (130) informaron de las respuestas biológicas de las líneas celulares MC3T3-E1 sobre scaffolds impresos en 3D de PCL/ $\beta$ -TCP. Demostraron que los materiales tratados con plasma de oxígeno y/o polimerización con plasma de amina influyen positivamente en los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica de las células. Así pues, la fabricación de materiales compuestos biocompatibles alternativos para estimular la regeneración y reparación óseas sigue siendo un campo atractivo y con infinitud de posibilidades.

En este primer trabajo, nos centramos en la fabricación de novedosos scaffolds porosos híbridos polimérico-cerámicos impresos en 3D basados en policaprolactona (PCL) y micropartículas de  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), y estudiamos su influencia en el proceso de adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica de *ahMSCs* multipotentes mediante cultivos primarios de células madre mesenquimales humanas. Asimismo, evaluamos la posible influencia positiva de la liberación de iones de calcio y fósforo sobre la actividad metabólica y la diferenciación celular. Por otro lado, estudiamos los efectos de las características físico-estructurales de los scaffolds fabricados sobre la citotoxicidad (viabilidad celular), la producción de matriz extracelular y las variaciones en la expresión génica para confirmar la diferenciación osteoblástica.

#### 4.1.1. Fabricación de scaffolds porosos poliméricos impresos en 3D

##### 4.1.1.1. *Preparación de filamentos de PCL recubiertos con micropartículas de $\beta$ -Fosfato Tricálcico*

A continuación, se describe el proceso utilizado para la preparación de los filamentos compuestos de policaprolactona y  $\beta$ -fosfato tricálcico, denominados PCL/ $\beta$ -TCP. Los filamentos de PCL (MW 50 kD) de 1,75 mm de diámetro y 150 mm de longitud se calentaron a 65 °C en agua caliente (baño María) hasta que el filamento se volvió flexible y cambió su aspecto de blanco opaco a completamente transparente. A continuación, los filamentos se recubrieron manualmente con micropartículas de  $\beta$ -TCP que previamente habían sido trituradas y tamizadas a 125  $\mu$ m para evitar un posible atasco del extrusor. Seguidamente, los filamentos recubiertos se secaron a temperatura ambiente (RT) durante 30 min antes de ser introducidos en el extrusor de la impresora. Cabe mencionar que tanto los filamentos de PCL (sin recubrir) como los de PCL/ $\beta$ -TCP se pesaron para estimar la concentración final de micropartículas de  $\beta$ -TCP, que se estimó en un 5 % del peso total de los filamentos. El diámetro medio de los filamentos se calculó a partir de al menos 20 mediciones realizadas sobre diferentes imágenes adquiridas con un estereomicroscopio.

##### 4.1.1.2. *Diseño e impresión de scaffolds 3D con porosidad controlada mediante la tecnología de Modelado por Deposición Fundida (FDM)*

Los scaffolds se diseñaron con el software REGEMAT 3D Designer v1.4.4 y se fabricaron mediante Modelado por Deposición Fundida (FDM) utilizando un modelo de bioimpresora REGEMAT 3D Bio V1® (REG4Life, REGEMAT 3D, Granada, España) equipada con una cama de cristal y una boquilla de 0,4 mm de diámetro (**Figura 30A**). Las dimensiones de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP se establecieron en 1,50 × 20 × 20 mm (alto × ancho × largo) (**Figura 30B,C**) y se imprimieron utilizando los mismos parámetros (*velocidad de flujo* 11 mm/s, *altura de capa* 0,25 mm, *tamaño de poro* 200  $\mu$ m y *temperatura de impresión* 160 °C). El número de perímetros y capas sólidas inferiores/superiores se fijó en 0, lo que permitió obtener scaffolds con porosidad abierta e interconectada. Para mejorar la reproducibilidad de los experimentos y reducir la variabilidad entre las muestras, se utilizó un punch

para biopsia de 8 mm con el fin de preparar scaffolds definidos y reproducibles (**Figura 30D**), obteniendo cuatro scaffolds en forma de disco de  $8 \times 1,5$  mm (diámetro  $\times$  altura) por cada scaffold impreso (**Figura 30E**), cumpliendo con la norma internacional ISO/FDIS 23317 (131).

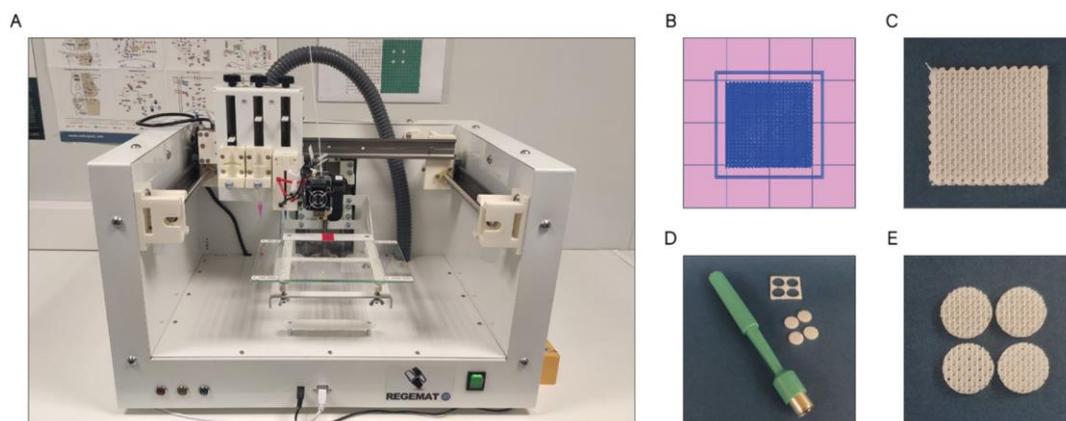


Figura 30. Dispositivo utilizado para la bioimpresión 3D de los composites y proceso de fabricación de los scaffolds. (A) Bioimpresora REGEMAT 3D Bio V1®, (B) Previsualización del diseño del scaffold con el software REGEMAT 3D Designer v1.4.4, (C) Scaffolds impresos en 3D de dimensiones  $1,50 \times 20 \times 20$  mm (altura  $\times$  anchura  $\times$  longitud), (D) Obtención de los discos utilizando un punch para biopsia de 8 mm, y (E) Scaffolds obtenidos.

A continuación, los scaffolds se lavaron con agua destilada en un agitador orbital durante 30 min a 250 rpm para eliminar cualquier contaminación por polvo antes ser esterilizados con un sistema de luz pulsada XeMaticA-Basic-1L (Steri-beam, Kehl, Alemania). Este último produce pulsos que van desde la luz infrarroja (IR) a la ultravioleta (UV) con un 21% de contenido UV (132). La eficacia del método se verificó incubando las muestras durante cinco días a  $37^\circ\text{C}$  en tubos de ensayo con 7 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB, *Tryptic Soy Broth*) estéril (#T8907; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Esta metodología se utiliza ampliamente para detectar la presencia de microorganismos en este tipo de muestras.

#### 4.1.2. Caracterización de los filamentos compuestos y de los scaffolds impresos en 3D

##### 4.1.2.1. Caracterización morfológica y microanálisis de los filamentos y de los scaffolds 3D. Microscopía electrónica de barrido (MEB) y microanálisis por dispersión de energía de rayos X (MEB-EDX)

La caracterización morfológica de los filamentos y de los scaffolds impresos en 3D se llevó a cabo mediante una cámara digital (AxioCam 305 color) acoplada a un microscopio óptico (Zeiss 415510), microscopía electrónica de barrido (MEB; modelo JEOL-6100 (JEOL Ltd., Tokio, Japón)) y espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX; Oxford INCA (Oxford Instruments plc., Abington, Oxfordshire, Reino Unido)). Para el análisis MEB, las muestras se cubrieron con oro, mientras que para el análisis EDX se cubrieron con carbón para evitar solapamientos del espectro con otros elementos.

##### 4.1.2.2. Estudio de la porosidad de los scaffolds y la distribución de micropartículas de $\beta$ -TCP mediante microtomografía computarizada ( $\mu$ CT)

La porosidad del scaffold y la distribución de las micropartículas de  $\beta$ -TCP se analizaron utilizando un sistema de imágenes micro-CT Quantum GX2 (PerkinElmer, Hopkinton, MA, EE. UU.) a un tamaño de voxel de 72  $\mu$ m. Para ello, se colocaron tres muestras (seleccionadas al azar) en una cama de 35 mm de diámetro y a continuación, se realizó un escaneo completo de los scaffolds (parámetros de escaneo: energía = 90 kV; intensidad = 88  $\mu$ A). Las imágenes microestructurales escaneadas se reconstruyeron utilizando el software Invesalious 3.1 (©2007-2017, Centro de Tecnología de la Información Renato Archer CTI). Se analizó la porosidad total, el tamaño de los poros y la porosidad abierta de cada scaffold. Para obtener la porosidad total  $p$ , se comparó el volumen del scaffold  $V_s$  con el volumen teórico del cilindro  $V_T$  de las mismas características utilizando la siguiente ecuación (97):

$$p = 1 - (V_s/V_T) \quad \text{Ecuación (1)}$$

#### 4.1.3. Adhesión de proteínas: Ensayo con Azul Brillante Coomassie

Para determinar la adsorción de proteínas en la superficie de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP se utilizó el método del Azul Brillante de Coomassie. En primer lugar, los scaffolds se sumergieron durante 30 minutos en suero bovino fetal (SBF; #F7524, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) para permitir la adhesión de las proteínas contenidas en el suero. A continuación, se eliminó el exceso de solución y los scaffolds se dejaron secar en un horno a 37 °C durante 45 min. Una vez secos, los scaffolds se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min y se sumergieron durante 30 min en la solución de tinción Coomassie, que se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye, #20278; Thermo Fisher, Rockford, IL, USA). Por último, los scaffolds se enjuagaron tres veces con una solución decolorante recomendada por el fabricante, compuesta por metanol/ácido acético/agua destilada (40/10/50, % v/v/v).

#### 4.1.4. Cinética de degradación *in vitro*

La degradación de los scaffolds se evaluó *in vitro* midiendo la pérdida de peso de las muestras fabricadas en un periodo de tiempo determinado. Para este fin, los scaffolds poliméricos se pesaron y posteriormente se sumergieron en 2 mL de Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) en placas de 12 pocillos incubadas a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con 95% de humedad relativa, durante diferentes periodos de tiempo de 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días. A continuación, los scaffolds se recuperaron del medio, se enjuagaron con agua desionizada, se secaron a 37 °C durante 24h y se volvieron a pesar. La pérdida de peso (WL) se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$WL\% = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

donde  $W_0$  y  $W_d$  indican el peso del scaffold antes y después del tiempo de inmersión programado, respectivamente. Los experimentos de degradación se realizaron, al menos por triplicado, y cada medición se efectuó seis veces para obtener resultados estadísticamente significativos.

#### 4.1.5. Aislamiento, caracterización y cultivo de células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSCs*) derivadas de la médula ósea

Las *ahMSCs* fueron aisladas y cultivadas tal y como se ha descrito en publicaciones previas (133, 134) y caracterizadas de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) (68) (datos no mostrados). Brevemente, para este estudio se reclutaron tres pacientes sanos programados para cirugía ortopédica electiva, y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de ellos. La médula ósea se extrajo mediante aspiración percutánea directa de la cresta ilíaca. A continuación, se separaron las células mononucleares de la médula ósea y se lavaron utilizando un dispositivo SEPAX® S-100 (Biosafe, Eysins, Suiza). Para más detalles relacionados con la metodología y el procedimiento aplicado, el aislamiento celular, el cultivo y la expansión de *ahMSCs*, consultar publicaciones anteriores (133, 134). Después de determinar la viabilidad de las células nucleadas con una solución de azul tripán (#T8154; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.) para su expansión inicial, las células cosechadas se sembraron a una densidad de  $3.75 \times 10^5$  células en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Biofil®) con 10 mL de medio de crecimiento básico (GM) consistente en un 88% de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (#31885-023; Gibco, Bleiswijk, Países Bajos) al que se añadieron un 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) inactivado (#F7524, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (#P4333, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.). Después, los frascos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad relativa (HR). Al cabo de siete días, se renovó el medio de cultivo, eliminando así las células no adherentes, incluidas algunas células hematopoyéticas, lo que facilitó la identificación y selección de las células adheridas (135). Cuando se alcanzó una confluencia del 80-90%, las células se despegaron con tripsina/EDTA al 0,25% p/v (#T4049, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) durante 5 min. A continuación, las células recogidas se subcultivaron en una proporción 1:3 y se expandieron para su uso futuro. Los pases 3 y 4 (P3-P4) se tripsinizaron y reservaron para ser utilizados en los ensayos *in vitro* posteriores.

Todos los ensayos biológicos cumplieron plenamente con las normativas establecidas y el protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de

Ética Institucional de la UCAM-Universidad Católica de Murcia (nº autorizado CE051904) Comité de Ética de la UCAM (nº CE 052114).

#### 4.1.6. Caracterización de las *ahMSCs*

Antes de realizar los ensayos *in vitro*, se evaluó la pureza de las poblaciones de *ahMSCs* mediante citometría de flujo (Beckman Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA; Software Navios). Para caracterizar las células, se marcó un grupo de *ahMSC* separadas de diferentes matraces con un kit de fenotipado de MSC (#130-095-198, Miltenyi Biotec, Bergisch- Gladbach, Alemania) y el anticuerpo PE Anti-Rat CD44H mouse IgG2A (R&D Systems), para cuantificar la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD44.

#### 4.1.7. Métodos de siembra celular

Antes de realizar la siembra celular, los scaffolds se acondicionaron con el medio de cultivo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con 95% de HR durante 48 h.

Para los ensayos de adhesión, proliferación y viabilidad celular, las *ahMSC* se sembraron sobre la superficie de discos de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP a una densidad de  $5 \times 10^4$  células cm<sup>-2</sup> en placas de 48 pocillos, tomando como control positivo células sembradas en el fondo de pocillos de poliestireno tratados para cultivos tisulares (TCPS; Sigma-Aldrich, Corning, NY, EE. UU.). Para el ensayo de actividad metabólica (ensayo AlamarBlue®), los scaffolds se cambiaron rigurosamente con la ayuda de unas pinzas a una nueva placa de 48 pocillos 24 h después de la siembra, con el fin de cuantificar únicamente la actividad metabólica de las células que crecieron adheridas al scaffold. En ese momento, se contaron y descartaron las células adheridas al fondo de los TCPS. El recuento medio total de células adheridas al fondo de la placa multipocillos fue de  $2 \times 10^4$  células cm<sup>-2</sup>, lo que arroja un valor aproximado de  $3 \times 10^4$  células adheridas al scaffold.

Para realizar los estudios de diferenciación osteogénica, los scaffolds se colocaron en insertos de 0,4  $\mu$ m (Falcon®) y las *ahMSCs* se sembraron en el fondo de los pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células cm<sup>-2</sup>. Las células sembradas en los TCPS se tomaron como control positivo. A partir del día 7, un conjunto de al menos tres

placas cultivadas inicialmente en medio de crecimiento (GM) se sustituyeron por medio de diferenciación osteogénica (OM) (OsteoMAX-XFTM Differentiation Medium; #SCM121, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). De este modo, se caracterizó la diferenciación celular inducida por todos los scaffolds creciendo tanto en GM como en OM, con el fin de evaluar su eficacia en ambas condiciones de cultivo. Los medios se cambiaron dos veces por semana en todos los experimentos realizados.

#### **4.1.8. Ensayos de viabilidad, adhesión y proliferación celular**

##### **4.1.8.1. Ensayo de citotoxicidad**

La viabilidad de las *ahMSCs* se evaluó mediante un ensayo de viabilidad celular basado en resazurina (AlamarBlue®; #DAL1100, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) los días 1 y 3 después de la siembra. Brevemente, a diferentes periodos de estudio, se añadió medio fresco (500  $\mu$ L) mezclado con el reactivo AlamarBlue® al 10% (v/v) a cada pocillo y se incubó a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de HR durante 4 h. Durante este tiempo, la placa de cultivo se envolvió con papel de aluminio para protegerla de la luz. A continuación, se transfirieron alícuotas de 150  $\mu$ L de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de pared opaca y se midió la fluorescencia utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) Synergy MX (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) a longitudes de onda de excitación y emisión de 530 y 590 nm, respectivamente.

##### **4.1.8.2. Ensayo de actividad metabólica celular**

Para evaluar la actividad metabólica de las *ahMSCs* en los días 1, 3, 7 y 14 después de la siembra, se utilizó AlamarBlue® siguiendo las instrucciones del fabricante. En este ensayo, sólo se evaluó la actividad metabólica de las células adheridas a los scaffolds (las células que crecieron en la placa multipocillos se contaron y se descartaron, como aparece detallado en el apartado 4.1.7). En cada periodo de estudio, se midió la fluorescencia con un espectrofotómetro UV-Vis Synergy MX (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) a longitudes de onda de excitación y emisión de 530 y 590 nm, respectivamente.

#### 4.1.9. Ensayos de diferenciación osteoblástica

##### 4.1.9.1. *Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina (ALP)*

La actividad fosfatasa alcalina (ALP) de las *ahMSCs* se evaluó 7 y 14 días tras la siembra utilizando un kit de detección de fosfatasa alcalina (#SCR004, Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). En cada periodo de estudio, las células se despegaron con tripsina y se alicuotaron  $2 \times 10^4$  células (por muestra) para cuantificar la hidrólisis de p-nitrofenilfosfato en fosfato y p-nitrofenol, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta reacción produce un subproducto de color amarillo que es proporcional a la cantidad de ALP presente en la reacción. En cada periodo de estudio, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) Synergy MX (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

##### 4.1.9.2. *Mineralización in vitro: Tinción con Solución Rojo Alizarina (ARS)*

La mineralización *in vitro* se evaluó mediante la unión específica de la tinción Rojo Alizarina S (ARS) a los depósitos de calcio a los días 7 y 14 después la siembra utilizando un kit de ensayo de osteogénesis (#ECM815; Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). En cada periodo del estudio, las *ahMSCs* se tiñeron con ARS y se visualizaron con un microscopio óptico (Motic AE2000, Shimadzu Corp., Kyoto, Japón). A continuación, para cuantificar la mineralización de la matriz, se trataron las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante y se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) Synergy MX (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

##### 4.1.9.3. *Expresión de los marcadores de superficie en las células sembradas en contacto indirecto con los scaffolds: Clusters de Diferenciación (CD)*

Para caracterizar las *ahMSCs*, se realizó la cuantificación de los marcadores de superficie celular CD73, CD90, CD105 mediante citometría de flujo (Beckman Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, EE. UU.; Software Navios). En primer lugar, se separaron las células con TrypLETM Select Enzyme (1X) (#11598846, Gibco, Bleiswijk, Países Bajos) y se recogieron, utilizando  $2 \times 10^5$  células para cada condición experimental. A continuación, las células se lavaron con PBS y se marcaron

con un kit de fenotipado de MSC (nº 130-095-198, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania), compuesto por los siguientes fluorocromos Allophycocyanin (APC) conjugado con CD73, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugado con CD90, phycoerythrin (PE) conjugado con CD105, y peridinin-chlorophyll cy5.5 conjugado con CD14/CD20/CD34/CD45. Además, se utilizó como control un tubo de ensayo que contenía células marcadas con el isotipo del cóctel. Para comprobar la viabilidad celular, se añadieron 100 µL del tampón de unión (1:10 en H<sub>2</sub>O), 5 µL del anticuerpo Annexin V y 5 µL de yoduro de propidio (IP) a un tubo etiquetado como Annexin V (Immuno Step). Todos los tubos de ensayo se mantuvieron a 4 °C (en hielo) durante 15 min en un entorno oscuro, y se lavaron con 1000 µL de PBS EDTA, excepto el tubo de Annexin V, que se lavó con un tampón de unión. A continuación, se centrifugaron los tubos (300 g, 10 min, 4 °C) y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el pellet marcado se resuspendió con 500 µL de PBS/EDTA y las muestras se analizaron por citometría de flujo.

#### 4.1.9.4. *Expresión génica del proceso de osteogénesis: Ensayo cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)*

El ensayo qRT-PCR se realizó para cuantificar la expresión génica de la fosfatasa alcalina (ALPL), del colágeno tipo I (COL1A1), del factor de transcripción 2 relacionado con el runt (RUNX2), la osteocalcina (BGLAP), la sialoproteína de unión a integrina (IBSP), la osteonectina (SPARC) y la osteopontina (SPP1). El ARN total se extrajo de las células utilizando un kit RNAqueous Micro (Invitrogen de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, seguido de la transcripción inversa del ARNm con un kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La PCR cuantitativa se realizó con SYBR Premix ExTaq (Takara) en QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Los cebadores específicos para el ARNm se adquirieron a Qiagen (QuantiTech Primer Assays, Hilden, Alemania). Todas las mediciones se realizaron al menos por triplicado. Los valores Ct se convirtieron a cuantificación relativa mediante el método  $2\Delta Ct$  normalizando a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) e hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1) (Qiagen, Hilden, Alemania).

#### 4.1.10. Estadística

Todos los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. La significación estadística se determinó mediante un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPrism 9.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.) en su versión para Windows. Las comparaciones entre grupos se evaluaron con pruebas *t*, siendo el nivel de significación  $p < 0,05$ .

#### 4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *EPIDERMIDIS* DE UN NOVEDOSO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DEGRADABLE IMPRESO EN 3D BASADO EN POLICAPROLACTONA/QUITOSANO/VANCOMICINA. ESTUDIO PRECLÍNICO

Las infecciones óseas, como la osteomielitis, siguen suponiendo una tarea compleja en el campo de la cirugía ósea debido a su elevada tasa de mortalidad y morbilidad (136). Las especies que causan con mayor frecuencia infecciones del lecho quirúrgico e infecciones asociadas a dispositivos médicos son los estafilococos oportunistas Gram positivos ( $\approx 75\%$  de los casos), en particular *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (31, 137). En cuanto a la patogenia, la osteomielitis es compleja y variada, y las bacterias suelen llegar al hueso por dos vías: (i) de forma endógena, a través de la sangre o procedentes de otra fuente de infección cercana o lejana (osteomielitis hematógena); y (ii) de forma exógena, a través de la inoculación directa o la contaminación de un traumatismo abierto o a causa de procedimientos posquirúrgicos (138).

El tratamiento tradicional de la osteomielitis crónica incluye la resección extensa del tejido infectado, la reparación del defecto óseo y la administración sistémica (intravenosa) y local de antibióticos durante largos periodos de tiempo (36, 37) (**Figura 31A**). En casos más específicos, como las infecciones asociadas a la implantación de materiales protésicos (prótesis de cadera, rodilla y hombro) o materiales de osteosíntesis para estabilización de fracturas (placas, tornillos, clavos, etc.), el tratamiento requiere como primera medida la retirada del implante, y al mismo tiempo mantener la antibioterapia intravenosa y local hasta la normalización de los parámetros bioquímicos, y realizar la cirugía de reconstrucción osteoarticular que requiera el caso (36).

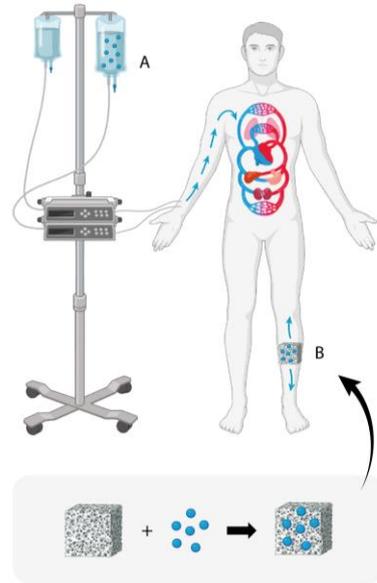


Figura 31. Representación esquemática de las estrategias actuales de tratamiento antibiótico utilizadas para controlar las infecciones óseas. Esferas azules: antibióticos, A: vía intravenosa, B: implantación de un sistema de liberación de fármacos (SLF) consistente en un scaffold cargado con antibióticos.

Otra estrategia para el tratamiento local de las infecciones óseas crónicas se ha basado en la administración de antibióticos mediante la implantación de sistemas de liberación de fármacos (SLF) en el lugar de la infección (**Figura 31B**). Uno de los SLF más utilizados para el tratamiento de la osteomielitis han sido las perlas de polimetilmetacrilato (PMMA) cargadas con antibióticos (139, 140). El PMMA, también denominado cemento óseo acrílico, es un material no reabsorbible que actúa liberando lentamente antibióticos (generalmente gentamicina y vancomicina) a lo largo del tiempo, lo que puede ayudar a erradicar las bacterias causantes de la infección (141, 142). A pesar de haberse utilizado durante décadas en la práctica clínica, las perlas de PMMA distan mucho de ser un portador ideal de antibióticos. Esto se debe a que la no degradabilidad de este biomaterial hace necesaria una segunda intervención quirúrgica para retirar las perlas 2 o 3 semanas después de su implantación (143).

La vancomicina (Van) es el antibiótico más utilizado en el tratamiento de infecciones en cirugía de artroplastia y osteomielitis crónica de cualquier etiología (142). Este antibiótico glucopéptido actúa principalmente como inhibidor de la síntesis de la pared celular en organismos susceptibles. Se une de forma rápida e

irreversible a la pared celular de las bacterias susceptibles, inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, que forma la estructura de la pared celular (144, 145).

La policaprolactona (PCL) es un polímero sintético que se ha utilizado habitualmente en aplicaciones de impresión 3D como componente de andamiaje para la reconstrucción de hueso y cartílago (146-148). Entre sus principales ventajas se encuentran su biocompatibilidad, biodegradabilidad, sus buenas propiedades mecánicas y su baja temperatura de fusión ( $\approx 60$  °C), lo que la hace más versátil que otros polímeros sintéticos utilizados para aplicaciones de impresión 3D (149). Sin embargo, las temperaturas de impresión 3D utilizadas para fabricar scaffolds bien definidos con arquitectura controlada se sitúan en torno a los 120-160 °C, lo que hace imposible combinarlos con células, factores de crecimiento u otras moléculas bioactivas durante el proceso de impresión (150, 151). Por otro lado, la PCL carece de sitios de unión específicos para las células que faciliten la integración tisular (77). Debido a esto, se han desarrollado diferentes estrategias para intentar solventar los inconvenientes ligados a la hidrofobicidad nativa de la PCL, como la modificación de la superficie mediante tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH), o mediante su combinación con otros materiales de origen natural (hidrogeles) o sintético para crear scaffolds híbridos con propiedades mejoradas (152-155). En este sentido, los hidrogeles de origen natural o sintético se han utilizado ampliamente para diferentes aplicaciones biomédicas debido a su capacidad para encapsular células, fármacos, factores de crecimiento u otras moléculas bioactivas (156, 157). Entre los hidrogeles de origen natural se encuentran principalmente el colágeno, el quitosano, el alginato, la fibroína de seda, la gelatina, la celulosa, el ácido hialurónico y los hidrogeles derivados de tejidos descelularizados (158).

El quitosano (CS) es un polímero semicristalino de origen natural que se obtiene por desacetilación parcial de la quitina en condiciones alcalinas (159). Es uno de los materiales más utilizados para preparar hidrogeles debido a su excelente biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad (160, 161). Sin embargo, los hidrogeles de CS presentan varios problemas debidos a sus estructuras inestables con poros de gran tamaño, baja resistencia a la tracción, y malas propiedades mecánicas en condiciones fisiológicas, lo que limita su utilización posterior en estudios *in vivo* (162, 163). Por este motivo, se han combinado con polímeros curables como

la policaprolactona (PCL) y el ácido poliláctico (PLA), que proporcionan a los scaffolds un soporte con propiedades mecánicas mejoradas (164, 165).

La fabricación de materiales híbridos que combinan polímeros naturales y sintéticos es un enfoque muy prometedor para crear nuevos scaffolds que combinen las ventajas intrínsecas de ambos materiales y cumplan varios requisitos, como la actividad biológica, la resistencia mecánica, la facilidad de fabricación y la degradación controlada (166). En este trabajo, nos centramos en la fabricación de un novedoso scaffold híbrido impreso en 3D basado en PCL y un hidrogel de CS cargado con diferentes concentraciones de vancomicina (1, 5, 10 y 20%) como SLF para evaluar su eficacia antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Además, proponemos un método novedoso para mejorar la adhesión de polímeros hidrofóbicos (como la PCL) a hidrogeles mediante dos tratamientos diferentes con plasma frío. Los scaffolds obtenidos combinan la biocompatibilidad natural, la biodegradabilidad y las propiedades antibacterianas del CS con las excelentes propiedades mecánicas de la PCL. Las propiedades morfológicas de los scaffolds se caracterizaron mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (MEB), mostrando que el hidrogel de CS/Van recubría con éxito la matriz de PCL de forma homogénea tras el tratamiento con plasma. Por otro lado, se comprobó la eficacia antibacteriana de los scaffolds frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, y se estudió la liberación de vancomicina en diferentes periodos de tiempo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Por último, evaluamos los posibles efectos adversos sistémicos de los scaffolds a nivel celular analizando la viabilidad, proliferación y diferenciación de una población de células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSCs*) derivadas de médula ósea.

#### **4.2.1. Fabricación de scaffolds porosos de PCL/CS cargados con vancomicina**

##### **4.2.1.1. *Diseño y fabricación de scaffolds de PCL impresos en 3D con porosidad controlada mediante el método FDM***

Los scaffolds se diseñaron con el software REGEMAT 3D Designer v1.4.4 y se fabricaron utilizando una bioimpresora REGEMAT 3D Bio V1® (REG4Life, REGEMAT 3D, Granada, España) equipada con una cama de cristal y un extrusor de termoplástico con una boquilla de 0,4 mm de diámetro. Los scaffolds se diseñaron

con los siguientes parámetros: *tamaño del scaffold* 1,50 x 20 x 20 mm (alto, ancho, largo), *tamaño de poro* 200  $\mu\text{m}$ , *altura de capa* 0,25 mm, *perímetros* 0, *número de capas sólidas inferiores/superiores* 0, *patrón de relleno* triangular; y se fabricaron utilizando un filamento de PCL de grado médico impreso a 160 °C con una velocidad de relleno de 11 mm/s. Como se describe en el trabajo anterior, se utilizó un punch para biopsia de 8 mm con el fin de mejorar la reproducibilidad de los experimentos y reducir la variabilidad entre las muestras, obteniendo scaffolds en forma de disco de 8 x 1,50 mm (diámetro, altura) (**Figura 32A**) (150). Además, se imprimieron scaffolds de PCL no porosos (sólidos) de 12 x 12 x 1,50 mm (anchura, longitud, altura) para evitar que la porosidad interfiriera en algunos de los resultados de los experimentos (**Figura 32B**). Los scaffolds porosos en forma de disco se caracterizaron y utilizaron para todos los ensayos biológicos y microbiológicos, y los scaffolds sólidos sólo se utilizaron para evaluar el efecto del tratamiento con plasma frío sobre la adhesión del hidrogel CS/Van a la matriz de PCL (ensayo de humectabilidad), ya que se observó que la porosidad interfería en los resultados del experimento.

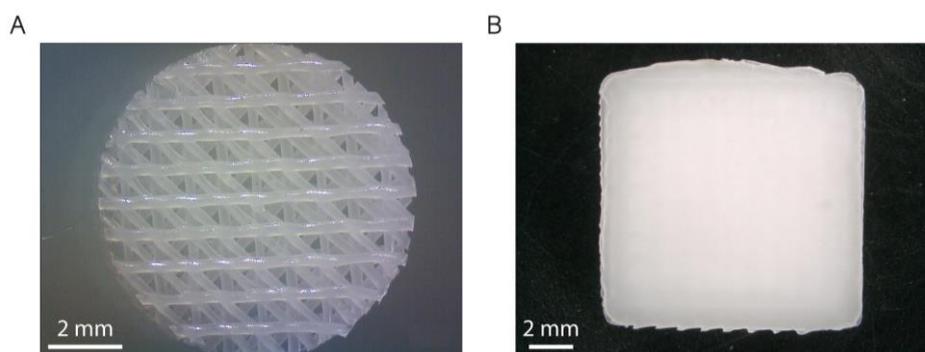


Figura 32. Micrografías de (A) scaffolds porosos y (B) sólidos de PCL impresos con la bioimpresora REGEMAT 3D Bio V1®.

#### 4.2.1.2. Preparación de hidrogeles de quitosano cargados con vancomicina

Los hidrogeles de quitosano se prepararon disolviendo CS de bajo peso molecular a una concentración del 4% (p/v) en agua desmineralizada con ácido acético al 1,5% (v/v). Las soluciones se agitaron mecánicamente durante 24 h (250 rpm) y se añadió vancomicina a los hidrogeles de CS en un contenido de 1, 5, 10 y 20% (p/p de CS). Después de 24 h, las soluciones se centrifugaron (3000 rpm, 1 h) para eliminar las burbujas de aire.

#### 4.2.1.3. Preparación de los scaffolds híbridos

Los scaffolds de PCL impresos en 3D se recubrieron por inmersión (*dip coating*) en el hidrogel de CS y se dejaron secar durante la noche. A continuación, los scaffolds se neutralizaron en una solución de NaOH 1 M durante 2 horas y se enjuagaron tres veces con agua destilada para eliminar los ácidos residuales. Todo el proceso se realizó en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras.

Los ensayos preliminares demostraron que el recubrimiento de CS permanecía firmemente adherido a los scaffolds porosos de PCL, ya que quedaba atrapado entre las fibras impresas. Sin embargo, no fue así en el caso de los scaffolds sólidos de PCL, que repelieron el recubrimiento de CS, como se observa en la **Figura 33C**. Esto podría deberse al hecho de que el PCL es un polímero hidrófobo, lo que dificulta su adhesión a hidrogeles con más de un 90% de contenido en agua.

Recientemente, se han utilizado tratamientos con plasma para reducir la hidrofobicidad de la superficie de los polímeros mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (167). Estas ROS recién formadas generan grupos hidrofílicos (hidroxilo o carboxílicos) en la superficie del polímero que pueden interactuar con los hidrogeles (168). Aunque el tratamiento con plasma no fuera estrictamente necesario para los scaffolds porosos (ya que el hidrogel quedaba firmemente adherido a las fibras impresas), se probaron dos tecnologías diferentes de plasma sobre la superficie de los scaffolds sólidos de PCL: (i) un dispositivo casero de plasma frío a presión atmosférica desarrollado en el GREMI-CNRS que consiste en una Barrera Dieléctrica de Descarga (DBD) de plasma, alimentada con helio y accionada por un pulso de voltaje de microsegundos (169) (**Figura 33A**), y (ii) un dispositivo casero con un generador de plasma piezoeléctrico (CeraPlas®) desarrollado por TDK Electronics GmbH & Co (170) (**Figura 33B**). Esta tecnología se basa en un componente piezocerámico y un circuito impulsor que le permite generar plasma atmosférico frío. Después de ser expuestos a los tratamientos con plasma a una distancia de 5 mm durante 30 segundos, los scaffolds de PCL se recubrieron con hidrogeles de CS y se dejaron secar durante la noche. Como se puede observar en la **Figura 33D**, tras el tratamiento con plasma, el hidrogel de CS no fue repelido por los scaffolds, mostrando una distribución homogénea.

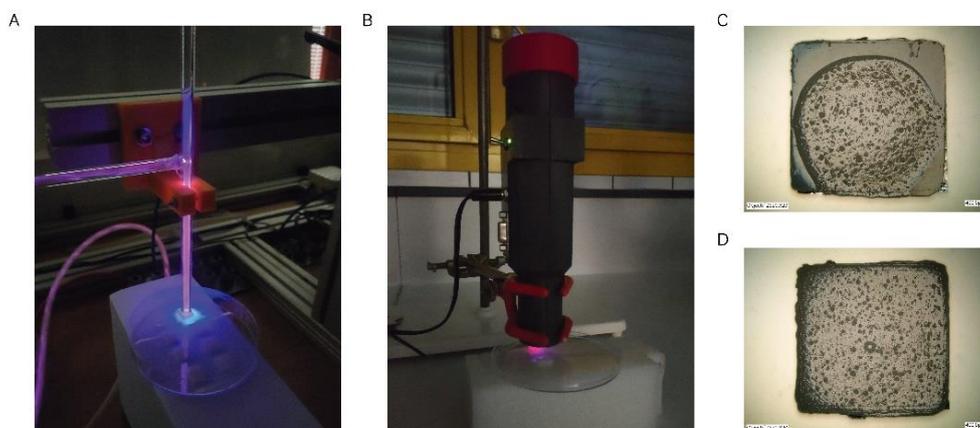


Figura 33. Tratamientos con plasma aplicados sobre los scaffolds sólidos de PCL. (A) Dispositivo casero de plasma atmosférico frío alimentado con helio, (B) Dispositivo casero con generador de plasma piezoeléctrico. Imágenes de microscopía óptica de (C) scaffold de PCL sólido (sin tratar) recubierto con el hidrogel de CS, (D) scaffold de PCL sólido recubierto con el hidrogel CS después de haber sido expuesto al plasma frío durante 30 s.

Para determinar la cantidad de CS adherido a los scaffolds, se comparó el peso de los scaffolds nativos de PCL con el peso de los scaffolds recubiertos con el hidrogel de CS/Van. Después de pesar los scaffolds ( $n=10$ ) en una balanza analítica, se observó un incremento de  $33,34 \pm 0,34$  mg (PCL nativo) a  $41,16 \pm 1,01$  mg (scaffolds PCL/CS/Van). No se obtuvieron diferencias significativas en el peso de los scaffolds de PCL/CS cargados con distintas concentraciones de Van (1, 5, 10, 20%) (datos no mostrados).

#### 4.2.2. Caracterización de los scaffolds impresos en 3D

##### 4.2.2.1. Caracterización morfológica de los scaffolds impresos en 3D

La caracterización morfológica de los scaffolds impresos en 3D se realizó mediante una cámara digital acoplada a un estereomicroscopio. La morfología de la superficie de los scaffolds se examinó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB; modelo JEOL-6100, JEOL Ltd., Tokio, Japón). Antes de ser analizados, los scaffolds se montaron sobre soportes de aluminio con pintura conductora y se recubrieron con platino (10 mA, 120 s). Se obtuvieron micrografías MEB con aumentos de  $\times 20$  y  $\times 45$  bajo un voltaje de aceleración de 15-20 kV y una distancia de trabajo de 4-5 mm.

#### 4.2.2.2. *Ensayo de humectabilidad*

Las mediciones del ángulo de contacto (AC) estático con el agua se realizaron en un analizador de forma de gota (DSA100S KRÜSS GmbH) para evaluar el efecto del tratamiento con plasma frío sobre la hidrofobicidad de la PCL. El volumen de la gota de agua se fijó en 1  $\mu\text{L}$  y la velocidad de depósito en 2,67  $\mu\text{L/s}$ . Brevemente, los scaffolds sólidos de PCL ( $n = 3$ ) se trataron con un dispositivo casero de plasma atmosférico frío alimentado con Helio (Plasma 1) y con un dispositivo casero con un generador de plasma piezoeléctrico (Plasma 2) (**Figura 33**). A modo de control, se utilizaron tres scaffolds sin tratar. Cada medición se realizó por triplicado en tres scaffolds distintos para una mejor significación estadística.

#### 4.2.2.3. *Cinética de degradación in vitro*

La degradación de los scaffolds se evaluó *in vitro* midiendo la pérdida de peso de los scaffolds a 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días. Brevemente, se pesaron los scaffolds de PCL/CS/Van ( $W_0$ , peso inicial) y posteriormente se sumergieron en tubos eppendorf que contenían 1 mL de medio de crecimiento completo (DMEM). Después, los scaffolds se incubaron a 37 °C, en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de HR. En los diferentes períodos de estudio, los scaffolds se recuperaron del medio, se limpiaron ligeramente con papel de filtro y se volvieron a pesar ( $W_d$ , peso final). La pérdida de peso (WL) se calculó aplicando la siguiente ecuación (171):

$$\text{WL}\% = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

donde  $W_0$  y  $W_d$  indican el peso del scaffold antes y después del tiempo de inmersión estipulado, respectivamente.

#### 4.2.3. *Ensayo de absorción de agua*

La absorción de agua por parte de los scaffolds de PCL/CS/Van se evaluó utilizando soluciones de tampón fosfato salino (PBS, pH = 7,4). Para ello, se colocaron tres scaffolds de PCL/CS/Van de peso conocido en cestas de acero inoxidable para evitar que flotaran. A diferentes tiempos (0,5, 1, 3, 6, 24, 48 h), los scaffolds se

recuperaron y se limpiaron delicadamente con papel de filtro antes de ser pesados. El porcentaje de absorción de agua se calculó utilizando la siguiente ecuación (172):

$$\text{Absorción de agua (\%)} = [(W_T - W_0)/W_0] \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

donde  $W_T$  es el peso de los scaffolds a tiempo  $t$ , y  $W_0$  es el peso inicial de los scaffolds en seco.

#### 4.2.4. Cuantificación de la liberación de vancomicina

Los scaffolds de CS cargados con vancomicina se sumergieron en tubos eppendorf de 1,5 mL que contenían 1 mL de tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) a 37 °C en la oscuridad. A distintos periodos de estudio (1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d y 14 d), se recolectó el PBS para cuantificar el contenido en vancomicina, y los eppendorf se rellenaron con PBS nuevo hasta la siguiente medida. La concentración de Van se midió mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Agilent serie 1200, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con detector de matriz de diodos (DAD) y fluorescencia (FLD), equipado con una columna Vydac 218TP C18 (250x4,6 mm, 5  $\mu$ m, Avantor®, Pensilvania, EE. UU.). El análisis se realizó en condiciones isocráticas (0,8 mL/min) con 89% de fosfato de amonio 0,5 M y 11% de acetonitrilo como fase móvil. Antes de realizar las mediciones, se realizó una curva de calibración de Van en PBS midiendo los valores de absorbancia de soluciones madre de Van de 100 a 0,5  $\mu$ g/mL a 282 nm (rango lineal de 12,4 a 0,5  $\mu$ g/mL;  $R^2 > 0,998$ ).

#### 4.2.5. Evaluación de propiedades antimicrobianas

##### 4.2.5.1. Cultivo bacteriano

Las cepas de *S. aureus* (CECT 239) y *S. epidermidis* (CECT 231) se activaron en medio TSB y se incubaron en condiciones aeróbicas a 35 °C durante 24 h. Los cultivos de bacterias se conservaron en Agar Triptona-Soja (TSA, *Tryptic Soy Agar*) a 4 °C durante más de 3 meses. El cultivo de trabajo se preparó diariamente transfiriendo una colonia de TSA a 10 mL de TSB y se incubó durante 24 h a 35 °C.

#### 4.2.5.2. *Método de difusión en agar*

Para evaluar las propiedades antimicrobianas del recubrimiento de CS cargado con Van, se llevaron a cabo experimentos para cuantificar las zonas de inhibición. Primero, se preparó una suspensión de  $5,0 \log_{10}$  unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) para cada microorganismo (*S. epidermidis* y *S. aureus*) en TSB (2X). Seguidamente, se agregaron alícuotas de 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana a placas multipocillos de 6,0 mm de diámetro que contenían agar TSA.

Después de dejarlo secar durante varios minutos, las muestras se pusieron en contacto con los scaffolds de PCL/CS/Van y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. El diámetro de los halos de inhibición se determinó utilizando una regla a las 24 h y 48 h. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### 4.2.6. **Ensayos biológicos**

##### 4.2.6.1. *Aislamiento, purificación, caracterización y cultivo de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea humana adulta (ahMSCs)*

Las ahMSCs multipotentes se aislaron de la médula ósea como se ha descrito anteriormente (para encontrar información adicional relacionada con la metodología aplicada, el aislamiento celular, el cultivo y la expansión de ahMSCs, puede consultar publicaciones anteriores (133, 173)). Brevemente, se aspiró médula ósea de la cresta ilíaca de tres pacientes voluntarios mediante punción directa. Después, el aspirado de médula ósea se transfirió a bolsas que contenían heparina. La fracción de células mononucleares se obtuvo utilizando medios de gradiente de densidad de Ficoll y un sistema SEPAX™ S-100 cerrado y automatizado de lavado de células (Biosafe, Eysines, Suiza). Después de estimar la viabilidad celular con la tinción azul tripán (#T8154; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.), las células se sembraron en placas a una densidad de  $3,75 \times 10^5$  ml en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) que contenían 10 mL de medio de crecimiento basal (GM). El medio de crecimiento utilizado fue el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (#31885-023, Gibco, Bleiswijk, Países Bajos), al que se añadieron un 10% (v/v) de SBF inactivado (#F7524, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) y antibióticos de rutina como penicilina y estreptomina (100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina y 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de estreptomina) (#P4333, Sigma-Aldrich, Saint

Louis, MO, EE. UU.) antes de incubar las células en condiciones estándar de normoxia (21% O<sub>2</sub>), a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Se utilizaron *ahMSCs* en los pases 3-5 (P3-5) para los experimentos *in vitro*.

Todos los ensayos biológicos cumplieron plenamente con la normativa establecida y el protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Ética Institucional de la UCAM-Universidad Católica de Murcia (Autorizado nº CE051904) Comité de Ética de la UCAM (CE nº 052114/05.28.2222).

#### 4.2.6.2. *Perfiles inmunofenotípicos de cultivos ahMSCs*

Las *ahMSCs* aisladas fueron caracterizadas mediante la cuantificación de los marcadores de superficie celular (CD73, CD90, CD105) y hematopoyéticos (CD34, CD45) por citometría de flujo (Beckman Dickinson & Co., Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.; Software Navios) tal y como se ha descrito anteriormente (68, 133, 174). Antes de realizar los ensayos *in vitro*, se marcaron suspensiones unicelulares obtenidas mediante tripsinización del cultivo con anticuerpos conjugados con los fluorocromos: CD73-PE, CD90-APC, CD105-FITC, CD34-APC y CD45-FITC (Human MSC Phenotyping Cocktail, Miltenyi). Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) para verificar la pureza de las poblaciones de *ahMSCs* (datos no mostrados).

#### 4.2.6.3. *Métodos de siembra celular*

Para los ensayos de viabilidad celular, proliferación y diferenciación osteogénica, se sembraron *ahMSCs* en el fondo de placas de 24 pocillos a una densidad de 10x10<sup>3</sup> células cm<sup>-2</sup>, y los scaffolds de PCL/CS/Van se colocaron en insertos de 0,4 µm (Falcon®) para estar en contacto indirecto con el cultivo. Las células sembradas en TCPS (sin materiales) se utilizaron como control positivo. Los medios de cultivo se cambiaron tres veces por semana para todos los experimentos realizados.

### 4.2.7. **Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

#### 4.2.7.1. *Ensayo de citotoxicidad in vitro*

La viabilidad celular de las *ahMSCs* se evaluó utilizando un kit de detección de citotoxicidad LDH (n.º 11644793001, Roche Diagnostics, Roche. Applied Science, Mannheim, Alemania) después de colocar los scaffolds de PCL/CS/Van en contacto

indirecto con las células durante 24 y 72 h. Antes de realizar el ensayo, es importante determinar la concentración celular óptima para la línea celular utilizada, ya que diferentes tipos de células pueden contener diferentes cantidades de LDH. Generalmente, debemos elegir la concentración en la cual la diferencia entre el control negativo y positivo es máxima. Para nuestro cultivo de *ahMSCs*, encontramos que la concentración de células óptima a utilizar para el experimento fue  $3 \times 10^4$  células/pocillo para placas de 24 pocillos (**Figura 34**).

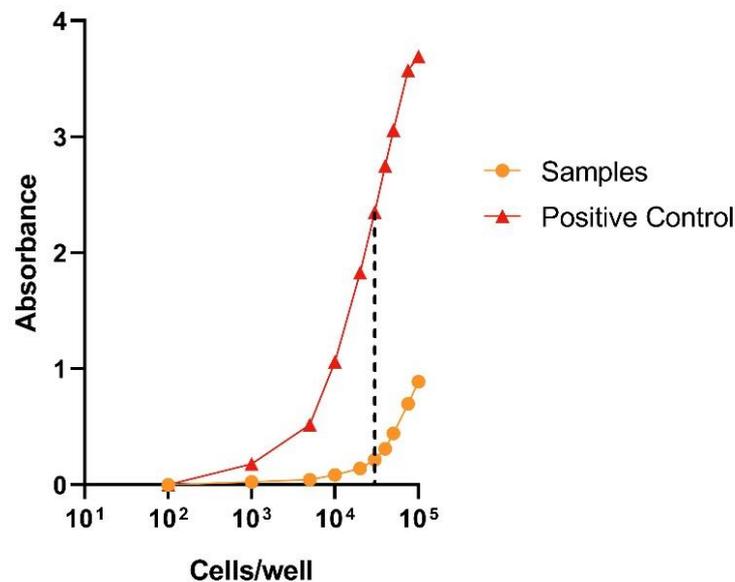


Figura 34. Determinación de la concentración óptima de *ahMSCs*. Las *ahMSCs* se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 100, 1000, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 75000 y 100000 células/pocillo. Se añadió medio de cultivo para determinar la liberación espontánea de LDH (Samples) y medio de cultivo que contenía Triton X-100 al 1% para determinar la liberación máxima de LDH (Positive control).

24 h después de sembrar las *ahMSCs* en las placas de 24 pocillos, el medio de cultivo se reemplazó por un nuevo medio que contenía FBS al 1% para eliminar la liberación de LDH espontánea de las células durante el paso de incubación. Después, los scaffolds de PCL/CS/Van se colocaron en contacto indirecto con las células utilizando insertos de  $0,4 \mu\text{m}$  y se evaluó la actividad LDH a las 24 y 72 h. Las células que crecieron en TCPS (sin material) se usaron como control negativo (liberación espontánea de LDH) y las células cultivadas con el medio que contenía la solución de Triton X-100 al 1 % se usaron como control positivo (liberación máxima

de LDH). A los distintos periodos de estudio se transfirieron alícuotas de 100  $\mu$ L de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano ópticamente transparente, seguido de la adición de 100  $\mu$ L de la mezcla de reacción. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia se leyó directamente en un lector de placas Spectramax iD3 (Molecular Devices, EE. UU.) a 490 nm.

#### 4.2.8. Ensayo de actividad metabólica celular

La actividad metabólica celular de las *ah*MSCs cultivadas en presencia de los scaffolds de PCL/CS cargados con diferentes concentraciones de Van se evaluó utilizando el ensayo AlamarBlue® (#DAL1100, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) en los días 1, 3, 7 y 14 tras de la siembra. Se utilizaron como control células crecieron en TCPS (sin los materiales). Brevemente, a diferentes períodos de estudio, los insertos que contenían scaffolds de PCL/CS/Van se retiraron temporalmente (antes de la etapa de incubación) y se añadió a cada pocillo medio nuevo (1 mL) que contenía reactivo AlamarBlue® al 10 % (v/v). Luego, la placa se incubó en la oscuridad (envuelta con papel de aluminio) a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con 95% de HR durante 4 h. Finalmente, se transfirieron alícuotas de 150  $\mu$ l de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de paredes negras y se midió la fluorescencia en un lector de placas Spectramax iD3 (Molecular Devices, EE. UU.) a longitudes de onda de excitación y emisión de 530 y 590 nm, respectivamente.

#### 4.2.9. Ensayos de diferenciación osteoblástica

##### 4.2.9.1. Actividad fosfatasa alcalina (ALP)

La actividad ALP de las *ah*MSCs se evaluó a los 7 y 14 días después de sembrar las células en contacto indirecto con scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10% Van usando un kit de cuantificación de la fosfatasa alcalina (#SCR004, Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). En cada período de estudio, se despegaron las células y se tomaron alícuotas de  $1,5 \times 10^4$  células (por muestra) siguiendo las recomendaciones del fabricante para tratarlas con 100  $\mu$ L de p-nitrofenilfosfato (p-NPP). Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción catalítica (p-NPP  $\rightarrow$  fosfato + p-nitrofenol) produce un subproducto de color amarillo proporcional a la

cantidad de ALP presente en la reacción. Finalmente, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas Spectramax iD3 (Molecular Devices, EE. UU.).

#### 4.2.9.2. *Ensayo de mineralización in vitro*

La mineralización *in vitro* se evaluó utilizando un kit de ensayo de osteogénesis (#ECM815; Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) 21 días después de sembrar *ah*MSCs en presencia (contacto indirecto) de los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%. Brevemente, las *ah*MSCs se fijaron con formaldehído al 10%, se tiñeron con solución de tinción Rojo de Alizarina y se visualizaron utilizando un microscopio óptico (Axio Vert.A1, ZEISS, Alemania) acoplado a una cámara digital (AxioCam 305 color, ZEISS, Alemania). Finalmente, las muestras se trataron siguiendo el protocolo del fabricante para cuantificar la mineralización de la matriz y se midió la densidad óptica (OD) en un lector de placas Spectramax iD3 (Molecular Devices, EE. UU.) a 405 nm.

#### 4.2.10. Estadística

Todos los datos se representaron como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). La significación estadística se determinó mediante un ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPrism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., CA, EE. UU.) para Windows. La comparación entre grupos se evaluó con la prueba *t*, siendo el nivel de significancia  $p < 0,05$ .

# V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



## V - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado quedan descritos de modo individualizado los **Resultados** obtenidos en los dos estudios, así como la **Discusión** de los mismos.

### 5.1. ESTUDIO SOBRE LAS MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN OSTEoblástica DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS MULTIPOTENTES DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA INDUCIDAS POR UN NOVEDOSO MATERIAL POROSO DE GRADO MÉDICO IMPRESO EN 3D A BASE DE POLICAPROLACTONA Y BETA-FOSFATO TRICÁLCICO

#### 5.1.1. Diseño del estudio

El primer paso del presente estudio fue la fabricación, mediante impresión 3D, de scaffolds porosos compuestos de policaprolactona (PCL) y  $\beta$ -fosfato tricálcico (PCL/ $\beta$ -TCP). Posteriormente, se realizó una caracterización detallada de su estructura y propiedades.

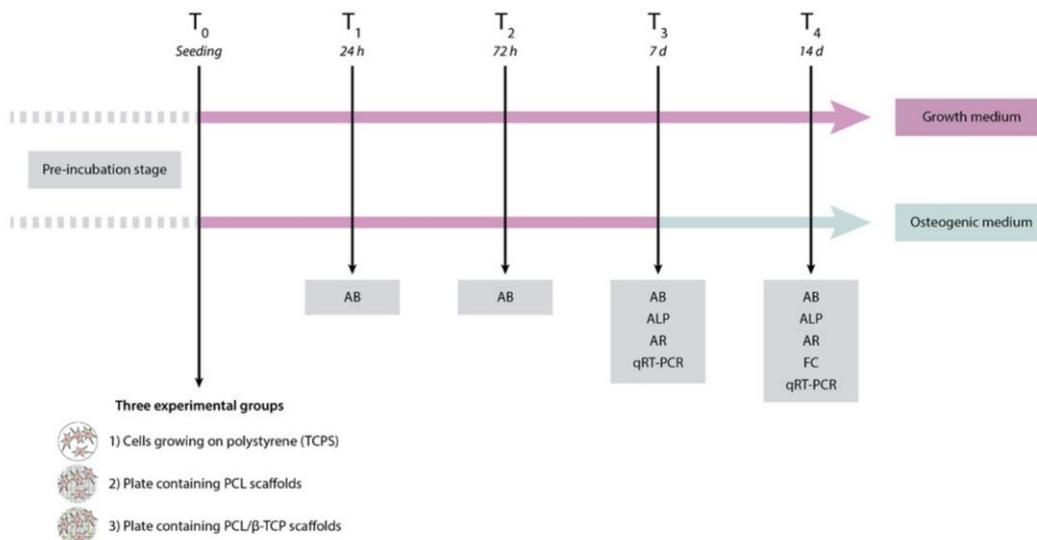


Figura 35. Representación esquemática del diseño del estudio, que incluye la planificación de los experimentos realizados. AB: ensayo AlamarBlue; ALP: fosfatasa alcalina; AR: tinción con Rojo Alizarina; FC: citometría de flujo; qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Se establecieron tres grupos experimentales: (1) Un grupo control de células creciendo sobre poliestireno (TCPS), (2) Células creciendo sobre placas que contienen scaffolds de PCL, y (3) Células creciendo sobre placas que contienen scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP. Por último, se evaluó el comportamiento biológico *in vitro* utilizando un cultivo de *ahMSCs*. Todos los ensayos biológicos se llevaron a cabo de acuerdo con una planificación previamente establecida (**Figura 35**).

### 5.1.2. Composición y caracterización del material

#### 5.1.2.1. Caracterización morfológica y microanálisis de los filamentos compuestos y de los scaffolds impresos en 3D

La morfología y el diámetro de los filamentos nativos de PCL y de los filamentos compuestos de PCL/ $\beta$ -TCP, se examinaron y caracterizaron antes de alimentar el extrusor la bioimpresora 3D. Como puede observarse en las micrografías MEB, los filamentos de PCL nativos muestran una superficie lisa y homogénea, mientras que los filamentos de PCL/ $\beta$ -TCP muestran una superficie microgranulada heterogénea debido a la presencia de micropartículas de  $\beta$ -TCP. Asimismo, el recubrimiento de  $\beta$ -TCP produjo un ligero aumento del diámetro del filamento de 1,77 a 1,93 mm. Además, se realizó un análisis EDX de los filamentos recubiertos para comprobar la presencia de elementos como el fósforo y el calcio, obteniéndose un 33,5% y un 66,5% del peso total, respectivamente.

La **Figura 36A-D** muestra imágenes típicas de microscopía óptica no polarizada de los scaffolds de PCL (**Figura 36A,B**) y PCL/ $\beta$ -TCP (**Figura 36C,D**) impresos en 3D. Estos presentan una forma de disco con un diámetro de 8 mm y una altura de 1,5 mm. Como se observa en las microscopías ampliadas, las fibras impresas muestran una estructura ordenada, adoptando una distribución paralela en cada capa (**Figura 36B,D**). La distancia entre las fibras impresas del scaffold fue de  $1,30 \pm 0,40$  mm en las capas verticales y horizontales, y de  $0,35 \pm 0,03$  mm en las capas diagonales, proporcionando una red de poros interconectados de morfología triangular con una porosidad media de 200  $\mu$ m. También observamos claramente micropartículas de TCP distribuidas aleatoriamente por todo el scaffold de PCL/ $\beta$ -TCP (**Figura 36C,D**). Por último, se realizó el microanálisis por dispersión de energía de rayos X (MEB-EDX) para verificar la presencia de la fracción mineral de TCP.

Según nuestros análisis, obtuvimos una proporción del 32,25% y del 67,75% del peso total de elementos de fósforo y calcio, respectivamente (**Figura 36E,F**).

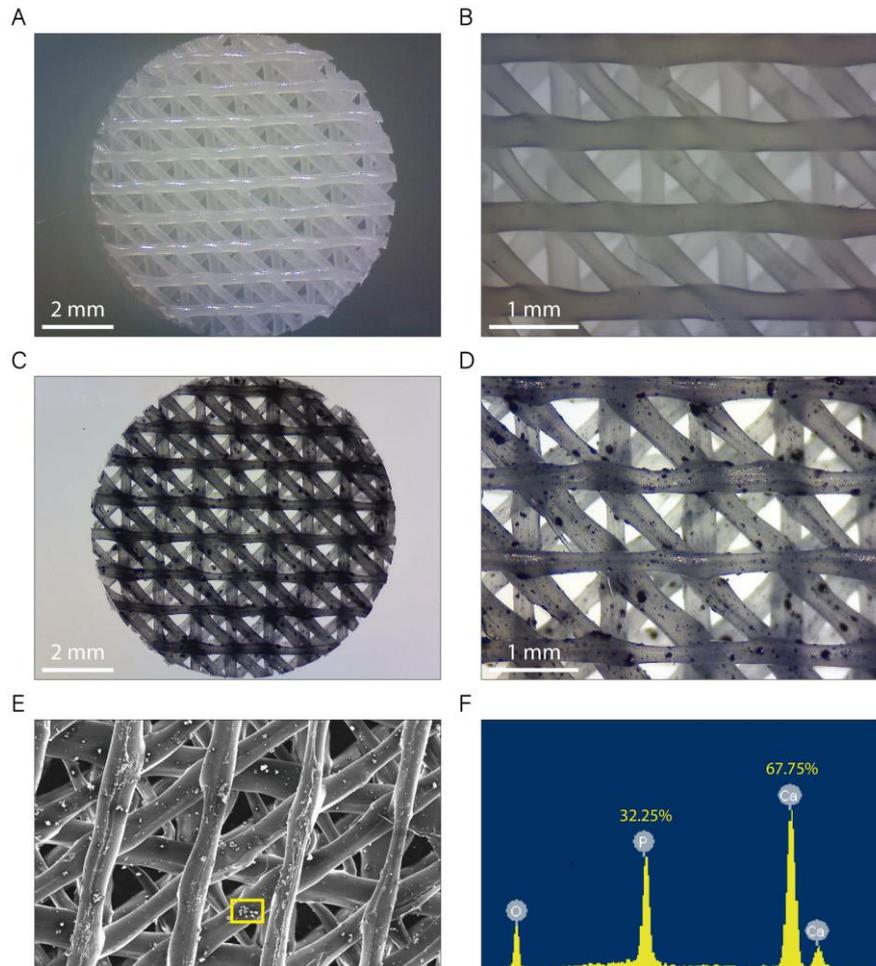


Figura 36. Imágenes de los scaffolds de (A,B) PCL y (C,D) PCL/β-TCP tomadas con un estereomicroscopio a diferentes aumentos. Las micropartículas β-TCP se tiñeron con nigrosina para poder ser contrastadas con mayor claridad. (E) Micrografía adquirida con MEB que muestra una ampliación del scaffold de PCL/β-TCP y (F) su correspondiente espectro EDX. La zona analizada aparece resaltada con un cuadrado amarillo.

### 5.1.3. Caracterización de la estructura porosa mediante μCT

La impresión 3D es una tecnología que ha emergido como una potente herramienta en el campo de la Ingeniería de Tejidos, ya que permite el cultivo de células en 3D dentro de complejas arquitecturas biomiméticas tridimensionales (175). A diferencia de técnicas convencionales como el electrospinning (176), la liofilización

(177), el espumado con gas (178) o la deposición de fibras (179), la impresión 3D permite un mayor control de la geometría interna y externa del scaffold. Parámetros como el tamaño de poro, la conectividad entre los poros y la porosidad total, desempeñan un papel importante en el transporte de fluidos biológicos, oxígeno, nutrientes y células desde el entorno hasta las partes internas del scaffold, promoviendo el crecimiento tisular (77).

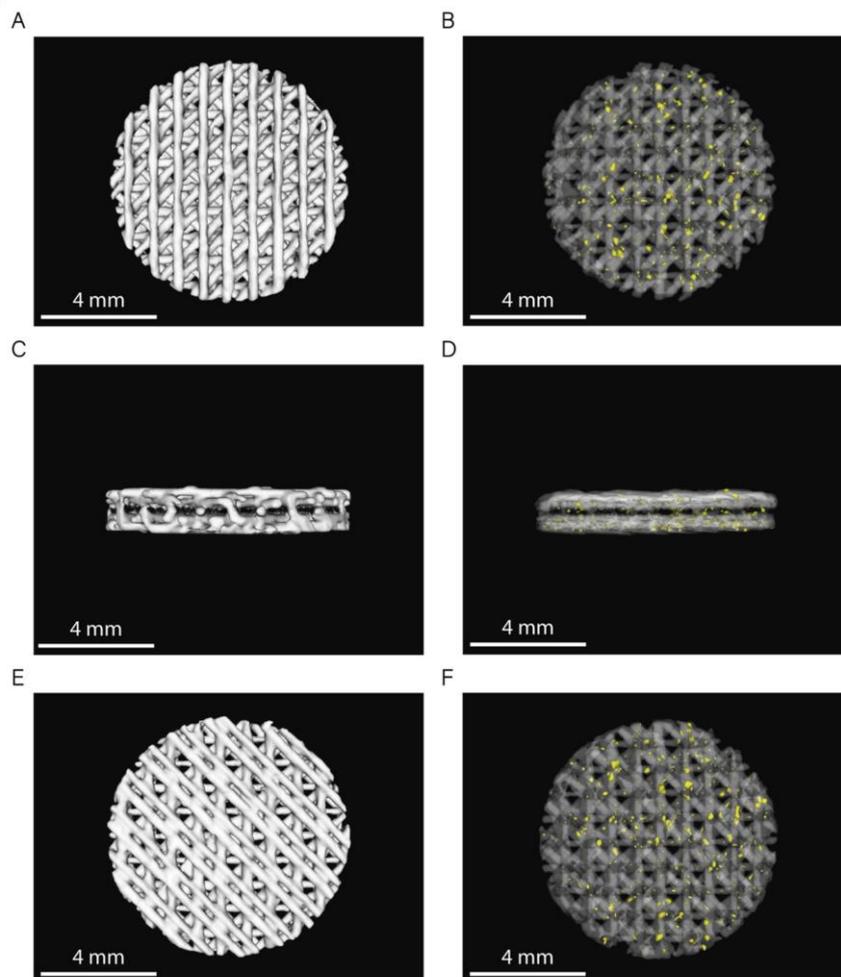


Figura 37. Reconstrucción 3D de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP (vista superior: (A,B); lateral: (C,D); e inferior: (E,F)). En las imágenes (B,D,F), la PCL se muestra con un 80% de transparencia para permitir la observación de las partículas de  $\beta$ -TCP, que se muestran en amarillo.

La reconstrucción 3D de las imágenes provenientes de la microtomografía computarizada de seis scaffolds seleccionados al azar ( $n = 3$  por muestra) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el volumen de los scaffolds de PCL y de PCL/ $\beta$ -TCP (**Figura 37**). Según los datos arrojados por las reconstrucciones 3D, ambos tipos de scaffold tenían un volumen medio ( $V_s$ ) de  $31 \pm 1 \text{ mm}^3$ , lo que se corresponde a una porosidad global de  $0,59 \pm 0,10$  en comparación con el volumen teórico ( $V_T = 75,4 \text{ mm}^3$ ) de un disco de  $8 \times 1,5 \text{ mm}$  (diámetro, altura).

Para obtener scaffolds con porosidad abierta e interconectada, se utilizó un punch para biopsia de 8 mm con el fin homogeneizar las muestras, obteniendo scaffolds sin una capa periférica bien definida. Este detalle técnico permite que los poros periféricos de toda su superficie estén en contacto directo con el medio externo. Además, seleccionamos un patrón de relleno triangular, que da lugar a una red de poros interconectados.

Por último, el renderizado 3D de los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP (**Figura 37B, D, F**) mostró una distribución aleatoria de las micropartículas de  $\beta$ -TCP en todo el volumen del scaffold, como se indica en la sección anterior (**Figura 36D**).

#### 5.1.4. Influencia de la composición del scaffold

##### 5.1.4.1. Adhesión de proteínas: Ensayo con Azul Brillante de Coomassie

La tinción de Coomassie es uno de los ensayos más utilizados para la cuantificación de proteínas. Esto se debe a que es un procedimiento sencillo que proporciona una detección fiable de la presencia de la mayoría de las proteínas. Además, es bien sabido que el contacto de un cuerpo vivo con un material induce la absorción de una monocapa proteica en su superficie, dependiendo de la naturaleza del material, creando una interfaz donde se adsorben otras proteínas y células (180). Esta capa proteica favorece que los receptores de adhesión celular situados en la membrana celular (como las integrinas) puedan reconocer el péptido arginina-glicina-aspartato (RGD), creando puntos de anclaje en la superficie del biomaterial (181). Además, la porosidad general, el tamaño, la distribución de los poros y el tamaño de las partículas son factores que también influyen en el grado de adsorción de las proteínas. Así, la existencia de poros aumenta en gran medida la superficie de los materiales y potencia la adsorción de proteínas. En este contexto, Zhu et al.

(182) demostraron que la cantidad de proteínas totales adsorbidas por la cerámica porosa Ca-P bifásica (BCP) (HA/TCP 1/4 7:3) era superior a la de la BCP densa. Además, una vez que las células se han adherido, comienzan los procesos de síntesis y liberación de las moléculas constituyentes de la MEx como la osteopontina (OPN), el colágeno tipo I (COL1A1) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), entre otros reguladores de la osteogénesis (181, 183). En otras palabras, las proteínas adsorbidas inicialmente en la superficie y procedentes de los fluidos proporcionan un sustrato temporal para la adhesión celular.

En nuestro estudio, el ensayo con Azul Brillante de Coomassie demostró que tanto los scaffolds de PCL como los de PCL/ $\beta$ -TCP eran capaces de absorber proteínas en su superficie (**Figura 38**). Los scaffolds que no se sumergieron en suero bovino fetal (SBF) perdieron su color azulado después de tres lavados con la solución decolorante (**Figura 38(2)**), mientras que los scaffolds sumergidos en SBF durante 30 minutos permanecieron azules después del paso de lavado (**Figura 38(3)**). También cabe destacar que, aparentemente, los scaffolds de PCL presentan un color ligeramente claro en comparación con los de PCL/ $\beta$ -TCP después de la etapa de lavado. Esto último podría deberse a la presencia de micropartículas de  $\beta$ -TCP, que habrían modificado ligeramente la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la PCL, haciéndola más hidrofílica, facilitando así la adhesión de proteínas.

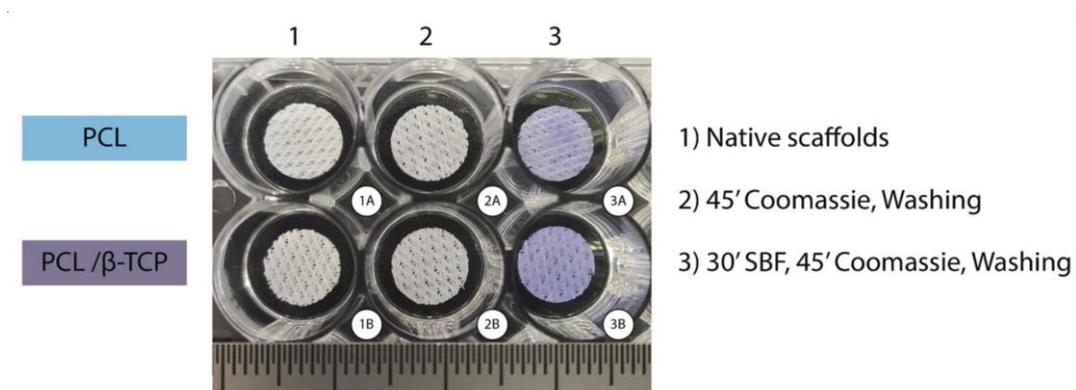


Figura 38. Ensayo con Azul Brillante de Coomassie realizado en los scaffolds de PCL (fila superior) y PCL/ $\beta$ -TCP (fila inferior) tras la no inmersión en SBF (2A,B) y la inmersión en SBF durante 30 minutos (3A,B). Se tomaron como control dos scaffolds sin teñir (1A,B).

#### 5.1.4.2. *Cinética de degradación in vitro*

La cinética de degradación de los polímeros utilizados para la fabricación de composites de grado médico es de vital importancia. De hecho, suele ser deseable que la biodegradación del polímero se produzca de forma proporcional a la regeneración tisular. Normalmente, la degradación se evalúa mediante la inmersión del scaffold en una solución tamponada (como DMEM comercial o soluciones caseras de Fluido Corporal Simulado (SBF, *Simulated Body Fluid*)) durante periodos que van desde varios días hasta meses. La pérdida de peso de un scaffold está directamente relacionada con el proceso de degradación del polímero. En nuestro estudio, sumergimos los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP a 37 °C en una solución de SBF durante 3, 7, 14, 21 y 28 días. En cada periodo de estudio, se calculó el porcentaje de pérdida de peso de los scaffolds utilizando la **Ecuación 2** (184-186). Como era de esperar, en los periodos de tiempo estudiados, la degradación de la PCL fue inferior al 1%, incluso para los expuestos durante 28 días (datos no mostrados). Estos resultados son los que cabría esperar para materiales compuestos similares basados en PCL. De hecho, como informan Sukanya y col. (187), se espera que la PCL presente pérdidas de peso de alrededor del 2% para un periodo prolongado de inmersión en SBF de 90 días. A pesar de que no estudiamos la degradación del  $\beta$ -TCP, cabe mencionar que la literatura respalda que las biocerámicas de  $\beta$ -TCP se degradan relativamente rápido, siendo capaces de promover simultáneamente la formación de hueso nuevo *in vivo* (188). Además, desde un punto de vista fisiológico, el  $\beta$ -TCP se degrada más rápidamente que la hidroxiapatita, ya sea vía disolución química o vía reabsorción por mecanismos celulares fagocíticos (macrófagos u osteoclastos). Esto último afectaría directamente al proceso de remodelación ósea (189).

#### 5.1.5. Viabilidad y proliferación celular

##### 5.1.5.1. *Caracterización de las ahMSCs*

En el presente estudio, se utilizaron células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSCs*) multipotentes para evaluar la biocompatibilidad y la actividad osteogénica de los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP, debido a su importancia clínica y a su gran capacidad de diferenciación osteoblástica (190). Estas células tienen un gran potencial en el campo de la Medicina Regenerativa ya que tienen la capacidad de

diferenciarse *ex vivo* en varias líneas celulares (como osteoblastos) bajo condiciones ambientales favorables (191). Como puede apreciarse en la **Tabla 2**, se observó una expresión positiva de los marcadores característicos de las células madre mesenquimales, concretamente CD73, CD90, CD105 y CD44, en más del 97% de las células aisladas, lo que pone de manifiesto su fenotipo inmaduro y su importante potencial regenerativo, y las hace adecuadas para ensayos *in vitro*, como ya se ha descrito anteriormente en la literatura (192).

Tabla 2. Cuantificación de la expresión de marcadores (CD) de las *ahMSC* en los pases 3-4 mediante citometría de flujo. \* Marcadores hematopoyéticos.

Antígeno	Porcentaje de células positivas
CD73	99.67 ± 0.06
CD90	98.27 ± 0.25
CD105	97.93 ± 0.06
CD44	97.87 ± 0.23
CD14/19/34/45 *	3.10 ± 0.52

#### 5.1.5.2. *Ensayo de citotoxicidad*

La biocompatibilidad es uno de los factores más importantes a tener en cuenta en la fabricación de scaffolds para ingeniería tisular. En este sentido, tanto la PCL como el  $\beta$ -TCP se han considerado biomateriales biocompatibles y seguros (193-195). Los ensayos de citotoxicidad se utilizan ampliamente para medir la pérdida de estructuras y funciones celulares o intracelulares, incluidos los niveles de citotoxicidad letal, proporcionando una indicación inequívoca de su potencial para causar daño celular o tisular. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo AlamarBlue después de sembrar *ahMSCs* sobre los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP (**Figura 39**). Los resultados a las 24 y 72 horas de la siembra demostraron que tanto los scaffolds de PCL como los de PCL/ $\beta$ -TCP no tuvieron efectos citotóxicos sobre las *ahMSCs*. Los valores de viabilidad celular oscilaron entre el 86% y el 114% para los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP a las 24 h, y entre el 88% y el 115% a las 72 h. El porcentaje medio de viabilidad tras la siembra directa en ambos scaffolds fue de 98

$\pm 11$  (PCL) y  $100 \pm 10$  (PCL/ $\beta$ -TCP) a las 24 h, y de  $101 \pm 9$  (PCL) y  $98 \pm 12$  (PCL/ $\beta$ -TCP) a las 72 h. Por último, cabe destacar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

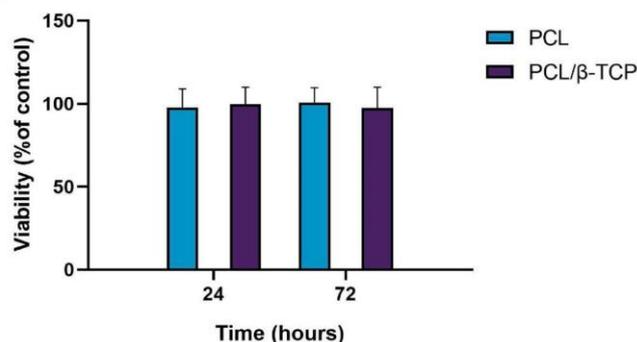


Figura 39. Viabilidad celular mediante el ensayo AlamarBlue tras 24 y 72 h de siembra directa de *ahMSCs* en scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad y se normalizó con respecto a la viabilidad de las células que crecían sobre plástico desnudo (TCP) (control positivo). Las barras representan las desviaciones estándar de la media.

#### 5.1.5.3. Ensayo de actividad metabólica celular

Los scaffolds basados en policaprolactona han sido ampliamente utilizados en los últimos años para aplicaciones de ingeniería tisular debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad estructural y buenas propiedades mecánicas (196). En este sentido, diferentes autores han demostrado que las células son capaces de adherirse y proliferar sobre diferentes estructuras de scaffolds basados en PCL, como fibras electrohiladas (197) y scaffolds impresos en 3D (198). En nuestro trabajo, las propiedades hidrofílicas proporcionadas por el recubrimiento con las micropartículas de  $\beta$ -TCP basadas en un ensayo preliminar de humectabilidad utilizando agua destilada (datos no mostrados en este trabajo) pueden favorecer la adhesión, el crecimiento celular inicial y la diferenciación, ya que tanto las *ahMSCs* como los osteoblastos muestran una mayor afinidad por las superficies hidrofílicas (199). Por este motivo, la humectabilidad de la superficie del scaffold fue uno de los criterios clave que tuvimos en cuenta a la hora de diseñar este estudio.

La actividad metabólica de las *ahMSCs* cultivadas sobre los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP se evaluó mediante el ensayo AlamarBlue en los días 1, 3, 7 y 14 tras la siembra (Figura 40). La viabilidad de las células que crecieron sobre los scaffolds

se normalizó con respecto a un control positivo de células creciendo sobre TCPS. La viabilidad aumentó gradualmente en los diferentes periodos de estudio, lo que indica que las células se adhirieron con éxito a los scaffolds con una buena tasa de proliferación. Cabe destacar que los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP mostraron una viabilidad inferior a la de los scaffolds de PCL nativo en los primeros periodos (días 1 y 3); sin embargo, ambas tasas de viabilidad fueron similares a los 7 y 14 días de estudio, ya fuera con medio de crecimiento (GM) o tras la adición de medio osteogénico (OM) al séptimo día. Como se muestra en el gráfico, no se encontraron diferencias significativas entre los scaffolds en los periodos de tiempo estudiados. Sin embargo, observamos que la adición de OM provocó un ligero aumento de la actividad metabólica con respecto a las células sembradas en los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP con GM a los 14 días.

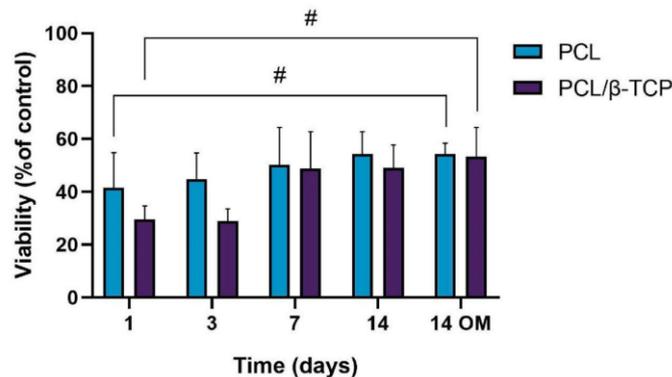


Figura 40. Ensayo de actividad metabólica celular (AlamarBlue) en ahMSCs sembradas sobre los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP a diferentes periodos de estudio. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad y se normalizó con respecto a la viabilidad de células creciendo sobre TCPS (control positivo). Las barras representan las desviaciones estándar con respecto a la media. #Diferencias significativas entre los grupos entre corchetes en los distintos periodos de tiempo.

## 5.1.6. Estudios de diferenciación celular

### 5.1.6.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)

La ALP es una enzima hidrolasa responsable de la desfosforilación de moléculas en condiciones alcalinas ( $\text{pH} > 10$ ). Está presente en todos los tejidos del cuerpo, especialmente en las células óseas, y se considera un indicador temprano de la diferenciación osteoblástica (200). Como se discute ampliamente en la

literatura, un ensayo de ALP permite establecer una relación directa entre la presencia de actividad ALP y el desarrollo normal del hueso en el cuerpo humano (201, 202).

En la **Figura 41** se muestra la actividad ALP de las *ah*MSCs cultivadas en presencia de scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP. De los días 7 a 14 (GM), no se observaron diferencias significativas en la actividad ALP entre los distintos periodos de tiempo o entre los tipos de scaffold. Por el contrario, la actividad ALP aumentó significativamente de los días 7 a 14 con OM. Los valores máximos de actividad ALP se observaron a los 14 días en presencia de medio osteogénico (OM) en células sembradas en presencia de scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP, lo que revela que las micropartículas de  $\beta$ -TCP parecen ejercer un impacto sobre el fenotipo osteoblástico y mejoran las respuestas celulares. De hecho, estudios anteriores han indicado que la adición de gránulos de  $\beta$ -TCP a constructos a base de PCL podría mejorar la capacidad de diferenciación osteoblástica de las MSCs óseas (203). Sin embargo, sigue existiendo cierta controversia con respecto al periodo de tiempo en el cual la actividad ALP muestra su máxima actividad. En este contexto, Chen et al. (204) estudiaron la respuesta osteoblástica de MSCs sobre scaffolds basados en polímeros de ácido hialurónico (HA)/ $\beta$ -TCP. Informaron de un pico máximo bien definido en la actividad ALP al séptimo día, seguido de una disminución, mientras que Jensen et al. (205) informaron de la actividad ALP máxima tras 14 días de estudio en compuestos similares basados en polímeros.

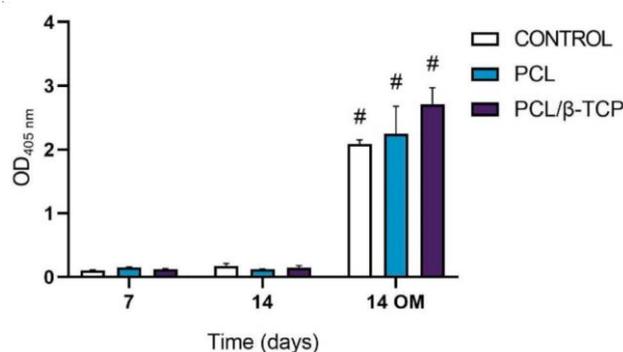


Figura 41. Actividad fosfatasa alcalina de las *ah*MSCs sembradas en presencia de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP tras 7 y 14 días de cultivo. Los resultados se muestran como unidades de densidad óptica (DO). No se encontraron diferencias significativas en los mismos periodos de tiempo entre los grupos. Las barras representan las desviaciones estándar de la media. # Diferencias significativas en el grupo marcado en los distintos periodos de estudio ( $p > 0,05$ ).

### 5.1.6.2. Mineralización *in vitro*. Tinción con Solución Rojo Alizarina (ARS)

La deposición de calcio o la mineralización *in vitro* son marcadores tardíos de diferenciación osteogénica. El calcio depositado puede cuantificarse o teñirse con una Solución Rojo Alizarina (ARS), que muestra una tinción positiva (roja) de los nódulos mineralizados (206). El efecto osteogénico de los scaffolds fabricados se verificó determinando la presencia de depósitos de calcio en el cultivo celular. Para ello, la expresión de la coloración proporcionada por el Rojo Alizarina de *ahMSCs* cultivadas en presencia de scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP se evaluó los días 7 y 14 posteriores a la siembra (**Figura 42**). No se observaron diferencias visuales tras examinar las muestras teñidas a diferentes periodos de tiempo bajo un microscopio de contraste de fases (datos no mostrados). Sin embargo, el examen cuantitativo mostró que la actividad Rojo Alizarina de las *ahMSCs* aumentó significativamente de los días 7 a 14 tanto con el medio de crecimiento (GM) como con el medio osteogénico (OM). La adición de OM promovió un ligero aumento en los controles a los 14 días, pero no se observaron diferencias significativas entre los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP.

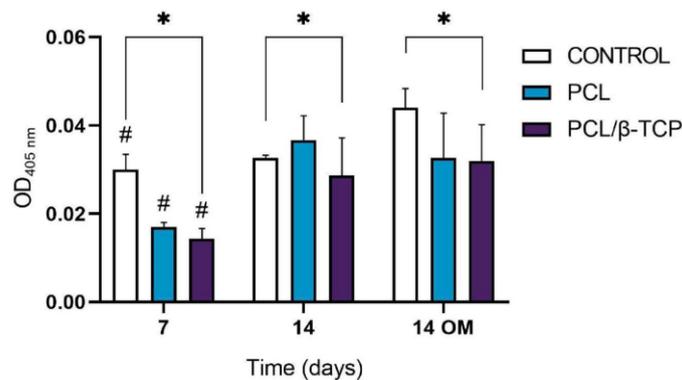


Figura 42. Ensayo de cuantificación de Rojo Alizarina S de *ahMSCs* sembradas en presencia de scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP tras 7 y 14 días de cultivo. Las células sembradas sobre plástico (TCPS) se tomaron como control positivo. Los resultados se muestran como unidades de densidad óptica (DO). # Diferencias significativas entre el grupo marcado en los distintos periodos de tiempo ( $p > 0,05$ ). \* Diferencias significativas entre los grupos marcados en el mismo periodo de estudio.

### 5.1.6.3. Expresión de los marcadores de superficie en las células sembradas en contacto indirecto con los scaffolds: Clusters de Diferenciación (CD)

Hasta la fecha, los marcadores positivos de membrana más comúnmente reportados, relacionados con la superficie de las MSCs humanas adultas son CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD54, y CD166 (207). Los criterios mínimos que debe cumplir una célula para ser considerada como una MSC incluyen (i) Permanecer adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar; (ii) expresar los marcadores CD73, CD90 y CD105; y (iii) tener la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro* (208). En la **Figura 43** se muestra la expresión positiva de los Clusters de Diferenciación CD73, CD90 y CD105 de las *ah*MSCs sembradas en presencia de los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP (contacto indirecto). Los resultados se expresan como el porcentaje de células del cultivo que han perdido cada marcador tras 14 días cultivadas tanto con GM como con OM (añadidos el día 7). Como puede observarse, en el día 14 la expresión de los marcadores CD73 y CD90 disminuyó significativamente tras la adición de OM. Para ambos marcadores, los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP mostraron una mayor pérdida de marcadores que los scaffolds de PCL y los controles. La mayor pérdida de marcadores a lo largo del estudio afectó al CD105, cuya expresión disminuyó significativamente tras la adición de OM. En este caso, los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP mostraron una pérdida de marcadores similar a la de los scaffolds de PCL. Esta disminución de la expresión positiva de los marcadores mesenquimales (CD73, CD90 y CD105) podría ser consecuencia de la activación del mecanismo de diferenciación osteogénica (209).

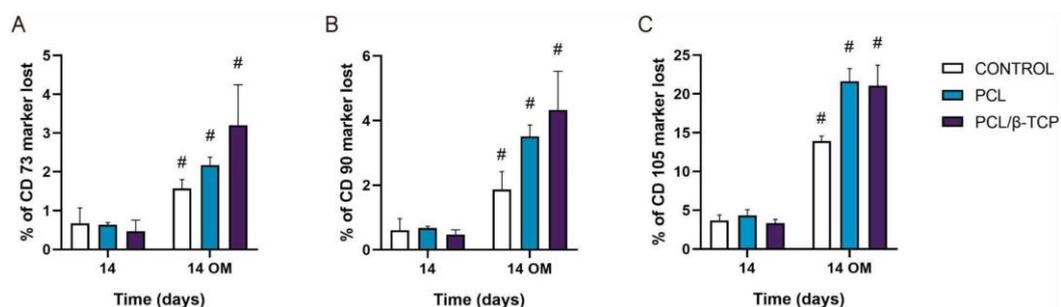


Figura 43. Expresión de los marcadores de membrana (A) CD73, (B) CD90 y (C) CD105 de las células sembradas en contacto indirecto con los scaffolds de PCL y PCL/ $\beta$ -TCP. Los datos representan el porcentaje de pérdida de marcadores a los 14 días con diferentes medios de cultivo (GM y OM). El experimento se realizó por triplicado. # Diferencias significativas entre el grupo marcado con diferentes medios de cultivo.

#### 5.1.6.4. *Expresión génica del proceso de osteogénesis: Ensayo cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)*

La expresión génica de marcadores específicos osteogénicos como ALPL, COL1A1, RUNX2, BGLAP, IBSP, SPARC y SPP1 se cuantificó para determinar la diferenciación osteoblástica *in vitro* mediante qRT-PCR (**Figura 44**). Como puede observarse, el marcador ALPL mostró un aumento de la expresión génica a lo largo del estudio, mostrando valores más elevados tras la adición de medio osteogénico (OM) en el día 7. En este periodo de tiempo, los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP mostraron una mayor expresión génica de ALPL que los scaffolds de PCL. Por su parte, el marcador COL1A1 mostró un pico significativo de expresión génica a los 14 días con medio de crecimiento (MG). Asimismo, la expresión de COL1A1 con OM aumentó para los scaffolds de PCL/ $\beta$ -TCP, sin diferencias significativas en los periodos de tiempo estudiados. Por otro lado, la expresión del gen RUNX2 permanece casi constante desde los días 7 a 14 con GM. Sin embargo, se observó una disminución no despreciable de la expresión génica en el día 14 con OM. La expresión del gen BGLAP también exhibió valores casi constantes a lo largo del estudio. De hecho, no se observaron diferencias significativas entre los distintos periodos de tiempo. Por el contrario, la expresión de IBSP mostró un pico prominente tanto en los scaffolds de PCL como en los de PCL/ $\beta$ -TCP en el día 14 con GM. Sin embargo, tras la adición de OM, se observó una disminución abrupta de la expresión de IBSP. La expresión del gen SPARC mostró valores más altos en presencia de GM, pero una menor expresión del marcador en presencia de OM. Finalmente, el marcador SPP1 mostró una clara tendencia decreciente desde el día 7 al 14 con ambos tipos de medios de cultivo (GM y OM). Cabe mencionar que, en este último caso, los valores de expresión más bajos se observaron el día 14 en presencia de OM.

Estos resultados están en total concordancia con los reportados por Jensen y col. (205), quienes estudiaron la influencia de scaffolds de PCL funcionalizados con ácido hialurónico y  $\beta$ -TCP sobre células madre de la pulpa dental. En este estudio, los marcadores de fosfatasa alcalina, factor de transcripción 2 relacionado con runt, sialoproteína ósea y osteopontina, mostraron tendencias similares a las obtenidas en nuestro trabajo.

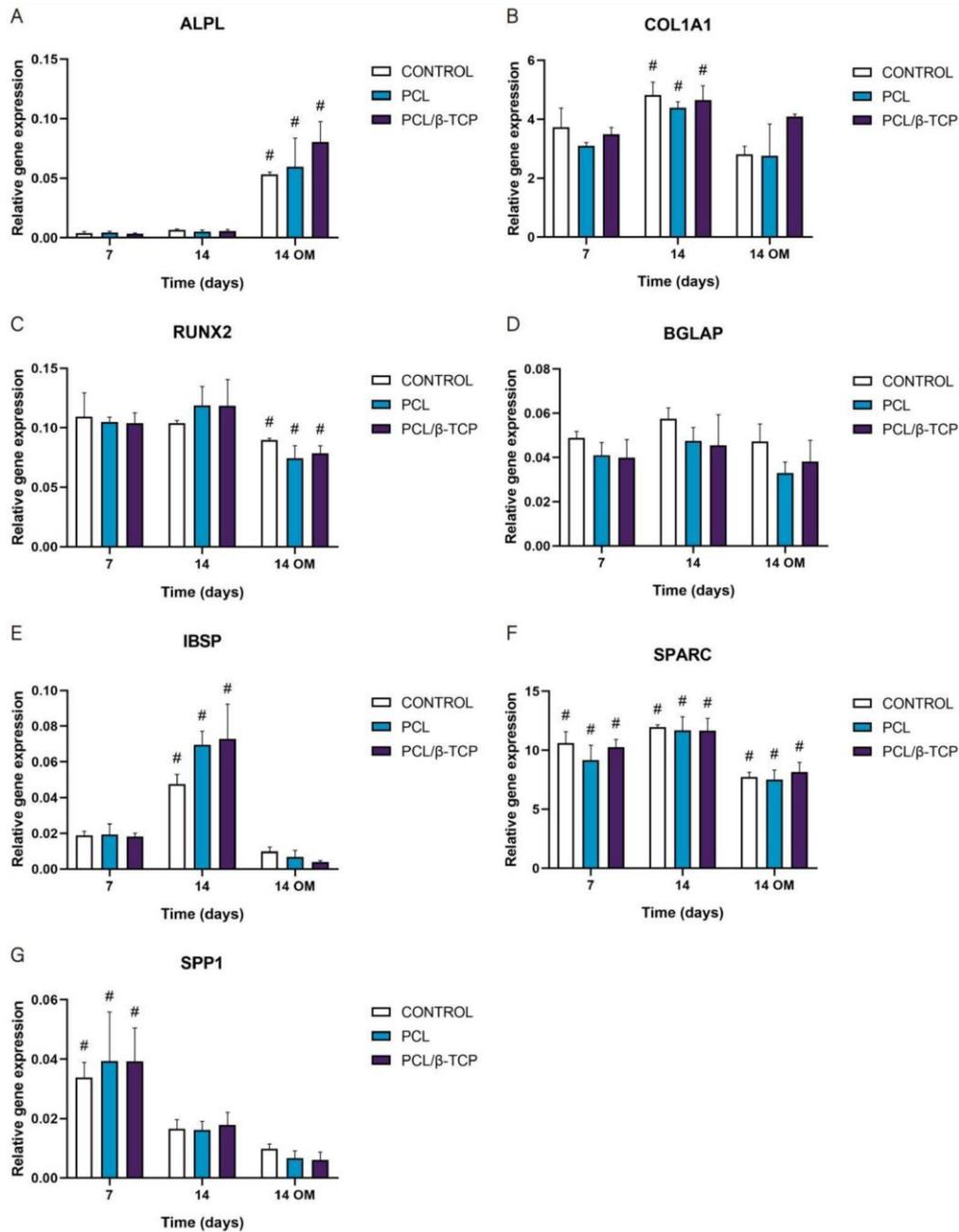


Figura 44. Resultados de la cuantificación de la expresión de los marcadores osteogénicos por qRT-PCR tras 7 y 14 días de cultivo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. # Diferencias significativas entre el grupo marcado en diferentes periodos de estudio ( $p > 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en el mismo periodo de estudio. (A) ALPL, fosfatasa alcalina; (B) COL1A1, colágeno tipo I; (C) RUNX2, factor de transcripción 2 relacionado con el runt; (D) BGLAP, osteocalcina; (E) IBSP, sialoproteína de unión a integrina; (F) SPARC, osteonectina; (G) SPP1, osteopontina.

Resultados similares fueron reportados por Rabadán-Ros y col. (173), quienes evaluaron el impacto de una cerámica porosa monofásica Si-Ca-P en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSC*) en un estudio de 28 días, obteniendo una regulación al alza de la expresión de fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, osteopontina, sialoproteína de unión a integrina y osteonectina, mientras que la expresión del factor de transcripción 2 relacionado con el runt y la osteocalcina permanecieron relativamente inalteradas a lo largo del ensayo. Considerando las moléculas necesarias para que se lleve a cabo la mineralización de la matriz extracelular, Runt se define como un factor de transcripción en *Drosophila*, que tiene afinidad con la subunidad  $\alpha$  del Core Binding Factor Alpha (Cbfa). Los tres genes relacionados llamados Core Binding Factor Alpha 1 (Cbfa1), Cbfa2 y Cbfa3 son capaces de generar diferentes proteínas (210-212). Cbfa1 (Runx2) es el factor de transcripción específico para la osteogénesis (Runx2/AML3) y el determinante para la diferenciación de las células mesenquimales hacia el linaje osteoblástico (213) bajo el estímulo de genes específicos como OC, ALP, BSP, colágeno tipo I (Col 1), y Colagenasa-3 (matriz metaloproteínasa-13 (MMP-13) (214).

En este sentido, la tendencia observada en la expresión de RUNX2 en nuestro estudio y en otros análogos podría atribuirse al hecho de que interviene en múltiples vías de transducción de señales, y su actividad está estrechamente regulada tanto a nivel transcripcional como postranslacional (215).

## 5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *EPIDERMIDIS* DE UN NOVEDOSO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DEGRADABLE IMPRESO EN 3D BASADO EN POLICAPROLACTONA/QUITOSANO/VANCOMICINA. ESTUDIO PRECLÍNICO

### 5.1.7. Caracterización de los scaffolds impresos en 3D

#### 5.1.7.1. Caracterización morfológica de los scaffolds impresos en 3D

El examen microestructural de la morfología de los scaffolds mediante MEB mostró diferencias en la superficie de los scaffolds dependiendo de la concentración de vancomicina (Van) cargada. La **Figura 45** (A1, B1) muestra una micrografía de los scaffolds de PCL nativos antes de ser recubiertos con el hidrogel de CS.

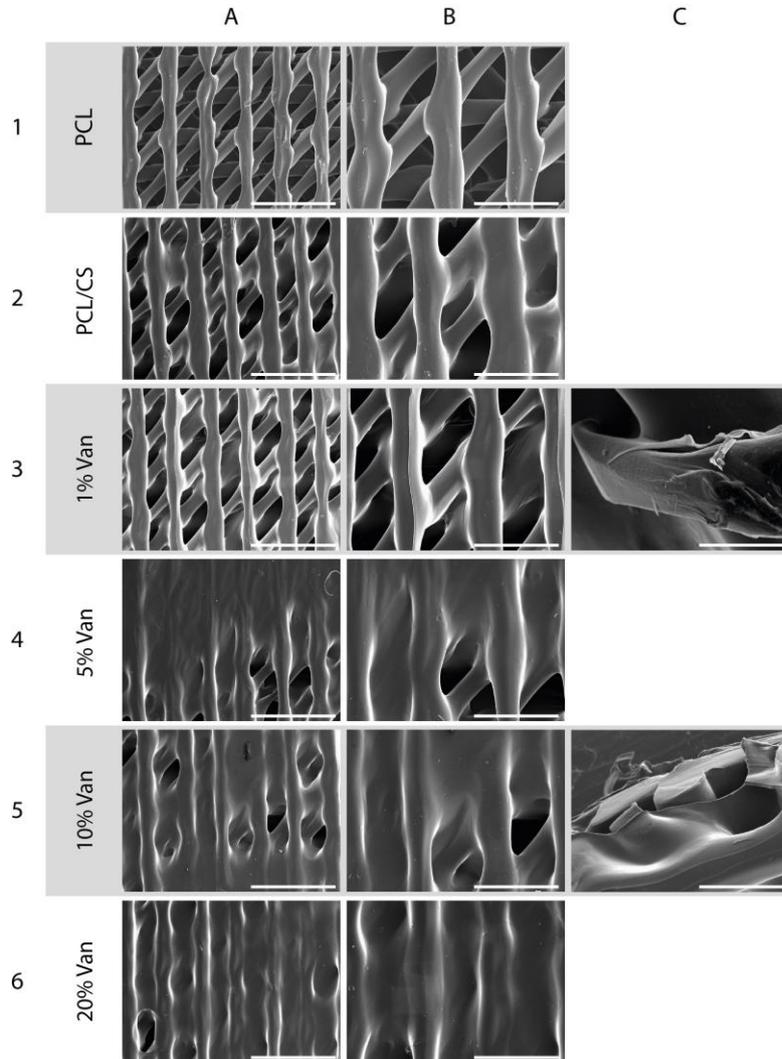


Figura 45. Micrografías MEB de los scaffolds de (1) PCL, (2) PCL/CS y (3, 4, 5, 6) PCL/CS/Van cargados con 1%, 5%, 10% y 20% w/t de vancomicina, respectivamente, a diferentes aumentos: (A1-A6) 22X, barra de escala 2 mm; (B1-B6) 40X, barra de escala 1 mm; (C3) barra de escala de 200  $\mu\text{m}$ ; (C5) barra de escala 700  $\mu\text{m}$ .

Los scaffolds muestran una distribución paralela de las fibras en cada capa impresa, y el patrón de impresión triangular da como resultado scaffolds con porosidad interconectada con un tamaño de poro aproximado de 200  $\mu\text{m}$  y una porosidad general del 59 %, como ya se calculó en un trabajo anterior (150). Como puede observarse en la **Figura 45** (A2, B2), el recubrimiento de CS provoca un engrosamiento discreto de las fibras impresas en 3D, así como en los puntos de contacto

entre las fibras, como resultado de la fina capa de recubrimiento proporcionada por el CS. Sin embargo, este hallazgo se intensifica de manera progresiva y proporcional cuando el hidrogel de quitosano se carga con concentraciones crecientes de vancomicina (A3-A6, B3-B6). Esto último se observa claramente en las micrografías correspondientes a los scaffolds de PCL/CS/20%Van, en las que aparece recubierta casi toda la superficie de los scaffolds de PCL, dificultando la distinción de sus poros (**Figura 45 - A6, B6**).

Las características funcionales de los scaffolds desarrollados en este estudio concuerdan con las premisas establecidas por diferentes autores para el diseño y fabricación de scaffolds 3D que puedan ser utilizados para aplicaciones de Ingeniería de Tejidos (216, 217). De hecho, hemos tenido en cuenta que una matriz tridimensional o scaffold ideal, por lo general, debe tener suficiente porosidad para acomodar células tanto diferenciadas como indiferenciadas de diferentes linajes. Además, se ha combinado con un polímero de origen natural (quitosano) capaz de actuar como *carrier* o para la liberación controlada de fármacos o biomoléculas. Asimismo, estos sistemas de liberación de fármacos (SLF) deben tener una porosidad abierta e interconectada que facilite la difusión de nutrientes, metabolitos y células desde el ambiente externo hasta las partes internas del scaffold (77).

#### 5.1.7.2. *Ensayo de humectabilidad*

La humectabilidad de los scaffolds sólidos de PCL impresos en 3D (**Figura 32B**) se evaluó midiendo el ángulo de contacto  $\theta$  (AC) estático con el agua antes y después de ser tratados con plasma. Como se muestra en la **Figura 46**, el AC estático de los scaffolds de PCL no tratados fue de  $79,93 \pm 2,36^\circ$ , lo que demuestra un comportamiento hidrofóbico del polímero. Sin embargo, para los scaffolds activados por tecnologías de plasma frío, observamos ángulos de contacto de  $55,40 \pm 3,16^\circ$  y  $59,62 \pm 4,22^\circ$  para el Plasma 1 y el Plasma 2, respectivamente, mostrando una disminución de alrededor de  $20^\circ$ , lo que atestigua una disminución de la hidrofobicidad superficial.

Un cambio en el AC es un claro indicador de una modificación química de la superficie del polímero (218). Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Carette y col., quienes estudiaron los efectos del plasma atmosférico sobre la superficie de scaffolds de PLA con el fin de mejorar la adhesión de una solución

de CS al 1%, obteniendo una disminución de aproximadamente  $30^\circ$  en el AC estático (de  $85^\circ$  a  $55^\circ$ ) después de la activación por plasma (167).

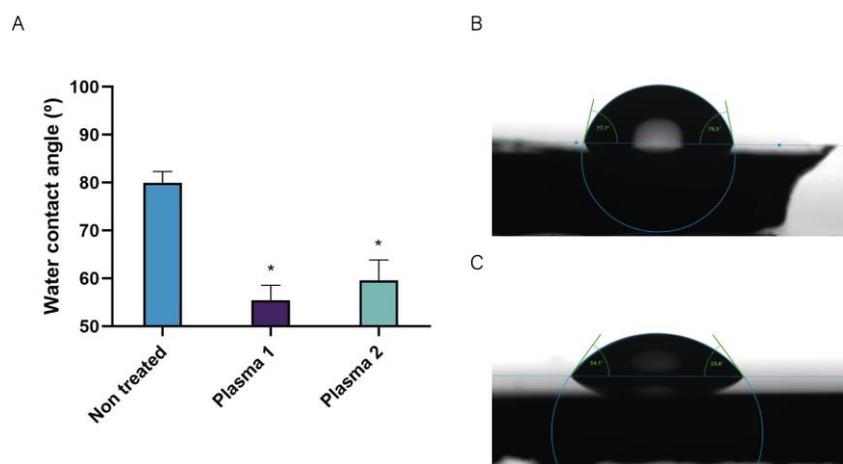


Figura 46. (A) Ángulo de contacto  $\theta$  (AC,) con el agua en scaffolds de PCL sólidos (no porosos) impresos en 3D antes y después de los tratamientos con plasma. (Plasma 1: Dispositivo casero con generador de plasma atmosférico frío alimentado con helio, Plasma 2: Dispositivo casero con generador de plasma piezoeléctrico). Gotas de agua con un volumen de  $1 \mu\text{L}$  depositadas en (B) scaffolds de PCL no tratados y (C) scaffolds de PCL tratados con plasma 1. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \*Diferencias significativas con respecto al ángulo de contacto con el agua del scaffold PCL no tratado.

### 5.1.7.3. Cinética de degradación *in vitro*

El ensayo de degradación *in vitro* realizado con los scaffolds de PCL/CS/Van no arrojó ningún cambio significativo en el peso de los scaffolds ( $W_0 = W_d$ ) tras 28 días de inmersión en medio de cultivo a  $37^\circ\text{C}$ , en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95 % de HR. Es bien sabido que el CS, así como otros polisacáridos, se degrada en el cuerpo mediante despolimerización, oxidación e hidrólisis (enzimática o no enzimática) (219). Lim y col. estudiaron la degradación de perlas porosas de CS con diferentes grados de acetilación (10-50%) en diferentes soluciones enzimáticas (lisozima, NAGasa y una mezcla de ambas) (220). Como principales hallazgos obtuvieron que: (i) las perlas de CS no se degradaron en la solución de NAGasa, (ii) las perlas de CS con alto grado de acetilación (GA) se degradaron más rápido que las que tenían un GA bajo en las soluciones de lisozima y mezcla enzimática, y (iii) Las perlas CS con grados de acetilación de alrededor del 30 al 50 % se degradaron rápidamente a monómeros en la mezcla enzimática en menos de 30 a 60 días.

#### 5.1.7.4. Ensayo de absorción de agua

La absorción de agua del recubrimiento de CS de los scaffolds de PCL/CS y PCL/CS/Van se probó en soluciones de PBS. Como se puede observar en la **Figura 47**, el peso total de los scaffolds aumentó entre  $34,61 \pm 1,13\%$  (PCL/CS) y  $42,14 \pm 1,46\%$  (PCL/CS/20%Van) después de 30 minutos de inmersión en PBS, permaneciendo más o menos estable durante al menos 48 horas. Los valores mínimos de absorción los mostraron los scaffolds de PCL/CS ( $34,61 \pm 1,13\%$ ), mientras que los máximos los alcanzaron los scaffolds de PCL/CS/20%Van ( $45,32 \pm 8,41\%$ ). Esto último puede justificarse por los resultados obtenidos en la sección de caracterización de scaffolds (imágenes MEB), que mostraron que concentraciones crecientes de Van causaban un engrosamiento de las fibras impresas en 3D, teniendo una mayor superficie de quitosano para absorber el PBS.

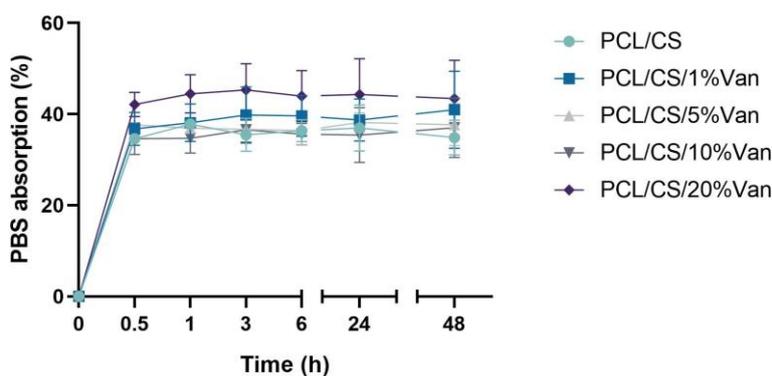


Figura 47. Absorción de PBS en función del tiempo de los scaffolds de PCL/CS y PCL/CS/Van (1, 5, 10 y 20%) en contacto con el medio PBS (pH = 7,4).

#### 5.1.7.5. Cuantificación de la liberación de vancomicina

La liberación de Van de los scaffolds de PCL/CS cargados con 1, 5, 10 y 20% de Van siguió una cinética de liberación de primer orden (**Figura 48**). Se observó una liberación rápida de vancomicina durante la primera hora, seguida de una liberación más lenta durante las horas siguientes para todos los scaffolds estudiados. Como puede observarse en la **Figura 48**, la liberación de Van finaliza a las 24 h y los perfiles de liberación acumulada del fármaco parecen alcanzar una meseta. Estos perfiles de liberación podrían explicarse por la presencia de dos fracciones del

fármaco: (i) fármaco débilmente unido o depositado sobre la superficie del hidrogel de CS, y (ii) fármaco incluido en la red de CS por interacciones químicas. Cabe destacar que los scaffolds cargados con un 10% y un 20% de Van presentaron perfiles de liberación de fármaco similares, lo que indica que probablemente el límite de solubilidad de la Van en PBS se encuentra entre ambas concentraciones.

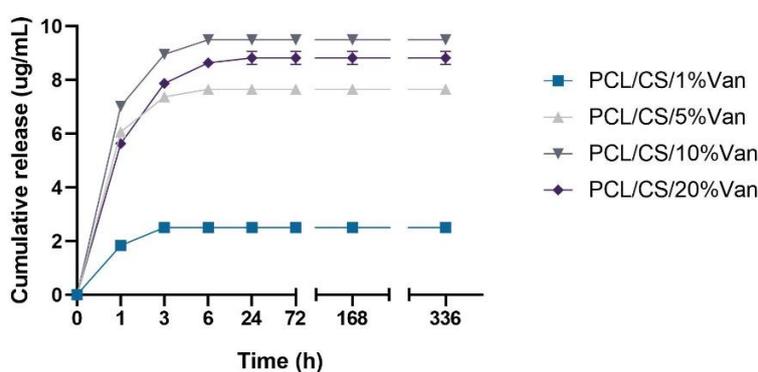


Figura 48. Perfiles de liberación acumulada de vancomicina de scaffolds de PCL/CS cargados con vancomicina al 1, 5, 10 y 20 % durante 14 días (336 h).

Estos perfiles cinéticos están en total concordancia con los resultados obtenidos por López-Iglesias y col., quienes estudiaron la liberación de vancomicina a partir de aerogel porosos de CS obteniendo perfiles similares de liberación del fármaco (221). Por otro lado, Kausar y col. desarrollaron películas de quitosano cargadas con vancomicina (10 y 20% respecto a la masa seca del polímero), obteniendo una disolución del 100% de la vancomicina libre en 7h con más del 50% del fármaco disuelto en la primera hora (222).

#### 5.1.7.6. Evaluación de propiedades antimicrobianas

Los scaffolds de PCL/CS cargados con diferentes concentraciones de vancomicina demostraron tener actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *epidermidis*. Esto se debe a que en todos los casos estudiados se superó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Van (2 µg/mL para *S. aureus* y 2–4 µg/mL para *S. epidermidis*) (223, 224). Los halos de inhibición se midieron a las 24 y 48 h, no observándose diferencias significativas entre ellos. Esto puede deberse a que entre 6 y 24 h no se libera más vancomicina (Figura 49).

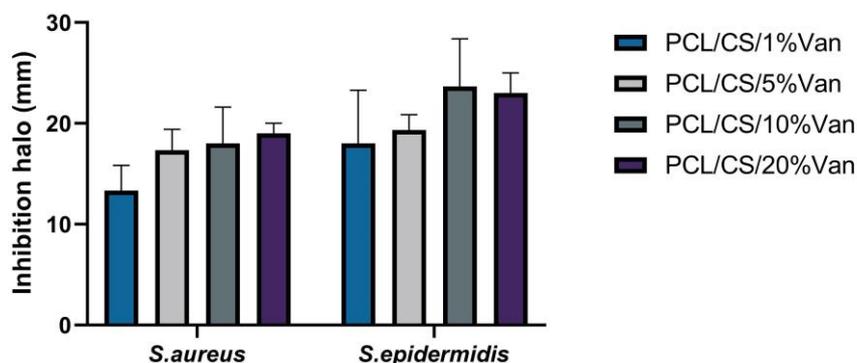


Figura 49. Halos de inhibición (mm) producidos por los scaffolds de PCL/CS/Van cargados con 1, 5, 10 y 20 % p/t de vancomicina frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre los scaffolds para ambos microorganismos estudiados.

Como puede observarse en la **Figura 49**, en todos los casos se muestra un halo de inhibición. En el caso de *S. aureus*, el halo de inhibición más grande lo proporciona el scaffold de PCL/CS/20%Van, aunque cabe destacar que no se apreciaron diferencias significativas con los scaffolds de PCL/CS/10%Van y PCL/CS/5%Van. Esto se debe a que la concentración de vancomicina liberada en el medio por ambos scaffolds es similar entre sí, 9,5 mg/mL y 8,82 mg/mL (**Figura 48**), respectivamente. En el caso de *S. epidermidis*, el halo de inhibición más grande se obtiene para los scaffolds de PCL/CS/10%Van. Si se comparan los scaffolds de PCL/CS/10%Van y PCL/CS/20%Van, no hay diferencias significativas entre ellos porque la concentración de vancomicina en el medio es similar (**Figura 49**).

Si comparamos los halos de inhibición de *S. epidermidis* y *S. aureus*, se observa que aunque ambas bacterias son grampositivas, la vancomicina es más eficaz frente a *S. epidermidis*. Por último, no se observó ningún efecto antimicrobiano por parte del scaffold de PCL/CS, esto puede deberse a la baja solubilidad y la cantidad limitada de cargas positivas del polisacárido al pH ( $7,4 \pm 0,1$ ) en medio de cultivo (225, 226).

## 5.1.8. Ensayos biológicos

### 5.1.8.1. Ensayos de viabilidad y proliferación celular

#### 5.1.8.1.1. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad se evaluó mediante un ensayo de actividad de LDH después de colocar los scaffolds de PCL/CS/Van en contacto indirecto (insertos de  $0,4 \mu\text{m}$ ) con las *ahMSCs* durante 24 y 72 h (**Figura 50**). Los resultados de la liberación de LDH demostraron que ninguno de los scaffolds fabricados resultó ser citotóxico. Sin embargo, los valores máximos de liberación de LDH se alcanzaron con los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/1%Van, mostrando valores de citotoxicidad de  $11,4 \pm 6,4\%$ ,  $8,3 \pm 4,5\%$  y  $10,0 \pm 8,0\%$  a las 24h, y  $11,1 \pm 4,9\%$ ,  $6,9 \pm 5,0\%$  y  $11,7 \pm 6,4\%$  a las 72h, respectivamente, con respecto al control positivo y negativo. Por otro lado, los scaffolds de PCL/CS cargados con 5, 10 y 20% de vancomicina alcanzaron valores de citotoxicidad de  $5,7 \pm 5,5\%$ ,  $6,1 \pm 4,7\%$  y  $4,9 \pm 5,5\%$  a las 24 h, y  $4,4 \pm 3,4\%$ ,  $4,8 \pm 4,0\%$  y  $4,7 \pm 2,9\%$  a las 72 h, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas.

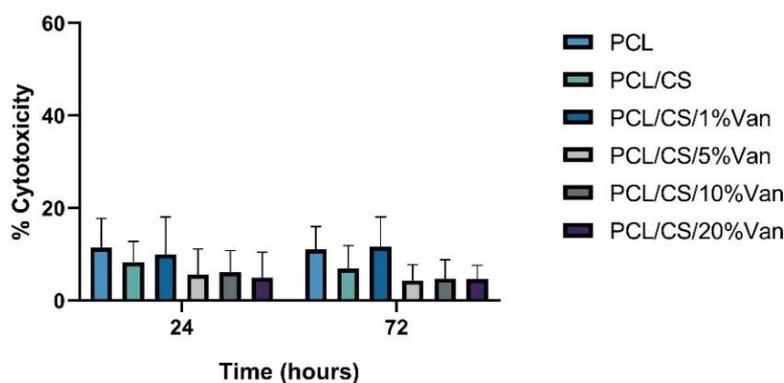


Figura 50. Resultados de citotoxicidad utilizando el ensayo de LDH después de colocar los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/Van en contacto indirecto con *ahMSCs* durante 24 y 72 h. El porcentaje medio de citotoxicidad se calculó y normalizó con respecto a la liberación espontánea de LDH (control negativo) y la liberación máxima de LDH (control positivo). Las barras representan desviaciones estándar de la media. No se observaron diferencias significativas entre las muestras analizadas.

Ambos polímeros utilizados en este estudio (PCL y CS) se han utilizado ampliamente como scaffolds para aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y facilidad de modificación (227). La citocompatibilidad del quitosano ya se ha estudiado y muestra que no tiene un efecto citotóxico agudo (228). Nuestros hallazgos están en línea con publicaciones anteriores que demuestran la buena biocompatibilidad de las estructuras basadas en PCL y CS (164, 229).

#### 5.1.8.2. Ensayo de actividad metabólica celular

La actividad metabólica de las *ahMSCs* creciendo en contacto indirecto con los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/Van se evaluó utilizando el ensayo AlamarBlue® en los días 1, 3, 7 y 14 posteriores a la siembra (**Figura 51**). Como se puede observar en el gráfico, la actividad metabólica de las *ahMSCs* aumentó gradualmente desde el día 1 al 14 para todos los scaffolds estudiados excepto para PCL/CS/20%Van, en el que se observó una ligera disminución después del día 7.

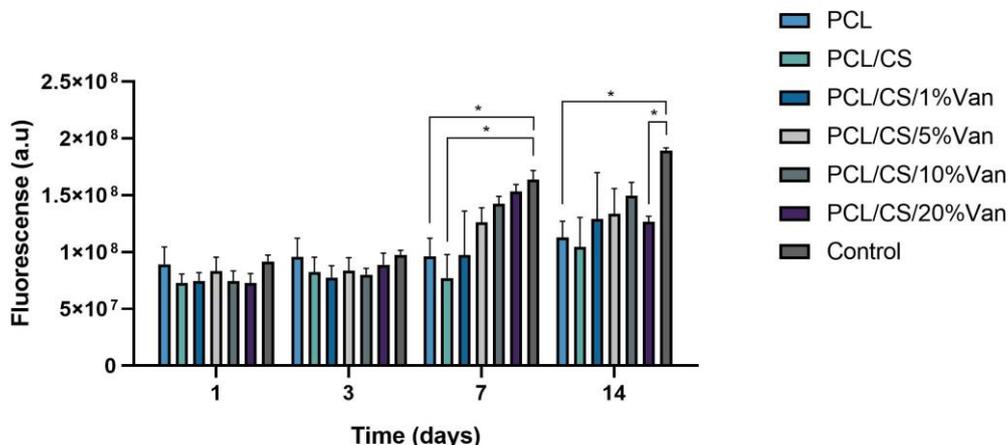


Figura 51. Actividad metabólica celular de las *ahMSCs* utilizando el ensayo AlamarBlue® en diferentes períodos de tiempo. Como control positivo se utilizó la actividad metabólica de células sembradas sobre poliestireno (TCPS). Las barras representan desviaciones estándar de la media. \*Diferencias significativas entre los grupos entre paréntesis en el mismo período de tiempo.

No se observaron diferencias significativas en los primeros períodos (días 1 y 3), donde todos los scaffolds mostraron una tasa de proliferación similar. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre los scaffolds de PCL y PCL/CS

y el control el día 7, y entre la PCL, PCL/CS/20%Van, y el control el día 14. Vale la pena señalar que los scaffolds de PCL/CS/10%Van mostraron la mayor actividad metabólica con respecto a los scaffolds estudiados.

### 5.1.9. Ensayos de diferenciación osteoblástica

La diferenciación osteoblástica se evaluó en los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%Van, ya que este último proporcionó los mejores resultados en los ensayos de citotoxicidad y proliferación, así como en los ensayos microbiológicos, mostrando un efecto bactericida similar al scaffold cargado con Van al 20%.

#### 5.1.9.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)

La actividad fosfatasa alcalina de las *ahMSCs* cultivadas en presencia de los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%Van se muestra en la **Figura 52**. En los días 7 a 14 usando medio de crecimiento (GM), no hubo diferencias significativas. Por otro lado, al utilizar medio osteogénico (MO) la ALP aumentó significativamente a los 14 días alcanzando valores máximos en presencia de PCL/CS/10%Van. De hecho, se observaron diferencias significativas entre el scaffold cargado con vancomicina al 10% y los otros grupos experimentales, lo que indica que los scaffolds de PCL/CS/Van al 10% parecen aumentar la actividad ALP de las células cultivadas.

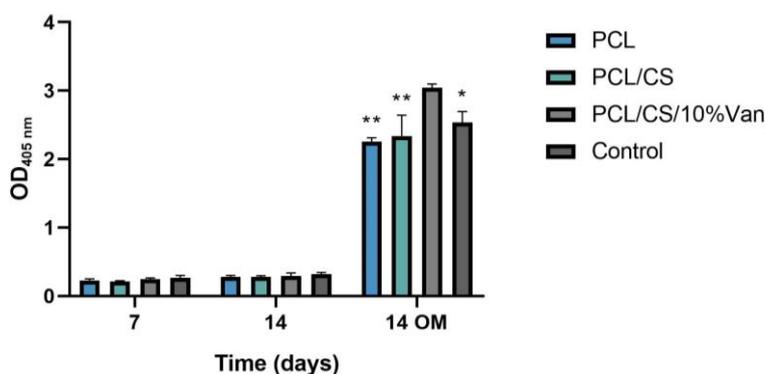


Figura 52. Actividad Fosfatasa Alcalina de las *ahMSCs* después de ser cultivadas durante 7 y 14 días en contacto indirecto con scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%Van usando medio de crecimiento (GM) y medio osteogénico (OM). Se tomaron como control positivo células sembradas en plástico (TCPS). Los resultados se muestran en función de las unidades de densidad óptica (OD<sub>405 nm</sub>). Los datos representan la media  $\pm$  DE. Se encontraron diferencias significativas entre el scaffold de PCL/CS/10%Van y las demás muestras a los 14 días con OM; \* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,0001$ .

Sin embargo, el scaffold de PCL/CS no mostró un aumento en la actividad de ALP, por lo que este hallazgo no puede atribuirse a la presencia del recubrimiento de CS. Otros autores han seguido estrategias novedosas para aumentar la actividad osteogénica del quitosano, consistentes en su combinación con hidroxiapatita (HA) mediante la fabricación de nanofibras de carboximetilquitosano-HA (230) o microesferas compuestas de HA/resveratrol/quitosano (231). Este tipo de compuestos de HA pueden proporcionar las fuentes de calcio necesarias que, en consecuencia, pueden inducir la diferenciación celular, la deposición de matriz extracelular y la mineralización (232).

#### 5.1.9.2. *Ensayo de mineralización in vitro*

La diferenciación osteogénica de las *ahMSCs* se determinó cuantificando la presencia de depósitos de calcio después de colocar los scaffolds de PCL/CS/Van en contacto indirecto con un cultivo de *ahMSCs* durante 21 días. Como se muestra en la **Figura 53A**, no se observaron diferencias visuales importantes entre las muestras, aunque el control parece tener una coloración rojiza ligeramente más alta.

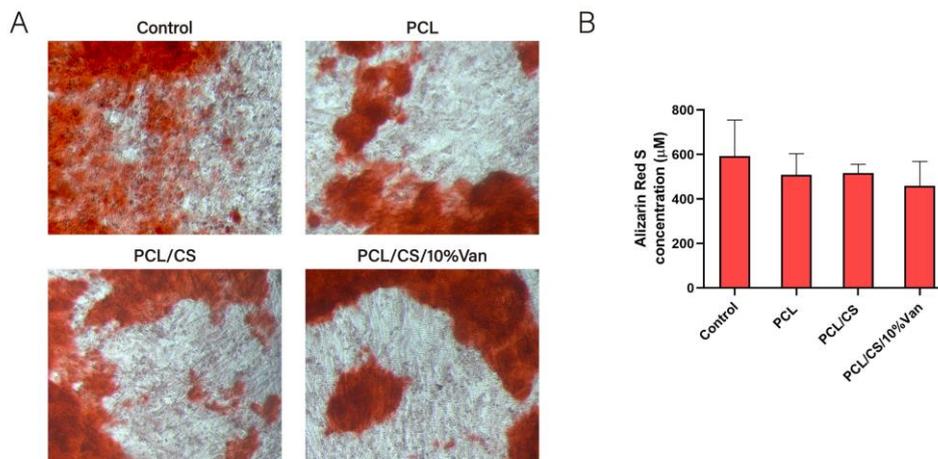


Figura 53. Tinción con Rojo Alizarina de *ahMSCs* después de cultivarlas durante 21 días en presencia de scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10%Van. (A) Tinción con Rojo Alizarina que muestra mineralización (aumento original  $\times 10$ ), (B) Determinación cuantitativa de la tinción con Rojo Alizarina. Se tomaron como control positivo células sembradas en plástico (TCPS). Los datos cuantitativos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

El examen cuantitativo (**Figura 53B**) mostró que la concentración de Rojo Alizarina S era mayor en el control de células que en las células expuestas a los scaffolds, a pesar de no haberse observado diferencias significativas entre las muestras. Esto podría deberse a una fase de adaptación celular a diversos cambios ambientales causados por la presencia de los scaffolds, que podrían haber retrasado o afectado ligeramente a la mineralización.

Como lo demostraron ambos ensayos de diferenciación osteoblástica, los scaffolds de PCL, PCL/CS y PCL/CS/10% Van no afectaron la capacidad de diferenciación de las *ahMCS*, lo que indica que tanto los componentes del scaffold como la dosis de Van utilizada no causaron efectos adversos o alteraciones a nivel celular.



## **VI – CONCLUSIONES**

---



## VI - CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de ambas investigaciones se muestran a continuación de modo individualizado.

### 6.1. CONTEXTUALIZACIÓN

El proyecto de investigación que constituye esta Tesis Doctoral está sustentado en dos estudios preclínicos *in vitro* en los que, tomando de partida una base polimérica de policaprolactona (PCL), se han elaborado dos biocomposites (PCL/ $\beta$ -TCP y PCL/CS/Van) con distintas aplicaciones en el campo de la bioingeniería del tejido conectivo y en concreto del tejido óseo.

En el primer estudio, se ha descrito una estrategia innovadora para la obtención de un biocomposite recurriendo a la combinación de polímeros y cerámicas de fosfato cálcico biocompatibles, como plataforma para el diseño de biomateriales con aplicación en el proceso de regeneración ósea en el contexto de la Medicina Regenerativa. En él, se detalla una novedosa ruta para producir un scaffold híbrido biocompatible a base de PCL con porosidad abierta e interconectada recurriendo a la impresión 3D, incorporando en el biocomposite micropartículas de  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP).

En el segundo estudio, se ha desarrollado un scaffold híbrido biocompatible de PCL/CS/Van impreso en 3D, con el propósito de que actúe como un sistema de liberación de fármacos (SLF) con propiedades antimicrobianas de espectro reducido eficaces frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Además, se presentan dos tratamientos con plasma frío como método vanguardista para mejorar la adhesión de polímeros hidrofóbicos a hidrogeles con un alto contenido en agua. La biocompatibilidad del biocomposite se ha puesto de relieve en los ensayos llevados a cabo para este propósito. Por último, se ha constatado una liberación controlada de vancomicina por parte del SLF fabricado, y su eficacia terapéutica se ha verificado utilizando dos cepas de bacterias Gram positivas anteriormente mencionadas.

## 6.2. CONCLUSIONES RELACIONADAS CON LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 6.2.1. En relación con el biocomposite PCL/ $\beta$ -TCP

1. Se ha conseguido fabricar, mediante impresión 3D, un biocomposite con una base polimérica tridimensional de policaprolactona (PCL) y  $\beta$ -TCP, de tamaño, sección, y porosidad controlada, capaz de proporcionar un soporte y un entorno de crecimiento adecuado para su posterior funcionalización con células.
2. El biocomposite PCL/ $\beta$ -TCP se ha comportado como un material biocompatible y biodegradable capaz de interactuar con los sistemas biológicos de las células cultivadas en su presencia.
3. Estudios llevados a cabo mediante SEM-EDX y  $\mu$ CT corroboran nuestra hipótesis inicial haciendo especial énfasis en el tamaño, la morfología de los poros, y la porosidad global para un biocomposite óptimo con aplicaciones en Ingeniería de Tejidos.
4. El aislamiento, cultivo y caracterización fenotípica de células madre mesenquimales humanas adultas (*ahMSCs*) derivadas de la médula ósea, ha sido un método directo efectivo para corroborar las propiedades de adhesión, proliferación, y diferenciación hacia el linaje osteoblástico de estas células, cultivadas en presencia del biocomposite elaborado.
5. La adhesión de proteínas en la superficie del biocomposite es un hallazgo contrastado. Este hecho es significativo y determinante para que se lleve a cabo la adhesión celular sobre el mismo.
6. La respuesta biológica de las *ahMSCs* originada por las moléculas utilizadas para desarrollar el biocomposite ha quedado debidamente establecida, no advirtiéndose evidencias de citotoxicidad, ni disfunción en su actividad metabólica, potenciando su diferenciación a células de estirpe osteoblástica.
7. En lo que respecta a la diferenciación osteogénica de las *ahMSCs* en presencia del biocomposite, ha quedado puesta en relieve la expresión génica de marcadores específicos osteogénicos como ALPL, COL1A1, RUNX2, BGLAP, SPARC, IBSP, y SPP1.
8. Por último, el biocomposite PCL/ $\beta$ -TCP se ha revelado como una potente herramienta para su aplicación en Ingeniería de Tejidos.

### 6.2.2. En relación con el biocomposite PCL/CS/Van

1. El biocomposite elaborado mediante impresión 3D para actuar como SLF cumple con las expectativas de un sistema poroso eficaz para la adhesión de un hidrogel de quitosano cargado con vancomicina en las diferentes concentraciones estudiadas.
2. La activación por plasma de la superficie del polímero ha sido determinante para revertir el carácter hidrofóbico inicial de la superficie del scaffold, aumentando su hidrofiliidad.
3. En relación con la cinética de liberación de la Van, esta se estabilizó después de 24 h y pareció alcanzar una meseta. Este perfil de liberación podría ser consecuencia de la presencia de dos fracciones diferentes del fármaco: (i) fármaco débilmente unido o depositado en la superficie del hidrogel de CS, y (ii) fármaco incluido en la red de CS mediante interacciones químicas.
4. Es de reseñar que los andamios cargados con 10% y 20% de Van tienen perfiles de liberación de fármaco similares, lo que indica que probablemente el límite de solubilidad del fármaco en PBS se encuentra entre ambas concentraciones.
5. Las propiedades antimicrobianas del biocomposite han quedado demostradas después de evaluar su acción a diferentes concentraciones de Van frente a dos cepas de bacterias Gram + (*S. aureus* y *S. epidermidis*).
6. En lo que concierne a la viabilidad de las *ahMSCs* y al grado de citotoxicidad del biocomposite PCL/CS/Van en sus diferentes concentraciones, las células proliferaron con normalidad al igual que en los controles, lo que acredita que no causaron efectos adversos o alteraciones a nivel celular.
7. La capacidad del biocomposite de inducir la diferenciación osteoblástica ha quedado demostrada en todos los ensayos realizados para este fin (medición de la actividad ALP y mineralización).

## CONCLUSIONS

### 6.3. CONTEXTUALIZATION

The research project that constitutes this Doctoral Thesis is based on two pre-clinical *in vitro* studies, in which, two biocomposites (PLC/ $\beta$ -TCP and PCL/CS/Van) with different applications in the field of connective tissue bioengineering, and specifically in bone tissue, have been elaborated.

The first study describes an innovative strategy for obtaining a biocomposite using a combination of polymers and biocompatible calcium phosphate ceramics as a platform for the design of biomaterials with application in the process of bone regeneration in the context of Regenerative Medicine. It details a novel route to produce a biocompatible PCL-based hybrid scaffold with open and interconnected porosity using 3D printing, incorporating  $\beta$ -Tricalcium Phosphate ( $\beta$ -TCP) micro-particles into the biocomposite.

In the second study, a 3D printed biocompatible PCL/CS/Van hybrid scaffold has been developed to act as a drug delivery system (DDS) with reduced-spectrum antimicrobial properties effective against *S. aureus* and *S. epidermidis*. In addition, two cold plasma treatments are presented as a state-of-the-art method to improve the adhesion of hydrophobic polymers to hydrogels with high water content. The biocompatibility of the biocomposite has been highlighted in tests carried out for this purpose. Finally, a controlled release of vancomycin by the manufactured DDS has been found, and its therapeutic efficacy has been verified using two strains of Gram-positive bacteria mentioned above.

#### 6.4. CONCLUSIONS RELATED TO THE SPECIFIC OBJECTIVES

##### 6.4.1. In relation to the PCL/ $\beta$ -TCP biocomposites

1. Porous hybrid 3D-printed composite scaffolds with open and interconnected porosity based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) microparticles with controlled size and porosity, capable of providing a suitable support and growth environment for its subsequent functionalization with cells, have been fabricated by 3D printing.
2. The PCL/ $\beta$ -TCP biocomposite has behaved as a biocompatible and biodegradable material capable of interacting with the biological systems of the cells cultured in its presence.
3. Studies carried out by SEM-EDX and  $\mu$ CT corroborated our initial hypothesis with special emphasis on size, pore morphology, and overall porosity for an optimal biocomposite with applications in Tissue Engineering.
4. The isolation, culture and phenotypic characterization of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells (*ahMSCs*) has been an effective direct method to corroborate the adhesion, proliferation and differentiation properties towards the osteoblastic lineage of these cells cultured in the presence of the prepared biocomposites.
5. The adhesion of proteins on the surface of the biocomposite is a proven finding. This fact is significant and decisive for cell adhesion to take place on the biocomposite.
6. The biological response of the *ahMSCs* originated by the molecules used to develop the biocomposite has been duly established, with no evidence of cytotoxicity or dysfunction in their metabolic activity, enhancing their differentiation into the osteoblastic lineage.
7. Regarding the osteogenic differentiation of *ahMSCs* cultured in the presence of the biocomposite, the gene expression of osteogenic specific markers such as ALPL, COL1A1, RUNX2, BGLAP, SPARC, IBSP, and SPP1 has been highlighted.
8. Finally, the PCL/ $\beta$ -TCP biocomposites have emerged as a powerful tool for its application in tissue engineering.

#### 6.4.2. In relation to the PCL/CS/Van biocomposite

1. The biocomposite manufactured by 3D printing to act as a DDS meets the expectations of an effective porous system for the adhesion of a vancomycin-loaded chitosan hydrogel in the different concentrations studied.
2. Plasma activation of the polymer surface has been determinant in reversing the initial hydrophobic character of the scaffold surface, increasing its hydrophilicity.
3. Van release kinetics stabilized after 24 h and appeared to reach a plateau. This release profile could be a consequence of the presence of two different drug fractions: (i) drug weakly bound or deposited on the surface of the CS hydrogel, and (ii) drug included in the CS network through chemical interactions.
4. It is noteworthy that the scaffolds loaded with 10% and 20% Van had similar drug release profiles, indicating that the solubility limit of the drug in PBS probably lies between both concentrations.
5. The antimicrobial properties of the biocomposite have been demonstrated after evaluating its action at different Van concentrations against two strains of Gram positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*).
6. Regarding the viability of *ahMSCs* and the degree of cytotoxicity of the PCL/CS/Van biocomposite in its different concentrations, the cells proliferated normally as the controls, which proves that they did not cause any adverse effects or alterations at the cellular level.
7. The ability of the biocomposite to induce osteoblastic differentiation has been demonstrated in all the tests carried out for this purpose (measurement of ALP activity and mineralization).

## **VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



**VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Hoffman CM, Han J, Calvi LM. Impact of aging on bone, marrow and their interactions. *Bone*. 2019;119:1-7.
2. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res*. 2013;1(3):216-48.
3. Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER. *Encyclopedic Handbook of biomaterials and Bioengineering*: Marcel Dekker; 1995.
4. Silver FH. *Biomaterials: Medical Devices and Tissue Engineering*. Hall C, editor 1994.
5. Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009;462(7272):426-32.
6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.
7. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:455-98.
8. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008;61(5):577-87.
9. Buck DW, 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1314-20.
10. Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect*. 1987;36:49-69.
11. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am*. 1984;15(4):597-612.
12. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S35-42.

13. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* 2013;2:447.
14. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-19.
15. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658-90.
16. Grabowski P. Physiology of bone. *Endocr Dev.* 2009;16:32-48.
17. Lin FH, Chang JB, Brigman BE. Role of mitogen-activated protein kinase in osteoblast differentiation. *J Orthop Res.* 2011;29(2):204-10.
18. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone.* 2015;75:144-50.
19. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:281-90.
20. Ansari N, Sims NA. The Cells of Bone and Their Interactions. *Handb Exp Pharmacol.* 2020;262:1-25.
21. Tsourdi E, Jahn K, Rauner M, Busse B, Bonewald LF. Physiological and pathological osteocytic osteolysis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2018;18(3):292-303.
22. Sly WS, Whyte MP, Sundaram V, Tashian RE, Hewett-Emmett D, Guibaud P, et al. Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N Engl J Med.* 1985;313(3):139-45.
23. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989;245(4920):855-7.
24. Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod.* 1998;25(2):101-7.
25. Zaidi M. "Calcium receptors" on eukaryotic cells with special reference to the osteoclast. *Biosci Rep.* 1990;10(6):493-507.
26. Wu M, Chen G, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4:16009.

27. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell*. 1998;9(7):1903-18.
28. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017;26(6).
29. Lind M, Deleuran B, Thestrup - Pedersen K, SØBalle K, Eriksen EF, BÜNger C. Chemotaxis of human osteoblasts. *Apmis*. 2009;103(1-6):140-6.
30. Ott SM. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference? *Am J Nephrol*. 2018;47(6):373-5.
31. Kavanagh N, Ryan EJ, Widaa A, Sexton G, Fennell J, O'Rourke S, et al. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(2).
32. Roderick MR, Sen ES, Ramanan AV. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis in children and adults: current understanding and areas for development. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(1):41-8.
33. Urish KL, Cassat JE. Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery. *Infect Immun*. 2020;88(7).
34. Singh A, Bierrum W, Wormald J, Eastwood DM. Non-operative versus operative management of open fractures in the paediatric population: A systematic review and meta-analysis of the adverse outcomes. *Injury*. 2020;51(7):1477-88.
35. Thakolkaran N, Shetty AK. Acute Hematogenous Osteomyelitis in Children. *Ochsner J*. 2019;19(2):116-22.
36. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, et al. Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". *Bone Res*. 2019;7:20.
37. Pincher B, Fenton C, Jeyapalan R, Barlow G, Sharma HK. A systematic review of the single-stage treatment of chronic osteomyelitis. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):393.
38. Nandi SK, Bandyopadhyay S, Das P, Samanta I, Mukherjee P, Roy S, et al. Understanding osteomyelitis and its treatment through local drug delivery system. *Biotechnol Adv*. 2016;34(8):1305-17.

39. Mahmoudian M, Ganji F. Vancomycin-loaded HPMC microparticles embedded within injectable thermosensitive chitosan hydrogels. *Prog Biomater.* 2017;6(1-2):49-56.
40. Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials.* 2016;81:58-71.
41. Zeng Y, Hoque J, Varghese S. Biomaterial-assisted local and systemic delivery of bioactive agents for bone repair. *Acta Biomater.* 2019;93:152-68.
42. Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA, Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999;1:19-46.
43. Kwong FN, Harris MB. Recent developments in the biology of fracture repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16(11):619-25.
44. Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The Biology of Bone Grafting. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* 2005;13(1):77-86.
45. McKee MD. Management of segmental bony defects: the role of osteoconductive orthobiologics. *J Am Acad Orthop Surg.* 2006;14(10 Spec No.):S163-7.
46. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893-9.
47. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis.* 2012;8(4):114-24.
48. Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, et al. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5(6):1991-2001.
49. Feng YF, Wang L, Li X, Ma ZS, Zhang Y, Zhang ZY, et al. Influence of architecture of beta-tricalcium phosphate scaffolds on biological performance in repairing segmental bone defects. *PLoS One.* 2012;7(11):e49955.
50. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6.

51. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of Tissue Engineering. 4th ed: Academic Press; 2014.
52. Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2009;1(2):226-36.
53. Rustad KC, Sorkin M, Levi B, Longaker MT, Gurtner GC. Strategies for organ level tissue engineering. Organogenesis. 2010;6(3):151-7.
54. Lizarbe MA. Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. RevRAcadCiencExactFísNat 2007;101:227-49.
55. De Aza PN, De Aza AH, De Aza S. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. 2005(44):135-45.
56. Vallet-Regí M, González-Calbet JM. Progress in Solid State Chemistry. 2004;32:1-31.
57. Huang H, Jiang C, Feng Z, Jiang X. Comparing the process of creeping substitution between allograft bone and local bone grafting in lumbar interbody fusion. Eur Spine J. 2014;23(10):2068-74.
58. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. Rev invest clín. 2006;58.
59. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. Bone. 1990;11(3):181-8.
60. Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. J Exp Med. 2002;195(12):1549-63.
61. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec. 2001;264(1):51-62.
62. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002;13(12):4279-95.

63. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86(10):1099-100.
64. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007;7:11.
65. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1522-32.
66. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(12):1745-57.
67. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):341-7.
68. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
69. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:131-53.
70. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteopontin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1999;140(9):4367-70.
71. Shi D. *Biomaterials and tissue engineering*. Springer, editor2004.
72. Feng Y, Zhu S, Mei D, Li J, Zhang J, Yang S, et al. Application of 3D Printing Technology in Bone Tissue Engineering: A Review. *Curr Drug Deliv*. 2021;18(7):847-61.
73. Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol*. 2004;22(12):643-52.

74. Visconti RP, Kasyanov V, Gentile C, Zhang J, Markwald RR, Mironov V. Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(3):409-20.
75. Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, Hennink WE, Verbout AJ, Dhert WJ. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng.* 2007;13(8):1905-25.
76. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2003;21(4):157-61.
77. Atala A, Yoo JJ. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation* 2015.
78. Grigoryan B, Sazer DW, Avila A, Albritton JL, Padhye A, Ta AH, et al. Development, characterization, and applications of multi-material stereolithography bioprinting. *Sci Rep.* 2021;11(1):3171.
79. Marro A, Bandukwala T, Mak W. Three-Dimensional Printing and Medical Imaging: A Review of the Methods and Applications. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2016;45(1):2-9.
80. Pham DL, Xu C, Prince JL. Current methods in medical image segmentation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000;2:315-37.
81. Mantri M, Taran S, Sunder G. DICOM Integration Libraries for Medical Image Interoperability: A Technical Review. *IEEE Rev Biomed Eng.* 2022;15:247-59.
82. Mazonakis M, Damilakis J. Computed tomography: What and how does it measure? *Eur J Radiol.* 2016;85(8):1499-504.
83. Silva IM, Freitas DQ, Ambrosano GM, Boscolo FN, Almeida SM. Bone density: comparative evaluation of Hounsfield units in multislice and cone-beam computed tomography. *Braz Oral Res.* 2012;26(6):550-6.
84. Nackaerts O, Maes F, Yan H, Couto Souza P, Pauwels R, Jacobs R. Analysis of intensity variability in multislice and cone beam computed tomography. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(8):873-9.

85. Reeves TE, Mah P, McDavid WD. Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam CT: a clinical application. *Dentomaxillofac Radiol.* 2012;41(6):500-8.
86. Williams D. The continuing evolution of biomaterials. *Biomaterials.* 2011;32(1):1-2.
87. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009;30(30):5897-909.
88. Rodrigues MT, Gonçalves AI, Babo PS, Gomez-Florit M, Reis RL, Gomes ME. Bioinspired materials and tissue engineering approaches applied to the regeneration of musculoskeletal tissues. *Engineering Strategies for Regenerative Medicine* 2020. p. 73-105.
89. Diaz-Arca A, Ros-Tarraga P, Tome MJM, De Aza AH, Meseguer-Olmo L, Mazon P, et al. Micro-/Nano-Structured Ceramic Scaffolds That Mimic Natural Cancellous Bone. *Materials (Basel).* 2021;14(6).
90. Li X, Wang L, Fan Y, Feng Q, Cui FZ, Watari F. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(8):2424-35.
91. Baino F, Novajra G, Vitale-Brovarone C. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:202.
92. Ribas RG, Schatkoski VM, Montanheiro TLdA, de Menezes BRC, Stegemann C, Leite DMG, et al. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceramics International.* 2019;45(17):21051-61.
93. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.* 1996;17(2):137-46.
94. Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials.* 2005;26(18):3873-9.
95. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludag H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2018;80:1-30.

96. Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Advances*. 2019;9(45):26252-62.
97. Bruyas A, Lou F, Stahl AM, Gardner M, Maloney W, Goodman S, et al. Systematic characterization of 3D-printed PCL/beta-TCP scaffolds for biomedical devices and bone tissue engineering: influence of composition and porosity. *J Mater Res*. 2018;33(14):1948-59.
98. López-Álvarez M, Rodríguez-Valencia C, Serra J, González P. Bio-inspired Ceramics: Promising Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Procedia Engineering*. 2013;59:51-8.
99. Lugo GJ, Mazón P, De Aza PN. Phase transitions in single phase Si–Ca–P-based ceramic under thermal treatment. *Journal of the European Ceramic Society*. 2015;35(13):3693-700.
100. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*. 2010;35(4):403-40.
101. Hild N, Schneider OD, Mohn D, Luechinger NA, Koehler FM, Hofmann S, et al. Two-layer membranes of calcium phosphate/collagen/PLGA nanofibres: in vitro biomineralisation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale*. 2011;3(2):401-9.
102. Shi C, Yuan Z, Han F, Zhu C, Li B. Polymeric biomaterials for bone regeneration. *Annals of Joint*. 2016;1:27-.
103. Carrodegua RG, De Aza S. alpha-Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater*. 2011;7(10):3536-46.
104. Kim HW, Kim HE, Knowles JC. Production and Potential of Bioactive Glass Nanofibers as a Next-Generation Biomaterial. *Advanced Functional Materials*. 2006;16(12):1529-35.
105. Xie J, Blough ER, Wang CH. Submicron bioactive glass tubes for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2012;8(2):811-9.
106. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(12):2077-82.

107. Lee S, Choi D, Shim JH, Nam W. Efficacy of three-dimensionally printed polycaprolactone/beta tricalcium phosphate scaffold on mandibular reconstruction. *Sci Rep.* 2020;10(1):4979.
108. Lee JS, Park TH, Ryu JY, Kim DK, Oh EJ, Kim HM, et al. Osteogenesis of 3D-Printed PCL/TCP/bdECM Scaffold Using Adipose-Derived Stem Cells Aggregates; An Experimental Study in the Canine Mandible. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
109. Lin HR, Yeh YJ. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(1):52-65.
110. Turco G, Marsich E, Bellomo F, Semeraro S, Donati I, Brun F, et al. Alginate/Hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: a trabecular structure with high and isotropic connectivity. *Biomacromolecules.* 2009;10(6):1575-83.
111. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Ramakrishna S. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomaterials.* 2012;33(3):846-55.
112. Ruhe PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:75-81.
113. Meseguer-Olmo L, Bernabeu-Esclapez A, Ros-Martinez E, Sanchez-Salcedo S, Padilla S, Martin AI, et al. In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system. *Acta Biomater.* 2008;4(4):1104-13.
114. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002(395):81-98.
115. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000;21(23):2347-59.
116. Wang Q, Ye W, Ma Z, Xie W, Zhong L, Wang Y, et al. 3D printed PCL/beta-TCP cross-scale scaffold with high-precision fiber for providing cell

- growth and forming bones in the pores. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;127:112197.
117. Kumar P, Dehiya BS, Sindhu A. Bioceramics for Hard Tissue Engineering Applications: A Review. *International Journal of Applied Engineering Research*. 2018; 13:2744-52.
  118. Urist MR, Lietze A, Dawson E. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*. 1984(187):277-80.
  119. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release*. 2006;113(2):102-10.
  120. Li X, Xie J, Yuan X, Xia Y. Coating electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Langmuir*. 2008;24(24):14145-50.
  121. Liu W, Yeh YC, Lipner J, Xie J, Sung HW, Thomopoulos S, et al. Enhancing the stiffness of electrospun nanofiber scaffolds with a controlled surface coating and mineralization. *Langmuir*. 2011;27(15):9088-93.
  122. Bae EB, Park KH, Shim JH, Chung HY, Choi JW, Lee JJ, et al. Efficacy of rhBMP-2 Loaded PCL/beta-TCP/bdECM Scaffold Fabricated by 3D Printing Technology on Bone Regeneration. *Biomed Res Int*. 2018;2018:2876135.
  123. Perez RA, Kim HW, Ginebra MP. Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements. *J Tissue Eng*. 2012;3(1):2041731412439555.
  124. Ruoslahti E. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 1984;3(1):43-51.
  125. Bachman H, Nicosia J, Dysart M, Barker TH. Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(8):501-11.
  126. Pirraco RP, Marques AP, Reis RL. Cell interactions in bone tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):93-102.
  127. Reichert JC, Wullschleger ME, Cipitria A, Lienau J, Cheng TK, Schutz MA, et al. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *Int Orthop*. 2011;35(8):1229-36.

128. Shin YM, Park J-S, Jeong SI, An S-J, Gwon H-J, Lim Y-M, et al. Promotion of human mesenchymal stem cell differentiation on bioresorbable polycaprolactone/biphasic calcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2014;19(2):341-9.
129. Park SH, Park SA, Kang YG, Shin JW, Park YS, Gu SR, et al. PCL/beta-TCP Composite Scaffolds Exhibit Positive Osteogenic Differentiation with Mechanical Stimulation. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(4):349-58.
130. Yang DH, Heo GM, Park HJ, Oh HK, Kook MS. Comparative Effectiveness of Surface Functionalized Poly-epsilon-Caprolactone Scaffold and beta-TCP Mixed PCL Scaffold for Bone Regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(9):5349-55.
131. [ISO] IOfS. Implants for surgery – In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. 2014;(ISO/FDIS Standard No. 23317).
132. Cudemos E, Izquier A, Medina-Martínez MS, Gómez-López VM. Effects of shading and growth phase on the microbial inactivation by pulsed light. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013;31(No. 2):189-93.
133. De Aza PN, Garcia-Bernal D, Cragolini F, Velasquez P, Meseguer-Olmo L. The effects of Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ceramics on adult human mesenchymal stem cell viability, adhesion, proliferation, differentiation and function. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(7):4009-20.
134. Meseguer-Olmo L, Aznar-Cervantes S, Mazon P, De Aza PN. "In vitro" behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> system. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(12):3003-14.
135. Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Eng*. 2004;10(1-2):81-92.
136. Wassif RK, Elkayal M, Shamma RN, Elkheshen SA. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis. *Drug Deliv*. 2021;28(1):2392-414.

137. Walter G, Kemmerer M, Kappler C, Hoffmann R. Treatment algorithms for chronic osteomyelitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(14):257-64.
138. Seebach E, Kubatzky KF. Chronic Implant-Related Bone Infections-Can Immune Modulation be a Therapeutic Strategy? *Front Immunol.* 2019;10:1724.
139. Walenkamp GH, Vree TB, van Rens TJ. Gentamicin-PMMA beads. Pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clin Orthop Relat Res.* 1986(205):171-83.
140. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(5):518-22.
141. Patel KH, Bhat SN, H M. Outcome analysis of antibiotic-loaded poly methyl methacrylate (PMMA) beads in musculoskeletal infections. *J Taibah Univ Med Sci.* 2021;16(2):177-83.
142. van Vugt TAG, Arts JJ, Geurts JAP. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate Beads and Spacers in Treatment of Orthopedic Infections and the Role of Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2019;10:1626.
143. Makarov C, Cohen V, Raz-Pasteur A, Gotman I. In vitro elution of vancomycin from biodegradable osteoconductive calcium phosphate-polycaprolactone composite beads for treatment of osteomyelitis. *Eur J Pharm Sci.* 2014;62:49-56.
144. Gallarate M, Chirio D, Chindamo G, Peira E, Sapino S. Osteomyelitis: Focus on Conventional Treatments and Innovative Drug Delivery Systems. *Curr Drug Deliv.* 2021;18(5):532-45.
145. Wilhelm MP. Vancomycin. *Mayo Clin Proc.* 1991;66(11):1165-70.
146. Chung JHY, Kade JC, Jeiranikhameneh A, Ruberu K, Mukherjee P, Yue Z, et al. 3D hybrid printing platform for auricular cartilage reconstruction. *Biomed Phys Eng Express.* 2020;6(3):035003.
147. Nyberg E, Rindone A, Dorafshar A, Grayson WL. Comparison of 3D-Printed Poly-varepsilon-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(11-12):503-14.

148. Zhang ZZ, Wang SJ, Zhang JY, Jiang WB, Huang AB, Qi YS, et al. 3D-Printed Poly(epsilon-caprolactone) Scaffold Augmented With Mesenchymal Stem Cells for Total Meniscal Substitution: A 12- and 24-Week Animal Study in a Rabbit Model. *Am J Sports Med.* 2017;45(7):1497-511.
149. Siddiqui N, Asawa S, Birru B, Baadhe R, Rao S. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Mol Biotechnol.* 2018;60(7):506-32.
150. Lopez-Gonzalez I, Zamora-Ledezma C, Sanchez-Lorencio MI, Tristante Barrenechea E, Gabaldon-Hernandez JA, Meseguer-Olmo L. Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly(epsilon-caprolactone)/beta-tricalcium Phosphate Composite. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20).
151. Ragaert K, De Somer F, Van de Velde S, Degrieck J, Cardon L. Methods for Improved Flexural Mechanical Properties of 3D-Plotted PCL-Based Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *Strojniški vestnik – Journal of Mechanical Engineering.* 2013;59(11):669-76.
152. Yeo A, Wong WJ, Khoo HH, Teoh SH. Surface modification of PCL-TCP scaffolds improve interfacial mechanical interlock and enhance early bone formation: an in vitro and in vivo characterization. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(1):311-21.
153. Mirtaghi SM, Hassannia H, Mahdavi M, Hosseini-Khah Z, Mellati A, Enderami SE. A novel hybrid polymer of PCL/fish gelatin nanofibrous scaffold improves proliferation and differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal cells into islet-like cells. *Artif Organs.* 2022;46(8):1491-503.
154. Merk M, Chirikian O, Adlhart C. 3D PCL/Gelatin/Genipin Nanofiber Sponge as Scaffold for Regenerative Medicine. *Materials (Basel).* 2021;14(8).
155. Jang CH, Kim MS, Cho YB, Jang YS, Kim GH. Mastoid obliteration using 3D PCL scaffold in combination with alginate and rhBMP-2. *Int J Biol Macromol.* 2013;62:614-22.

156. Do NHN, Truong QT, Le PK, Ha AC. Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds. *Carbohydr Polym.* 2022;294:119726.
157. Dang PA, Palomino-Durand C, Elsafi Mabrouk M, Marquaille P, Odier C, Norvez S, et al. Rational formulation design of injectable thermosensitive chitosan-based hydrogels for cell encapsulation and delivery. *Carbohydr Polym.* 2022;277:118836.
158. Catoira MC, Fusaro L, Di Francesco D, Ramella M, Boccafoschi F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(10):115.
159. Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2018;199:445-60.
160. Nolan K, Millet Y, Ricordi C, Stabler CL. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell Transplant.* 2008;17(3):241-3.
161. Domalik-Pyzik P, Chłopek J, Pielichowska K. Chitosan-Based Hydrogels: Preparation, Properties, and Applications. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels. Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series* 2018. p. 1-29.
162. Seo JW, Shin SR, Lee MY, Cha JM, Min KH, Lee SC, et al. Injectable hydrogel derived from chitosan with tunable mechanical properties via hybrid-crosslinking system. *Carbohydr Polym.* 2021;251:117036.
163. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012;64:18-23.
164. Li P, Fu L, Liao Z, Peng Y, Ning C, Gao C, et al. Chitosan hydrogel/3D-printed poly(epsilon-caprolactone) hybrid scaffold containing synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration based on tetrahedral framework nucleic acid recruitment. *Biomaterials.* 2021;278:121131.
165. Osman MA, Virgilio N, Rouabhia M, Mighri F. Development and Characterization of Functional Polylactic Acid/Chitosan Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel).* 2022;14(23).

166. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater.* 2019;84:16-33.
167. Carette X, Mincheva R, Herbin M, Noirfalise X, Nguyen TC, Leclere P, et al. Atmospheric plasma: a simple way of improving the interface between natural polysaccharides and polyesters. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* 2021;1056(1).
168. Wang R, Shen Y, Zhang C, Yan P, Shao T. Comparison between helium and argon plasma jets on improving the hydrophilic property of PMMA surface. *Applied Surface Science.* 2016;367:401-6.
169. Robert E, Barbosa E, Dozias S, Vandamme M, Cachoncinlle C, Viladrosa R, et al. Experimental Study of a Compact Nanosecond Plasma Gun. *Plasma Processes and Polymers.* 2009:NA-NA.
170. A. EPCOS, « CeraPlas® HF Series », Piezoelectric Based Plasma Gener. Data Sheet. 2018.
171. Hu Z, Das SK, Yan S, You R, Li X, Luo Z, et al. Stability and biodegradation of silk fibroin/hyaluronic acid nerve conduits. *Composites Part B: Engineering.* 2020;200.
172. Jannah Mohd Sebri N, Anuar Mat Amin K. Composite Film of Chitosan Loaded Norfloxacin With Improved Flexibility and Antibacterial Activity for Wound Dressing Application. *Oriental Journal of Chemistry.* 2017;33(2):628-36.
173. Rabadan-Ros R, Revilla-Nuin B, Mazón P, Aznar-Cervantes S, Ros-Tarrega P, De Aza PN, et al. Impact of a Porous Si-Ca-P Monophasic Ceramic on Variation of Osteogenesis-Related Gene Expression of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Applied Sciences.* 2018;8(1).
174. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
175. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;40:103-12.

176. Chen M, Gao S, Wang P, Li Y, Guo W, Zhang Y, et al. The application of electrospinning used in meniscus tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2018;29(5):461-75.
177. Izadyari Aghmiuni A, Heidari Keshel S, Sefat F, AkbarzadehKhiyavi A. Fabrication of 3D hybrid scaffold by combination technique of electrospinning-like and freeze-drying to create mechanotransduction signals and mimic extracellular matrix function of skin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;120:111752.
178. Chen W, Zhou H, Tang M, Weir MD, Bao C, Xu HH. Gas-foaming calcium phosphate cement scaffold encapsulating human umbilical cord stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(7-8):816-27.
179. Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials.* 2006;27(7):974-85.
180. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials*1999.
181. Shie MY, Ding SJ. Integrin binding and MAPK signal pathways in primary cell responses to surface chemistry of calcium silicate cements. *Biomaterials.* 2013;34(28):6589-606.
182. Zhu XD, Fan HS, Zhao CY, Lu J, Ikoma T, Tanaka J, et al. Competitive adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on characterized calcium phosphates by polyacrylamide gel electrophoresis method. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(11):2243-9.
183. Hung CJ, Hsu HI, Lin CC, Huang TH, Wu BC, Kao CT, et al. The role of integrin  $\alpha$ 5 in proliferation and differentiation of human dental pulp cell response to calcium silicate cement. *J Endod.* 2014;40(11):1802-9.
184. Yeo A, Rai B, Sju E, Cheong JJ, Teoh SH. The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A.* 2008;84(1):208-18.
185. Lei Y, Rai B, Ho KH, Teoh SH. In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone—20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Materials Science and Engineering: C.* 2007;27(2):293-8.

186. Pena J, Corrales T, Izquierdo-Barba I, Serrano MC, Portoles MT, Pagani R, et al. Alkaline-treated poly(epsilon-caprolactone) films: degradation in the presence or absence of fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76(4):788-97.
187. Sukanya VS, Mohanan PV. Degradation of Poly(epsilon-caprolactone) and bio-interactions with mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;163:107-18.
188. Liu S, Jin F, Lin K, Lu J, Sun J, Chang J, et al. The effect of calcium silicate on in vitro physiochemical properties and in vivo osteogenesis, degradability and bioactivity of porous beta-tricalcium phosphate bioceramics. *Biomater*. 2013;8(2):025008.
189. Khan AF, Saleem M, Afzal A, Ali A, Khan A, Khan AR. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;35:245-52.
190. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31.
191. Maxim MA, Soritau O, Baciut M, Bran S, Baciut G. The role of dental stem cells in regeneration. *Clujul Med*. 2015;88(4):479-82.
192. Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rad A, Assadzadeh-Aghdaei H, Sharifian A, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2017;10(3):208-13.
193. Kim YB, Kim G. Functionally graded PCL/ $\beta$ -TCP biocomposites in a multilayered structure for bone tissue regeneration. *Applied Physics A*. 2012;108(4):949-59.
194. Petit C, Tulliani JM, Tadier S, Meille S, Chevalier J, Palmero P. Novel calcium phosphate/PCL graded samples: Design and development in view of biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;97:336-46.
195. Yuan B, Wang Z, Zhao Y, Tang Y, Zhou S, Sun Y, et al. In Vitro and In Vivo Study of a Novel Nanoscale Demineralized Bone Matrix Coated PCL/ $\beta$ -

- TCP Scaffold for Bone Regeneration. *Macromol Biosci.* 2021;21(3):e2000336.
196. Patrício T, Domingos M, Gloria A, Bártolo P. Characterisation of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering. *Procedia CIRP.* 2013;5:110-4.
197. Dou Y, Fa X, Gu Y, Liang L, Wen J, Qin A, et al. Fabrication and characterization of PVA/CS-PCL/gel multi-scale electrospun scaffold: simulating extracellular matrix for enhanced cellular infiltration and proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2020;31(6):729-46.
198. Li Z, Wu N, Cheng J, Sun M, Yang P, Zhao F, et al. Biomechanically, structurally and functionally meticulously tailored polycaprolactone/silk fibroin scaffold for meniscus regeneration. *Theranostics.* 2020;10(11):5090-106.
199. Kao CT, Lin CC, Chen YW, Yeh CH, Fang HY, Shie MY. Poly(dopamine) coating of 3D printed poly(lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;56:165-73.
200. Zernik J, Twarog K, Upholt WB. Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation.* 1990;44(3):207-15.
201. Fishman WH, Ghosh NK. Isoenzymes of Human Alkaline Phosphatase. *Advances in Clinical Chemistry Volume 10. Advances in Clinical Chemistry* 1967. p. 255-370.
202. Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, Verhaar JA, van Leeuwen JP, Weinans H, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:188.
203. Gao P, Zhang H, Liu Y, Fan B, Li X, Xiao X, et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Sci Rep.* 2016;6:23367.
204. Chen M, Le DQ, Kjems J, Bunger C, Lysdahl H. Improvement of Distribution and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Hyaluronic Acid and beta-Tricalcium Phosphate-Coated Polymeric Scaffold In Vitro. *Biores Open Access.* 2015;4(1):363-73.

205. Jensen J, Kraft DC, Lysdahl H, Foldager CB, Chen M, Kristiansen AA, et al. Functionalization of polycaprolactone scaffolds with hyaluronic acid and beta-TCP facilitates migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(3-4):729-39.
206. Gurel Pekozer G, Ramazanoglu M, Schlegel KA, Kok FN, Torun Kose G. Role of STRO-1 sorting of porcine dental germ stem cells in dental stem cell-mediated bone tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(3):607-18.
207. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J*. 2011;5(Suppl 2):253-60.
208. Feng-Juan LV, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(6):1408-19.
209. Viti F, Landini M, Mezzelani A, Petecchia L, Milanese L, Scaglione S. Osteogenic Differentiation of MSC through Calcium Signaling Activation: Transcriptomics and Functional Analysis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148173.
210. Karsenty G, Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Geoffroy V, et al. *Cbfa1* as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone*. 1999;25(1):107-8.
211. Ducy P. *CBFA1*: A molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics*. 2000;219(4):461-71.
212. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. *Runx2*: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(9):1659-63.
213. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):98-105.
214. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
215. Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, *Runx2*: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*. 2003;88(3):446-54.

216. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):477-86.
217. Raeisdasteh Hokmabad V, Davaran S, Ramazani A, Salehi R. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017;28(16):1797-825.
218. Neuendorf RE, Saiz E, Tomsia AP, Ritchie RO. Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: Relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater.* 2008;4(5):1288-96.
219. Jennings JA. Controlling chitosan degradation properties in vitro and in vivo. *Chitosan Based Biomaterials Volume 12017.* p. 159-82.
220. Lim SM, Song DK, Oh SH, Lee-Yoon DS, Bae EH, Lee JH. In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2008;19(4):453-66.
221. Lopez-Iglesias C, Barros J, Ardao I, Monteiro FJ, Alvarez-Lorenzo C, Gomez-Amoza JL, et al. Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications. *Carbohydr Polym.* 2019;204:223-31.
222. Kausar R, Khan AU, Jamil B, Shahzad Y, Ul-Haq I. Development and pharmacological evaluation of vancomycin loaded chitosan films. *Carbohydr Polym.* 2021;256:117565.
223. Hadder B, Dexter F, Robinson ADM, Loftus RW. Molecular characterisation and epidemiology of transmission of intraoperative *Staphylococcus aureus* isolates stratified by vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC). *Infect Prev Pract.* 2022;4(4):100249.
224. Peixoto PB, Massinhani FH, Netto Dos Santos KR, Chamon RC, Silva RB, Lopes Correa FE, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with reduced vancomycin susceptibility from bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *J Med Microbiol.* 2020;69(1):41-5.
225. Chang SH, Lin HT, Wu GJ, Tsai GJ. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydr Polym.* 2015;134:74-81.

226. Garcia-Gonzalez CA, Barros J, Rey-Rico A, Redondo P, Gomez-Amoza JL, Concheiro A, et al. Antimicrobial Properties and Osteogenicity of Vancomycin-Loaded Synthetic Scaffolds Obtained by Supercritical Foaming. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(4):3349-60.
227. Baranwal A, Kumar A, Priyadharshini A, Oggu GS, Bhatnagar I, Srivastava A, et al. Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int J Biol Macromol*. 2018;110:110-23.
228. Ferreira MOG, Leite LLR, de Lima IS, Barreto HM, Nunes LCC, Ribeiro AB, et al. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. *Carbohydr Polym*. 2016;152:409-18.
229. Tardajos MG, Cama G, Dash M, Misseeuw L, Gheysens T, Gorzelanny C, et al. Chitosan functionalized poly-epsilon-caprolactone electrospun fibers and 3D printed scaffolds as antibacterial materials for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym*. 2018;191:127-35.
230. Zhao X, Zhou L, Li Q, Zou Q, Du C. Biomimetic mineralization of carboxymethyl chitosan nanofibers with improved osteogenic activity in vitro and in vivo. *Carbohydr Polym*. 2018;195:225-34.
231. Li L, Yu M, Li Y, Li Q, Yang H, Zheng M, et al. Synergistic anti-inflammatory and osteogenic n-HA/resveratrol/chitosan composite microspheres for osteoporotic bone regeneration. *Bioact Mater*. 2021;6(5):1255-66.
232. Cai B, Zou Q, Zuo Y, Li L, Yang B, Li Y. Fabrication and cell viability of injectable n-HA/chitosan composite microspheres for bone tissue engineering. *RSC Advances*. 2016;6(89):85735-44.

## **VIII – ANEXOS**

---



## VIII - ANEXOS

## ANEXO 1. Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human MSC Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Composite



Article

### Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ $\beta$ -tricalcium Phosphate Composite

Ivan López-González <sup>1,\*</sup>, Camilo Zamora-Ledezma <sup>1,t</sup>, María Isabel Sanchez-Lorencio <sup>2</sup>, Elena Tristante Barrenechea <sup>3</sup>, José Antonio Gabaldón-Hernández <sup>4</sup> and Luis Meseguer-Olmo <sup>1,\*</sup>



**Citation:** López-González, I.; Zamora-Ledezma, C.; Sanchez-Lorencio, M.I.; Tristante Barrenechea, E.; Gabaldón-Hernández, J.A.; Meseguer-Olmo, L. Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ $\beta$ -tricalcium Phosphate Composite. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11216. <https://doi.org/10.3390/ijms22011216>

Academic Editors: Antonella Fortino and Pierre Mofatt

Received: 15 September 2021  
Accepted: 15 October 2021  
Published: 18 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Tissue Regeneration and Repair Group, Orthobiology, Biomaterials and Tissue Engineering, Campus de los Jerónimos 135, UCAM-Universidad Católica de Murcia, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain; czamora@ucam.edu
- <sup>2</sup> Biomedical Research Institute of Murcia (IMIB-Arrivaca-UMU), University Clinical Hospital "Virgen de la Arrivaca", University of Murcia, El Palmar, 30120 Murcia, Spain; msl70082@um.es
- <sup>3</sup> Plataforma Sala Blanca, IMIB-Arrivaca, Carretera Madrid-Cartagena S/N, El Palmar, 30120 Murcia, Spain; elena.tristante@imib.es
- <sup>4</sup> Molecular Recognition and Encapsulation Research Group (REM), Health Sciences Department, Campus de los Jerónimos 135, UCAM-Universidad Católica de Murcia, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain; jagaldon@ucam.edu
- \* Correspondence: ilopez27@ucam.edu (I.L.-G.); lmeseguer@ucam.edu (L.M.-O.);  
Tel.: +34-968-278-800 (I.L.-G. & L.M.-O.)
- † These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** In this work, we evaluated the influence of a novel hybrid 3D-printed porous composite scaffold based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) microparticles in the process of adhesion, proliferation, and osteoblastic differentiation of multipotent adult human bone marrow mesenchymal stem cells (*ah*-BM-MSCs) cultured under basal and osteogenic conditions. The in vitro biological response of *ah*-BM-MSCs seeded on the scaffolds was evaluated in terms of cytotoxicity, adhesion, and proliferation (AlamarBlue Assay<sup>®</sup>) after 1, 3, 7, and 14 days of culture. The osteogenic differentiation was assessed by alkaline phosphatase (ALP) activity, mineralization (Alizarin Red Solution, ARS), expression of surface markers (CD73, CD90, and CD105), and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) after 7 and 14 days of culture. The scaffolds tested were found to be bioactive and biocompatible, as demonstrated by their effects on cytotoxicity (viability) and extracellular matrix production. The mineralization and ALP assays revealed that osteogenic differentiation increased in the presence of PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds. The latter was also confirmed by the gene expression levels of the proteins involved in the ossification process. Our results suggest that similar bio-inspired hybrid composite materials would be excellent candidates for osteoinductive and osteogenic medical-grade scaffolds to support cell proliferation and differentiation for tissue engineering, which warrants future in vivo research.

**Keywords:** 3D printing; poly( $\epsilon$ -caprolactone);  $\beta$ -tricalcium phosphate; microparticles; composite filament; mesenchymal stem cells; flow cytometry; qRT-PCR; tissue engineering; cell therapies

#### 1. Introduction

Nowadays, the most common bone regeneration approaches are focused on the fabrication of affordable substitutes to autologous bone grafts [1–6]. In this context, a large number of strategies have been successfully developed in recent decades, aiming to produce tailored synthetic soft polymer-based biomaterials (which can be administered via injection), rigid scaffolds that act as a 3D framework to mimic bone structures and

functionalities, or a combination of the aforementioned approaches [1,5,7]. An ideal synthetic matrix in bone regeneration and repair needs to be not only bioactive and resorbable, but also must exhibit specific structural characteristics (micro-/macroporosity), mechanical, and biochemical properties to mimic those from native tissues [8,9], since these properties modulate the biological response of the scaffold and also influence its stiffness, surface morphology, hydrophilicity, degradation, cell adhesion, proliferation, and differentiation [10]. As a matter of fact, an interconnected pore network with open porosity facilitates cell penetration and fluid flow, which also enhances the capacity for cell proliferation [7].

To date, around 60% of the bone graft substitutes commercially available are based on ceramics. In this sense, different ceramic precursors have been proposed, but the family of calcium phosphate (CaP)-based ceramics deserves special attention due to their biocompatibility and unlimited availability [11–14]. Nevertheless, these materials must overcome their main drawback regarding their brittle structure. In addition to ceramic-based substitutes, the most common 3D structured biomaterials are based on natural and synthetic precursors of a different nature, or on their combination [15]. Among the most versatile synthetic polymer precursors for bone graft substitutes, poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) deserves special attention due to its biocompatibility, biodegradability, and ductility. Actually, it is widely used for applications in the medical and pharmaceutical industries.

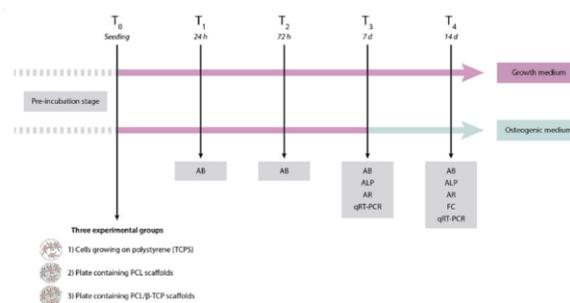
In recent years, a very active branch of materials research based on combining bio-friendly polymers with inorganic ceramics such as  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP,  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) has recently flourished, mainly due to their large potential of applications in clinical orthopedics [13,14,16–21]. The association of polymers with TCP not only offers the possibility to fabricate tailored materials with enhanced physicochemical properties, but also with modulable resorption rate, facilitating protein/cell adhesion, proliferation, osteogenic differentiation, and osseointegration [22–29]. These materials could also be used as a carrier for the controlled release of various molecules such as growth factors, antibiotics, bisphosphonates, and statins, which would promote the osteogenesis and regeneration of bone tissue [3–5,9,23,30–35]. The functionality of the former materials can be exalted by using biological coating additives such as gelatin, chitosan, or fibronectin in order to increase the cell adhesion, avoiding their detachment when they come into contact with organic fluids [36–39]. In this context, Díaz-Arca et al. [2] reported the fabrication of tricalcium phosphate (TCP) and silicocarnotite (SC) scaffolds via sintering, which mimic the internal microstructure of cancellous bones and can be combined with osteogenic factors to improve their performance for bone reconstruction applications [40]. In such materials, the TCP is responsible for releasing calcium and phosphorus ions, thereby enhancing cell proliferation and cellular differentiation [7]. Similarly, Shin et al. [41] reported the fabrication of biphasic PCL/ $\beta$ -TCP (BCP) composite scaffolds with an interconnected porous structure via salt-leaching and freeze-drying. They reported that such composite materials permit cell survival, accompanied by a significant osteogenic differentiation. However, they were incapable of observing a significant increase in the proliferation of human mesenchymal stem cells (*h*MSCs) beyond seven days in culture. Other interesting findings were reported by Park et al. [42], who demonstrated positive osteogenic differentiation of *h*MSCs under mechanical stimulation of PCL/ $\beta$ -TCP 3D-printed scaffolds. Surprisingly, composites with a lower  $\beta$ -TCP content display lower expression of osteogenic markers if compared to those composites with a higher  $\beta$ -TCP content. However, they only investigated the effects of  $\beta$ -TCP on the proliferation and differentiation *in vitro* for a nine-day period. More recently, Yang et al. [43] reported the biological responses of MC3T3-E1 cell lines on PCL/ $\beta$ -TCP 3D-printed scaffolds. They demonstrated that those materials treated by oxygen plasma and/or amine plasma-polymerization positively influence the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of cells. Thus, the fabrication of alternative bioinspired composite material to stimulate bone regeneration and repair still remains an attractive and open issue.

In this work, we focus on the fabrication of novel hybrid polymer–ceramic porous 3D-printed composite scaffolds based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) microparticles, and their influence in the process of adhesion, proliferation, and osteoblastic differentiation of multipotent adult human bone marrow mesenchymal stem cells (*ah*-BM-MSCs) via primary human mesenchymal stem cell culture. Moreover, we assessed the potential positive influence of the release of calcium and phosphorus ions on metabolic activity and cellular differentiation. We also studied the effects of the physico-structural characteristics of the scaffolds on cytotoxicity (cell viability), extracellular matrix production, and variations in gene expression to confirm osteoblastic differentiation.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Study Design

The first step of the present study was the fabrication of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)/ $\beta$ -tricalcium phosphate (PCL/ $\beta$ -TCP) 3D-printed porous disk-shaped scaffolds of 8 × 1.5 mm (diameter × height). Subsequently, a detailed characterization of their structure and properties was performed. Three experimental groups were established as follows: (1) Control group or cells growing on polystyrene (TCPS), (2) plates containing PCL scaffolds, and (3) plates containing PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds. Finally, the *in vitro* biological behavior was investigated using a primary culture of *ah*-BM-MSCs. All biological studies were carried out according to a previously established schedule (Figure 1).



**Figure 1.** Schematic representation of the study design, including the time schedule of the performed experiments. AB, AlamarBlue assay; ALP, alkaline phosphatase; AR, alizarin red staining; FC, flow cytometry; qRT-PCR, quantitative polymerase chain reaction.

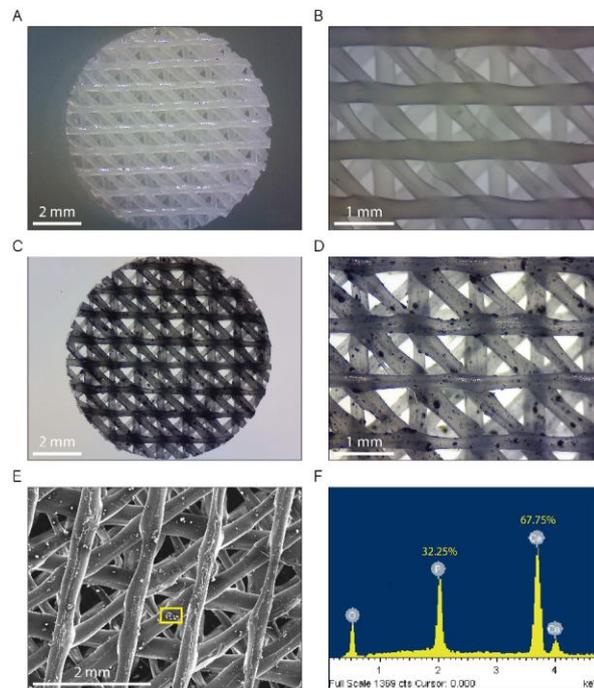
### 2.2. Material Composition and Characterization

#### 2.2.1. Morphological Characterization and Microanalysis of the Composite Filaments and the 3D-Printed Scaffolds

The morphology and diameter of native PCL filaments and PCL/ $\beta$ -TCP composite filaments were examined and characterized before being fed into the 3D bioprinter. As can be seen in the SEM micrographs, the native PCL filaments show a smooth homogeneous surface (Figure S1A), while the PCL/ $\beta$ -TCP filaments show a heterogeneous micro-granulated surface due to the presence of  $\beta$ -TCP microparticles (Figure S1B). Likewise, the  $\beta$ -TCP coating resulted in a slight increase in the filament diameter from 1.77 to 1.93 mm (Figure S1C). Additionally, an EDX analysis was carried out on the coated filaments in order to check the presence of phosphorus and calcium elements, obtaining 33.5% and 66.5% of the total weight, respectively (Figure S1D,E).

Figure 2A–D show typical non-polarized optical microscopy images for native PCL (Figure 2A,B) and PCL/ $\beta$ -TCP (Figure 2C,D) 3D-printed scaffolds. They exhibit a standard disk shape with a diameter of 8 mm and a height of 1.5 mm. As seen in the magnified microscopies, the printed lines display an ordered structure, adopting a parallel distribution

in every printed layer (Figure 2B,D). The distance between the scaffold printed lines was  $1.30 \pm 0.40$  mm in the vertical and horizontal layers, and  $0.35 \pm 0.03$  mm in the diagonal layers, providing a network of interconnected pores of triangular morphology with an average porosity of  $200 \mu\text{m}$ . We also clearly observed TCP microparticles randomly distributed throughout the entire PCL/ $\beta$ -TCP scaffold (Figure 2C,D). Finally, the energy dispersive X-ray (SEM-EDX) microanalysis was performed in order to verify the presence of the TCP mineral fraction. According to our analyses, we obtained a share of 32.25% and 67.75% of the total weight of phosphorus and calcium elements, respectively (Figure 2E,F).

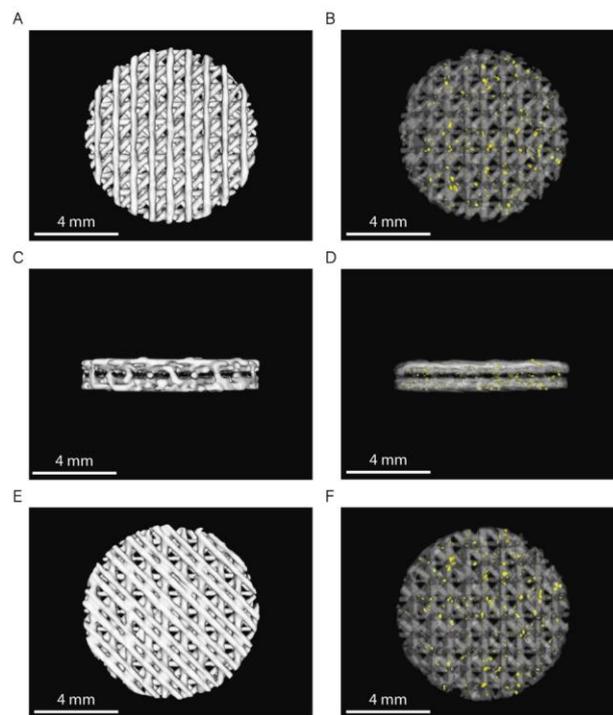


**Figure 2.** Images of both (A,B) PCL and (C,D) PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds taken with a stereomicroscope at different magnifications. The  $\beta$ -TCP microparticles were stained with nigrosine for clarity. (E) Micrograph acquired with SEM showing a magnification of the PCL/ $\beta$ -TCP scaffold and (F) its corresponding EDX spectrum. The researched area is depicted as a yellow square.

### 2.2.2. Pore Structure Characterization by Micro-CT

Three-dimensional (3D) printing has emerged as a powerful tool for tissue engineering by enabling 3D cell cultures within complex 3D biomimetic architectures [44]. In contrast to the conventional techniques such as electrospinning [45], freeze-drying [46], gas foaming [47], or fiber deposition [48], 3D printing brings more control to both internal and external scaffold geometry. Parameters such as pore size, total porosity, and pore connectivity play an important role in the mass transport of biological fluids, oxygen, nutrients, and cells from the external environment to the inner parts of the scaffold promoting tissue ingrowth [49].

The 3D rendering of the CT images from six randomly selected scaffolds ( $n = 3$  per sample) showed no statistically significant differences between the volume of both PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds (Figure 3). Based on the data collected from 3D reconstructions, both types of scaffolds had an average volume ( $V_S$ ) of  $31 \pm 1 \text{ mm}^3$ , which corresponds to a global porosity of  $0.59 \pm 0.10$  when compared to the theoretical volume ( $V_T = 75.4 \text{ mm}^3$ ) of an  $8 \times 1.5 \text{ mm}$  (diameter, height) disk.



**Figure 3.** 3D rendering of PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds (top: (A,B); lateral: (C,D); and bottom: (E,F) view). In images (B,D,F), PCL is shown with 80% transparency to allow the observation of the  $\beta$ -TCP particles, which are depicted in yellow.

In order to obtain scaffolds with open and interconnected porosity, we used an 8 mm biopsy punch to homogenize the samples obtaining scaffolds with an absence of a well-defined peripheral limiting layer. This technical detail allows the peripheral pores on its entire surface to be in direct contact with the external environment. In addition, we selected a triangular infill pattern, which results in a network of interconnected pores.

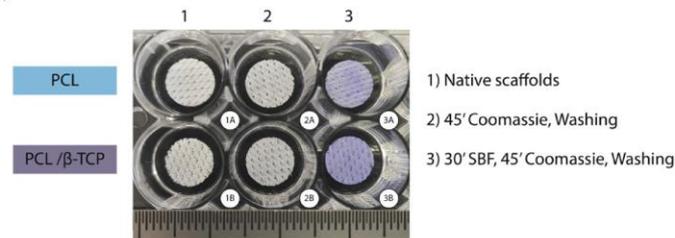
Finally, the 3D rendering of PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds (Figure 3B,D,F) showed a random distribution of  $\beta$ -TCP microparticles over the entire scaffold volume, as outlined in the previous section (Figure 2D).

### 2.3. Influence of the Scaffold Composition

#### 2.3.1. Protein Adhesion: Coomassie Brilliant Blue Test

The Coomassie stain is one of the most widely used assays for protein quantification. As a matter of fact, it provides sensitive protein detection, along with simplified protocols, and it is relatively accurate for most proteins. Besides, it is well known that the contact of a living body with a material induces the absorption of a protein monolayer on its surface, depending on the nature of the material, creating an interface where other proteins and cells adsorb [50]. This protein layer promotes the fact that cell adhesion receptors located on the cell membrane (such as integrins) can recognize the arginine–glycine–aspartate (RGD) peptide, creating anchor points on the surface of the biomaterial [51]. In addition, overall porosity, size, pore distribution, and particle size are factors that also influence the degree of protein adsorption. Thus, the existence of pores greatly increases the surface area of the materials and enhances protein adsorption. In this context, Zhu et al. [52] demonstrated that the amount of total proteins adsorbed by porous Ca-P biphasic Ca-P porous ceramic (BCP) (HA/TCP 1/4 7:3) was higher than that of dense BCP. Furthermore, once the cells have adhered, the processes of the synthesis and release of the ECM constituent molecules such as osteopontin (OPN), collagen type I (COL1A1), and bone morphogenetic proteins (BMPs), among other regulators of osteogenesis begin [51,53]. In other words, the proteins initially adsorbed on the surface and coming from the fluids provide a temporary substrate for cell adhesion.

In our study, the Coomassie Brilliant Blue test—a simple and reliable qualitative procedure—showed that both PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds were able to absorb proteins on their surface (Figure 4). The scaffolds that were not submerged in fetal bovine serum (FBS) lost their bluish color after three washes with the destaining solution (Figure 4(2)), while those scaffolds immersed in FBS for 30 min remained blue after the washing step (Figure 4(3)). It is also worth noting that apparently, native PCL scaffolds exhibit a slightly light color if compared to PCL/ $\beta$ -TCP after the washing step. The latter is probably due to the presence of  $\beta$ -TCP microparticles, which would have slightly modified the hydrophobic nature of the surface of PCL making them more hydrophilic, facilitating the proteins adhesion.



**Figure 4.** Coomassie Brilliant Blue test performed on PCL (upper row) and PCL/ $\beta$ -TCP (bottom row) scaffolds after non-immersion in FBS (2A,B) and 30 min immersion in FBS (3A,B). Two unstained scaffolds were taken as the control (1A,B).

#### 2.3.2. In Vitro Degradation Kinetics

The degradation kinetics of the polymer used for the fabrication of medical-grade composites are of paramount importance. In fact, it is highly desirable to match the polymer biodegradation with their intended functional tissue regeneration use. Typically, degradation is assessed via scaffold immersion in a buffered solution (such as commercially available DMEM or homemade simulated body fluid (SBF) solutions) during periods ranging from days or weeks to months. The scaffold weight loss is directly correlated with the polymer degradation process. PCL is considered a polymer with a very long degradation time. In our case, we immersed at 37 °C into a biomimetic SBF solution all

of our PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds. The immersion time ranged over 3, 7, 14, 21, and 28 days according to different authors [54,55]. The percentage of the scaffold's weight loss immersed in SBF solutions for various periods of time was then calculated using Equation (2) [56–58]. As expected, for the periods studied, the PCL degradation was less than 1%, even for those exposed during 28 days (data not shown). These results are in total agreement with the expected ones for similar PCL-based composite materials. In fact, as reported by Sukanya et al. [54], the PCL is expected to exhibit weight losses of around 2% for an extended period of immersion in SBF of 90 days. In spite of the fact that we did not study the TCP degradation, it is worth mentioning that it is widely known from the literature that  $\beta$ -TCP bioceramics degrade relatively quickly, being able to simultaneously promote new bone formation in vivo [59]. In addition, from a physiological point of view,  $\beta$ -TCP degrades faster than hydroxyapatite, either via chemical dissolution or via reabsorption by phagocytic cellular mechanisms (macrophages or osteoclasts). The latter would directly affect the bone remodeling process [60].

#### 2.4. Cell Viability and Proliferation

##### 2.4.1. *ah*-BM-MSc Characterization

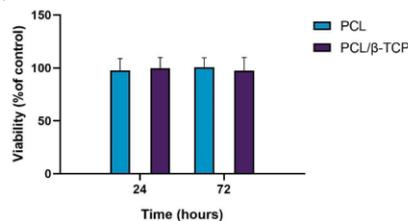
In the present study, *ah*-BM-MSCs were used to evaluate the biocompatibility and the osteogenic activity of PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds due to their clinical importance and their great capacity for osteoblastic differentiation [61]. Basically, MSCs have the ability to differentiate ex vivo into various cell lines (such as osteoblast) under favorable environmental conditions [62]. As can be seen in Table 1, the high positive expression of mesenchymal stem cell-like markers, specifically CD73, CD90, CD105, and CD44, was observed in more than 97% of cells isolated, manifesting its immature phenotype and important regenerative potential and making them suitable for in vitro assays, as reported previously in the literature [63].

**Table 1.** Flow cytometric analysis for cluster of differentiation (CD) marker expression of *ah*-BM-MSCs at passages 3–4. \* Hematopoietic markers.

Antigen	Percentage of Positive Cells
CD73	99.67 $\pm$ 0.06
CD90	98.27 $\pm$ 0.25
CD105	97.93 $\pm$ 0.06
CD44	97.87 $\pm$ 0.23
CD14/19/34/45*	3.10 $\pm$ 0.52

##### 2.4.2. Cytotoxicity Assay

Biocompatibility is one of the most important factors to be taken into account for the fabrication of scaffolds for tissue engineering. In this regard, both PCL and  $\beta$ -TCP have been previously reported as biocompatible and safe biomaterials [64–66]. Cytotoxicity assays are widely used to measure loss of cellular or intracellular structures and functions, including lethal cytotoxicity levels, providing an unequivocal indication of their potential to cause cell or tissue damage. The cell viability was assessed by using the AlamarBlue assay after seeding *ah*-BM-MSCs on PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds (Figure 5). The results of cell viability at 24 and 72 h after seeding demonstrated that both the PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds had no cytotoxic effects on *ah*-BM-MSCs. The values of cell viability ranged from 86% to 114% for PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds at 24 h, and from 88% to 115% at 72 h. The mean percentage of viability after direct seeding on both scaffolds was 98  $\pm$  11 (PCL) and 100  $\pm$  10 (PCL/ $\beta$ -TCP) at 24 h, and 101  $\pm$  9 (PCL) and 98  $\pm$  12 (PCL/ $\beta$ -TCP) at 72 h. It is also worth noting that no statistically significant differences were observed between the groups.



**Figure 5.** Cell viability using the AlamarBlue assay after 24 and 72 h of direct seeding of *ah*-BM-MSCs on PCL and PCL/β-TCP scaffolds. The mean percentage of viability was calculated and normalized with respect to the viability of cells growing on bare plastic (TCPs) (positive control). Bars represent standard deviations of the mean.

#### 2.4.3. Cellular Metabolic Activity Assay

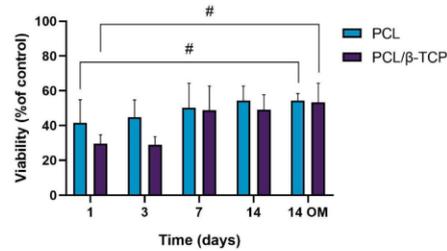
Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based scaffolds have been widely used in recent years for tissue engineering applications due to their biocompatibility, biodegradability, structural stability, and mechanical properties [67]. In this sense, different authors have demonstrated that cells are able to adhere and proliferate onto different PCL-based scaffold structures, such as electrospun fibers [68] and 3D-printed scaffolds [69]. In our work, the hydrophilic properties provided by the coating with the  $\beta$ -TCP microparticles based on a preliminary wettability test using distilled water (data not shown in this work) may favor adhesion, initial cell growth, and differentiation, since both *ah*-BM-MSCs and osteoblasts show more affinity toward hydrophilic surfaces [70]. For this reason, the wettability of the scaffold surface was one of the key criteria we took into account when designing this study.

The cellular metabolic activity of *ah*-BM-MSCs grown on both PCL and PCL/β-TCP scaffolds was evaluated using the AlamarBlue assay on days 1, 3, 7, and 14 after seeding (Figure 6). The viability of cells growing on scaffolds was normalized with respect to cells growing on plastic (TCPs), which were taken as a positive control. The viability increased gradually for the different time periods studied, indicating that the cells successfully adhered to the scaffolds with a good proliferation rate. It is worth noting that the PCL/β-TCP scaffolds showed lower viability than native PCL scaffolds at early periods (days 1 and 3); however, both viability rates were similar at 7 and 14 days of study, either with growth medium (GM) or after the addition of osteogenic medium (OM) on day 7. As clearly shown in the plot, no significant differences were found between scaffolds at these time periods. However, we noted that the addition of OM caused a slight increase in the metabolic activity with respect to those cells seeded on PCL/β-TCP scaffolds with GM at 14 days.

### 2.5. Cell Differentiation Studies

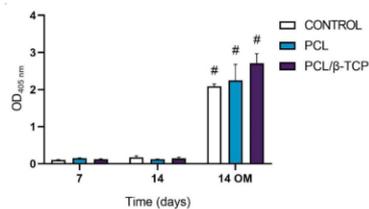
#### 2.5.1. Alkaline Phosphatase (ALP) Activity

ALP is a hydrolase enzyme responsible for dephosphorylating molecules under alkaline conditions (pH > 10). It is present within all tissues of the body, particularly in bone cells, and is considered an early indicator of osteoblastic differentiation [71]. As widely discussed in the literature, an ALP assay allows establishing a direct relationship between the presence of ALP activity and the normal development of bone in the human body [72,73].



**Figure 6.** Cellular metabolic activity using the AlamarBlue assay on *ah*-BM-MSCs seeded on both PCL and PCL/β-TCP scaffolds at different time periods. The mean percentage viability was calculated and normalized to the viability of cells growing on plastic (TCPs) (positive control). Bars represent standard deviations of the mean. # Significant differences between the bracketed groups at different time periods.

The ALP activity of cultured *ah*-BM-MSCs on both PCL and PCL/β-TCP scaffolds is shown in Figure 7. From days 7 to 14 (GM), no significant difference in ALP activity was observed between the different time periods or within scaffold types. On the contrary, ALP activity significantly increased from days 7 to 14 (OM). The maximum ALP activity values were noticed at 14 days in the presence of osteogenic medium (OM) on cells seeded onto PCL/β-TCP scaffolds, which reveals that β-TCP microparticles seem to exert an impact on osteoblastic phenotype and enhance cellular responses. As a matter of fact, previous studies have indicated that the addition of β-TCP granules into PCL-based composites might enhance the osteoblastic differentiation ability of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) [74]. Nevertheless, there still exists a current controversy regarding the time period in which the ALP activity shows its maximum activity. In this context, Chen et al. [75] studied the osteoblastic response of MSCs on hyaluronic acid (HA)/β-TCP polymeric-based scaffolds. They reported a well-defined peak in ALP activity by day 7, followed by a decrease, while Jensen et al. [76] reported the maximum ALP activity after 14 days of study in similar polymer-based composites.

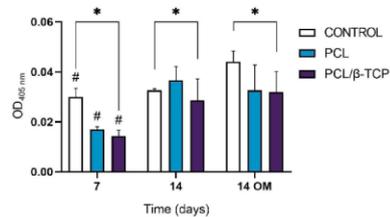


**Figure 7.** Alkaline phosphatase activity of *ah*-BM-MSCs seeded on PCL and PCL/β-TCP scaffolds after 7 and 14 days of culture. Results are shown as a function of optical density (OD) units. No significant differences were found at the same time periods between the groups. Bars represent standard deviations of the mean. # Significant differences between the marked group at different time periods ( $p > 0.05$ ).

### 2.5.2. In Vitro Mineralization. Alizarin Red Solution (ARS) Staining

Calcium deposition or in vitro mineralization are late markers of osteogenic differentiation. Deposited calcium can be quantified or stained with Alizarin Red Solution (ARS) stain, showing a positive staining (red) of mineralized nodules [77]. The osteogenic effect of the manufactured scaffolds was verified by determining the presence of calcium deposits in the cell culture. For this purpose, the Alizarin Red expression of *ah*-BM-MSCs cultured

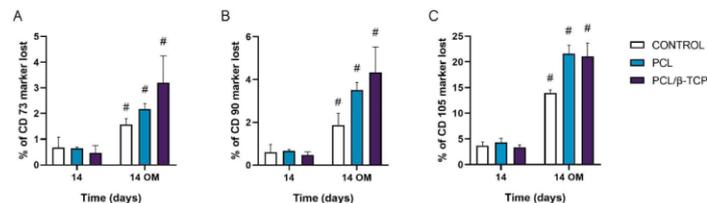
on PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds was assessed at 7 and 14 days after seeding (Figure 8). No visual differences were observed after examining the stained samples at different time periods under a contrast phase microscope (data not shown). However, the quantitative examination showed that the Alizarin Red activity of *ah*-BM-MSCs increased significantly from days 7 to 14 with both growth medium (GM) and osteogenic medium (OM). The addition of OM promoted a slight increase in the controls at 14 days, but no significant differences were observed between the PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds.



**Figure 8.** Alizarin Red quantification assay of *ah*-BM-MSCs seeded on PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds after 7 and 14 days of culture. Cells seeded on plastic (TCPs) were taken as the positive control. Results are shown as a function of optical density (OD) units. # Significant differences between the marked group at different time periods ( $p > 0.05$ ). \* Significant differences between the bracketed groups at the same time period.

### 2.5.3. Monitoring Surface Markers on *ah*-BM-MSCs Seeded on the Scaffolds

To date, the most commonly reported positive markers related to adult human MSC (*ah*MSCs) surface are CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD54, and CD166 [78]. The minimal criteria of MSCs include: (i) Remaining plastic-adherent under standard culture conditions; (ii) expressing CD73, CD90, and CD105; and (iii) differentiating into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes in vitro [79]. The positive expression of the cluster of differentiation markers CD73, CD90, and CD105 of *ah*-BM-MSCs seeded on both PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds is shown in Figure 9. The results are expressed as the percentage of marker lost after 14 days of culture with both GM and OM (added on day 7). As observed, by day 14, the CD73 and CD90 markers' expression decreased significantly after the addition of OM. For both markers, the PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds showed a higher marker loss than the PCL scaffolds and controls. The higher marker loss throughout the study affected the CD105 marker, whose expression decreased significantly after the addition of OM. In this case, the PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds showed similar marker loss than the PCL scaffolds. This decrease in the positive expression of the mesenchymal markers (CD73, CD90, and CD105) could be a consequence of the osteogenic differentiation program activation [80].



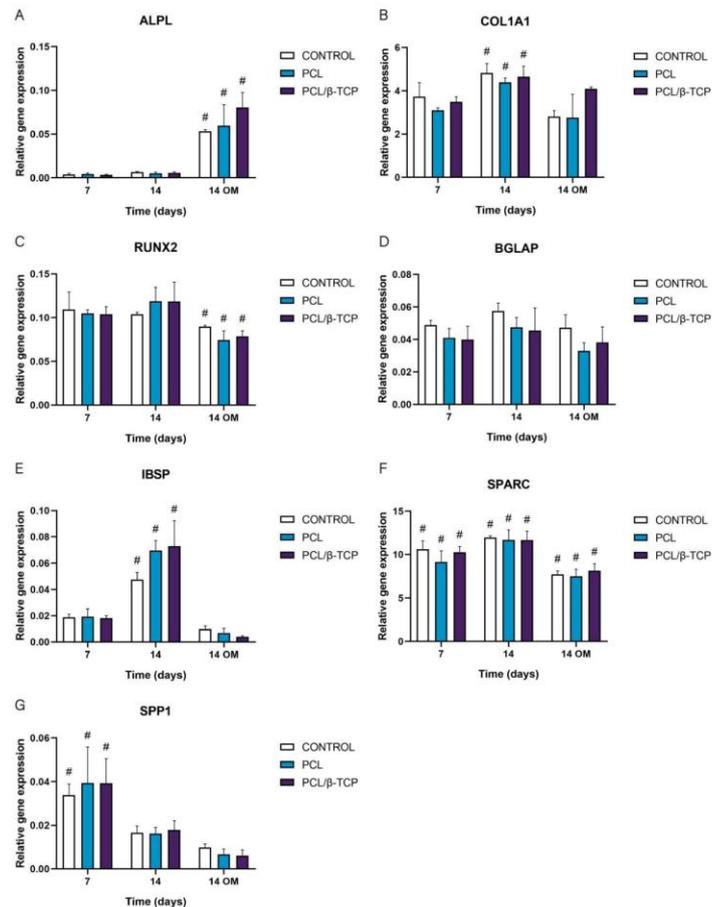
**Figure 9.** (A) CD73, (B) CD90, and (C) CD105 expressions of the cells seeded on PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds. Data represent the percentage of marker loss at 14 days with different culture medium (GM and OM). The experiment was performed in triplicate. # Significant differences between the marked group with different culture media.

#### 2.5.4. Osteogenic Gene Expression: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Assay

The gene expression of osteogenic-specific markers such as ALPL, COL1A1, RUNX2, BGLAP, IBSP, SPARC, and SPP1 was used to determine osteoblastic differentiation in vitro by qRT-PCR (Figure 10). As observed, the ALPL marker displayed an increase in gene expression throughout the study, showing higher values after the addition of osteogenic medium (OM) by day 7. In this time period, the PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds exhibited higher ALPL gene expression than the PCL scaffolds. For its part, the COL1A1 marker displayed a significant peak in gene expression at 14 days with growth medium (GM). Likewise, the COL1A1 expression with OM increased for the PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds, with no significant differences in the time periods studied. In the same way, the exhibited RUNX2 gene expression remains almost constant from days 7 to 14 with GM. However, a non-negligible decrease in gene expression was observed by day 14 with OM. The BGLAP gene expression also exhibited almost constant values throughout the study. As a matter of fact, no significant differences were observed between the different time periods. In contrast, the IBSP expression showed a prominent peak on both the PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds on day 14 with GM. However, after the addition of OM, an abrupt decrease in IBSP expression was observed. The SPARC gene expression showed higher values in the presence of GM but lower marker expression in the presence of OM. Finally, the SPP1 marker showed a clear decreasing trend from days 7 to 14 with both types of culture media, either GM or OM. It is worth mentioning that in the latter case, the lower expression values were observed on day 14 in the presence of OM.

These results are in total accordance with the results reported by Jensen et al. [76], who studied the influence of PCL scaffolds functionalized with hyaluronic acid and  $\beta$ -TCP on dental pulp stem cells. In this study, alkaline phosphatase, runt-related transcription factor 2, bone sialoprotein, and osteopontin markers showed similar trends to those achieved in our work. Similar results were reported by Rabadan-Ros et al. [81], who evaluated the impact of a porous Si-Ca-P monophasic ceramic on osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells (*ahMSC*) in a 28-day study, obtaining an up-regulation of alkaline phosphatase, collagen type I, osteopontin, integrin-binding sialoprotein, and osteonectin expression, while runt-related transcription factor 2 and osteocalcin expression remained relatively unchanged along the assay. Considering the molecules necessary for the mineralization of the extracellular matrix, Runt is defined as a transcription factor in *Drosophila*, which has affinity with the  $\alpha$  subunit of Core Binding Factor Alpha (Cbfa). The three related genes called Core Binding Factor Alpha 1 (Cbfa1), Cbfa2, and Cbfa3 are capable of generating different proteins [82–84]. Cbfa1 (Runx2) is the specific transcription factor for osteogenesis (Runx2/AML3) and the determinant for the differentiation of mesenchymal cells toward osteoblastic lineage [85] under the stimulus of specific genes such as OC, ALP, BSP, collagen type I (Col 1), and Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) [86].

In this sense, the trend observed in RUNX2 expression in our study and in others analogous could be attributed to the fact that it is involved in multiple signal transduction pathways, and its activity is tightly regulated at both the transcriptional and posttranslational levels [87].



**Figure 10.** Quantitative real-time polymerase chain reaction results of osteogenic markers after 7 and 14 days of culture. The results are expressed as mean  $\pm$  SD. # Significant differences between the marked group at different time periods ( $p > 0.05$ ). No significant differences were observed between the groups in the same time period. (A) ALPL, alkaline phosphatase; (B) COL1A1, collagen type I; (C) RUNX2, runt-related transcription factor 2; (D) BGLAP, osteocalcin; (E) IBSP, integrin-binding sialoprotein; (F) SPARC, osteonectin; (G) SPP1, osteopontin.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Fabrication of Polymer-Based Porous 3D-Printed Scaffolds

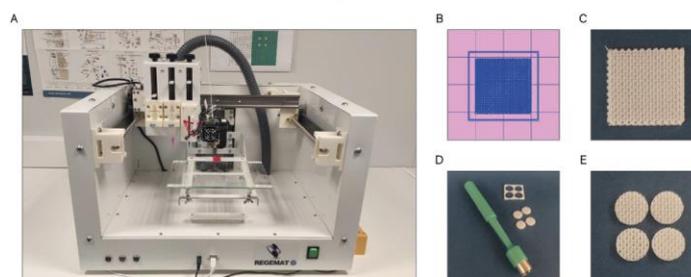
##### 3.1.1. Preparation of PCL Filaments Coated with $\beta$ -TCP Microparticles

The process used for the preparation of the poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ $\beta$ -TCP composite filaments, labeled as PCL/ $\beta$ -TCP, is described herein. Briefly, PCL (MW 50 kD) filaments of 1.75 mm in diameter and 150 mm in length were heated at 65 °C in hot water (bain-Marie) until the filament became flexible and changed its aspect from opaque white to completely

transparent. After this, the filament was coated manually bearing on a surface dusted with copious amounts of  $\beta$ -TCP powder previously mortared and sieved at 125  $\mu\text{m}$ . The collected coated filaments were dried at room temperature (RT) for 30 min before being fed into the printer extruder. It is worth mentioning that both the PCL (uncoated) and PCL/ $\beta$ -TCP filaments were weighed in order to estimate the final  $\beta$ -TCP microparticle concentration of 5 wt%. The average filament diameter was calculated from at least 20 measurements performed on different optical images acquired with a stereomicroscope.

### 3.1.2. Design and Printing of 3D Scaffolds with Controlled Porosity Using the Fused Deposition Modeling (FDM) Method

The scaffolds were designed with the software REGEMAT 3D Designer v1.4.4 and manufactured by the fused deposition modeling (FDM-3D) method using a REGEMAT 3D Bio V1<sup>®</sup> bioprinter (REG4Life, REGEMAT 3D, Granada, Spain) equipped with a glass bed and a 0.4 mm diameter nozzle (Figure 11A). Both the PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds dimensions were set to  $1.50 \times 20 \times 20$  mm (height  $\times$  width  $\times$  length) (Figure 11B,C) and printed using the same parameters (infill speed of 11 mm/s, layer height of 0.25 mm, pore size of 200  $\mu\text{m}$ , and printing temperature of 160  $^{\circ}\text{C}$ ). The number of perimeters and solid bottom/top layers was set to 0, allowing to obtain scaffolds with interconnected and open porosity. In order to enhance the reproducibility of the experiments and to reduce the variability between the samples, an 8 mm biopsy punch was used to prepare defined and reproducible scaffolds (Figure 11D), obtaining four disk-shaped scaffolds of  $8 \times 1.5$  mm (diameter  $\times$  height) per printed scaffold (Figure 11E), which complies with the recognized international standard ISO/FDIS 23317 [88].



**Figure 11.** (A) REGEMAT 3D Bio V1<sup>®</sup> bioprinter, (B) scaffold design with REGEMAT 3D Designer v1.4.4, (C) 3D-printed scaffolds of  $1.50 \times 20 \times 20$  mm (height  $\times$  width  $\times$  length), (D) disk obtention using an 8 mm biopsy punch, and (E) disk-shaped scaffolds of  $8 \times 1.5$  mm (diameter  $\times$  height).

Then, the scaffolds were rinsed with distilled water in an orbital shaker for 30 min at 250 rpm to remove any undesired dust contamination before being sterilized with a pulsed light system XeMaticA-Basic-1L (Steribeam, Kehl, Germany). The latter produces pulses ranging from infrared (IR) to ultraviolet (UV) light with 21% of UV content [89]. The effectiveness of the method was verified by incubating the samples for five days at 37  $^{\circ}\text{C}$  in test tubes containing 7 mL of sterile Tryptic Soy Broth (#T8907; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). This methodology is widely used for detecting the presence of microorganisms.

### 3.2. Characterization of the Composite Filaments and the 3D-Printed Scaffolds

#### 3.2.1. Morphological Characterization and Microanalysis of the Filaments and the 3D Scaffolds Scanning Electron Microscopy and Energy-Dispersive X-ray Analysis (SEM-EDX)

Morphological characterization of the filaments and the 3D-printed scaffolds was carried out by means of a digital camera (Axiocam 305 color) coupled to an optical microscope (Zeiss 415510), scanning electron microscopy (SEM; model JEOL-6100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)), and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX; Oxford INCA (Oxford

Instruments plc., Abington, Oxfordshire, U.K.). For SEM analysis, the samples were coated with gold, while for EDX analysis, they were carbon-coated to avoid spectrum overlaps with other elements.

#### Micro-Computed Tomography ( $\mu$ CT) Scaffold Imaging: Porosity and $\beta$ -TCP Particle Distribution

The scaffold porosity and the distribution of the  $\beta$ -TCP particles in the scaffold were detected using a Quantum GX2 micro-CT imaging system (PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA) at a voxel size of 72  $\mu$ m. Typically, three samples randomly selected were placed on a 35 mm diameter object bed. A complete scan (scanning parameters: energy = 90 kV; intensity = 88  $\mu$ A) was then performed. The scanned microstructural images were reconstructed using Invesalio 3.1 software ( $\text{©}2007\text{--}2017$ , Center for Information Technology Renato Archer CTI). The total porosity, pore size, and open porosity of each scaffold were analyzed. In order to obtain the total porosity  $p$ , the scaffold volume  $V_S$  was compared to the theoretical volume of the cylinder  $V_T$  using Equation (1) [10]:

$$p = 1 - (V_S/V_T) \quad (1)$$

#### 3.2.2. Protein Adhesion: Coomassie Brilliant Blue Test

The Coomassie Brilliant Blue test was used to determine protein adsorption on the surface of both the PCL and PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds. First, the scaffolds were immersed for 30 min in fetal bovine serum (FBS; #F7524, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to allow protein adhesion. Then, the excess solution was removed and the scaffolds were left to dry in an oven at 37  $^{\circ}$ C for 45 min. After drying, the scaffolds were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and immersed for 30 min in the Coomassie staining solution, which was prepared according to the manufacturer's instructions (Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye, #20278; Thermo Fisher, Rockford, IL, USA). Finally, the scaffolds were rinsed three times with a destaining solution containing methanol/acetic acid/distilled water (40/10/50, % v/v/v).

#### 3.2.3. In Vitro Degradation Kinetics

Scaffold degradation was assessed in vitro by measuring the weight loss of scaffolds. Typically, polymeric scaffolds were weighed and subsequently immersed in 2 mL of complete GM (DMEM) in 12-well plates, incubated at 37  $^{\circ}$ C, in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% relative humidity, for different time periods of 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days. Then, scaffolds were recovered from the medium, rinsed with deionized water, dried at 37  $^{\circ}$ C overnight, and re-weighed. The weight loss (WL) was calculated by applying the following equation:

$$WL\% = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad (2)$$

where  $W_0$  and  $W_d$  indicate the weight of the scaffold before and after the scheduled immersion time, respectively. Degradation experiments were performed, at least in triplicate, and each measurement was performed six times to obtain appropriate statistics.

#### 3.3. Isolation, Characterization and Culture of Adult Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (*ah*-BM-MSCs)

The *ah*-BM-MSCs were isolated and cultured as previously described [90,91] and characterized in accordance with the criteria established by the International Society for Cell Therapy (ISCT) [92] (data not shown). Briefly, three healthy patients scheduled for elective orthopedic surgery were recruited for this study. Informed consent was obtained from each of them. Bone marrow was collected by percutaneous direct aspiration from the iliac crest. The mononuclear cells were then separated from the bone marrow and washed using a SEPAX<sup>®</sup> S-100 device (Biosafe, Eysins, Switzerland). For more details related to the methodology and procedure applied, cell isolation, culture, and expansion of *ah*-BM-MSCs, please refer to previous publications [90,91]. After determining nucleated cells viability with trypan blue solution (#T8154; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for

initial expansion, the harvested cells were seeded at a density of  $3.75 \times 10^5$  mL in a 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Biofil®) with 10 mL of basic growth culture medium (GM) consisting of Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (#31885-023; Gibco, Bleiswijk, the Netherlands) incorporating 10% (*v/v*) inactivated fetal bovine serum (FBS) (#F7524, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 100 U/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin (#P4333, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and then incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% of relative humidity. After seven days, the culture medium was renewed, thus eliminating the non-adherent cells, including some hematopoietic cells, facilitating the identification and selection of the attached cells [93]. When 80–90% confluence was reached, cells were treated with 0.25% *w/v* trypsin/EDTA (#T4049, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for 5 min. The collected cells were then subcultured at a 1:3 ratio and expanded for future use. Passages 3 and 4 (P3-P4) were trypsinized and collected to be used in all subsequent in vitro assays.

All biological experiments were in full compliance with regulatory guidelines, and the experimental protocol was ethically reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of UCAM-Universidad Católica de Murcia (Authorized No CE051904) UCAM ethics committee (CE nº 052114).

### 3.3.1. *ah*-BM-MSC Characterization

Before performing the in vitro assays, the purity of the *ah*-BM-MSCs populations was assessed by flow cytometry (Beckman Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA; Software Navios). In order to characterize the cells, a pool of *ah*-BM-MSCs detached from different flasks was labeled with an MSC Phenotyping Kit (#130-095-198, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) and PE Anti-Rat CD44H mouse IgG2A antibody (R&D Systems), in order to quantify the expression of CD73, CD90, CD105, and CD44 markers.

### 3.3.2. Cell Seeding Methods

Prior to cell seeding, the scaffolds were conditioned with the culture medium and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% of relative humidity for 48 h.

For cell adhesion, proliferation, and viability assays, the *ah*-BM-MSCs were seeded onto the top of the PCL and PCL/β-TCP scaffolds at a density of  $5 \times 10^4$  cells cm<sup>-2</sup> in 48-well plates, taking as a positive control cells seeded onto tissue culture-treated polystyrene wells (TCPS; Sigma-Aldrich, Corning, NY, USA). For the cellular metabolic activity assay (AlamarBlue® Assay), the scaffolds were rigorously changed to a new 48 well-plate 24 h after seeding, in order to quantify solely the metabolic activity of the cells growing on the scaffolds. At this time, the cells adhered to the bottom of the polystyrene wells were counted and discarded. The mean total count of cells adhered to the bottom of the well plate was  $2 \times 10^4$  cells cm<sup>-2</sup>, giving an approximate value of  $3 \times 10^4$  cells adhered to the scaffold.

To perform osteogenic differentiation studies, the scaffolds were placed in 0.4 µm pore culture well inserts (Falcon®) and the *ah*-BM-MSCs were seeded at the bottom of the wells at a density of  $5 \times 10^3$  cells cm<sup>-2</sup>. Cells seeded onto tissue culture-treated polystyrene (TCP) wells were taken as a positive control. From day 7, a set of at least three plates initially cultured in growth medium (GM) were replaced by osteogenic differentiation medium (OM) (OsteoMAX-XF™ Differentiation Medium; #SCM121, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Thus, the cellular differentiation induced by all of the scaffolds researched in the present study growing either on GM and OM were characterized in order to assess their effectiveness. The media were changed twice a week for all of the experiments performed.

## 3.4. Cell Viability, Adhesion, and Proliferation Assays

### 3.4.1. Cytotoxicity Assay

The viability of *ah*-BM-MSCs was evaluated using a resazurin-based cell viability assay (AlamarBlue®, #DAL1100, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) on days 1 and 3 after seeding. Briefly, at different time periods of the study, fresh medium (500 µL) containing

10% (*v/v*) AlamarBlue<sup>®</sup> reagent was added to each well and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% of relative humidity for 4 h. During this time, the culture plate was wrapped with aluminum foil in order to provide a dark environment. Then, 150 µL aliquots of each well were transferred to a black-walled 96-well plate and fluorescence was measured with a Synergy MX ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) at excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively.

#### 3.4.2. Cellular Metabolic Activity Assay

AlamarBlue<sup>®</sup> was used according to the manufacturer's instructions to assess the metabolic activity of the *ah*-BM-MSCs on days 1, 3, 7, and 14 after seeding. In this assay, we only evaluated the metabolic activity of the cells adhered to the scaffolds (cells growing on the well plate are counted and discarded). At each time period of the study, the fluorescence was measured with a Synergy MX ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) at excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively.

#### 3.5. Osteoblastic Differentiation Assays

##### 3.5.1. Alkaline Phosphatase (ALP) Activity

The ALP activity of the *ah*-BM-MSCs was assessed at 7 and 14 days after seeding using an Alkaline Phosphatase Detection Kit (#SCR004, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). At each time period of the study, cells were detached and an aliquot of  $2 \times 10^4$  cells (per sample) was treated following the manufacturer's instructions in order to quantify the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate into phosphate and p-nitrophenol. The reaction affords a yellow-colored by-product that is proportional to the amount of ALP present within the reaction. At each time period of the study, the absorbance was measured at a wavelength of 405 nm in a Synergy MX ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

##### 3.5.2. In Vitro Mineralization of Alizarin Red Solution (ARS) Staining

The in vitro mineralization was evaluated by the specific binding of Alizarin Red Solution (ARS) staining to calcium deposits at 7 and 14 days after seeding using an Osteogenesis Assay Kit (#ECM815; Millipore, Billerica, MA, USA). Briefly, at each time period of the study, the *ah*-BM-MSCs were stained with ARS and visualized using an optical microscope (Motic AE2000, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Then, to quantify matrix mineralization, the samples were treated following the manufacturer's instructions, and the optical density (OD) at 405 nm was measured in a Synergy MX ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

##### 3.5.3. Monitoring Surface Markers in the Cells Seeded on the Scaffolds: Cluster of Differentiation (CD)

In order to characterize the *ah*-BM-MSCs, quantification of cell surface markers CD73, CD90, CD105 was performed by flow cytometry (Beckman Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA; Software Navios). First, the cells were detached with TrypLE<sup>™</sup> Select Enzyme (1X) (#11598846, Gibco, Bleiswijk, the Netherlands) and collected, using  $2 \times 10^5$  cells for each experimental condition. Then, the cells were washed with PBS and labeled with an MSC Phenotyping Kit (#130-095-198, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), consisting of the following fluorochromes: Allophycocyanin (APC) conjugated with CD73, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to CD90, phycoerythrin (PE) conjugated to CD105, and peridinin-chlorophyll cy5.5 conjugated with CD14/CD20/CD34/CD45. Additionally, a test tube containing cells labeled with the cocktail isotype was used as a control. To check cell viability, 100 µL of the binding buffer (1:10 in H<sub>2</sub>O), 5 µL of Annexin V antibody, and 5 µL of propidium iodide (IP) were added to a tube labeled as Annexin V (Immuno Step).

All of the test tubes were kept at 4 °C (in ice) for 15 min in a dark environment, and washed with 1000 µL of PBS EDTA, except for the Annexin V tube, which was washed with a binding buffer. Then, the tubes were centrifuged (300× *g*, 10 min, 4 °C) and the supernatant was discarded. Finally, the labeled pellet was resuspended with 500 µL of PBS/EDTA and the samples were analyzed by flow cytometry.

#### 3.5.4. Osteogenic Gene Expression: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Assay

qRT-PCR assay was performed to analyze the expression of alkaline phosphatase (ALPL), collagen type I (COL1A1), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (BGLAP), integrin-binding sialoprotein (IBSP), osteonectin (SPARC), and osteopontin (SPP1). The total RNA was extracted from cells using an RNAqueous Micro Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, followed by reverse transcription of mRNA with an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). The quantitative PCR was performed using SYBR Premix ExTaq (Takara) in QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Specific primers for mRNA were purchased from Qiagen (QuantiTech Primer Assays, Hilden, Germany). All measurements were carried out at least in triplicate. The Ct values were converted to relative quantification using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method by normalizing to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) (Qiagen, Hilden, Germany).

#### 3.6. Statistic

All data are represented as the mean  $\pm$  SD. The statistical significance was determined by a two-way ANOVA using GraphPrism 9.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) for Windows. Comparisons between groups were evaluated with *t*-tests, with the significance level being  $p < 0.05$ .

### 4. Conclusions

To conclude, in the present work, we presented an innovative strategy of combining polymers and biofriendly ceramics as a platform for bone tissue engineering biomaterials design. We introduced a novel route to fabricate hybrid 3D-printed porous composite scaffolds with open and interconnected porosity based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) microparticles. We studied in detail their influence in the process of adhesion, proliferation, and osteoblastic differentiation of multipotent adult human bone marrow mesenchymal stem cells (*ah*-BM-MSCs). We demonstrated their biological response, bioactivity, and biocompatibility via primary mesenchymal stem cell cultures by studying their effects on cytotoxicity (viability) and extracellular matrix production. The mineralization and alkaline phosphatase (ALP) assays revealed that osteogenic differentiation of the *ah*-BM-MSCs increased in the presence of the 3D-printed PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds if compared to both the control group and the native PCL scaffolds, which demonstrates the effective interactions between the  $\beta$ -TCP microparticles and cells. The latter was also confirmed by quantifying the percentage of mesenchymal marker loss (flow cytometry) and monitoring the gene expression levels (qRT-PCR) of most of the proteins involved in the ossification process. The calcium ions released are probably the main responsibility of metabolic activity and cellular differentiation. Our findings suggest that similar bio-inspired hybrid composite materials would be excellent candidates for osteoinductive and osteogenic medical-grade biomaterials.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222011216/s1>, Figure S1: SEM micrographs of the (A) native PCL and (B) PCL/ $\beta$ -TCP filaments. (C) Image of both filaments taken with a stereomicroscope at 3X magnification. The  $\beta$ -TCP microparticles were stained with nigrosine to get clear and highly defined images. (D) Micrograph showing a magnification of the  $\beta$ -TCP microparticles coating the filament and (E) its corresponding EDX spectrum. The researched area is depicted as a yellow square.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.L.-G., C.Z.-L. and L.M.-O.; methodology, I.L.-G., L.M.-O. and J.A.G.-H.; software, I.L.-G.; investigation and validation, I.L.-G., C.Z.-L., L.M.-O., J.A.G.-H., E.T.B. and M.I.S.-L.; formal analysis, I.L.-G., C.Z.-L. and L.M.-O.; data curation, L.M.-O., C.Z.-L. and J.A.G.-H.; writing—original draft preparation, I.L.-G., C.Z.-L., J.A.G.-H. and L.M.-O.; writing—review and editing, I.L.-G., C.Z.-L., L.M.-O., J.A.G.-H., E.T.B. and M.I.S.-L.; visualization, I.L.-G., C.Z.-L. and L.M.-O.; supervision, L.M.-O.; project administration, I.L.-G. and C.Z.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of UCAM-Universidad Católica de Murcia (Authorized No CE051904) and UCAM ethics committee (CE n° 052114).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study have been disclosed in the main text.

**Acknowledgments:** The authors of this study would like to thank the Genomic Platform of IMIB-Arrixaca, Murcia (Spain), and especially Alberto Baroja-Mazo for his invaluable technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Rodrigues, M.T.; Gonçalves, A.I.; Babo, P.S.; Gomez-Florit, M.; Reis, R.L.; Gomes, M.E. Bioinspired materials and tissue engineering approaches applied to the regeneration of musculoskeletal tissues. In *Engineering Strategies for Regenerative Medicine*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 73–105.
- Diaz-Arca, A.; Ros-Tarraga, P.; Tome, M.J.M.; De Aza, A.H.; Meseguer-Olmo, L.; Mazon, P.; De Aza, P.N. Micro-/Nano-Structured Ceramic Scaffolds That Mimic Natural Cancellous Bone. *Materials* **2021**, *14*, 1439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, X.; Wang, L.; Fan, Y.; Feng, Q.; Cui, F.Z.; Watari, F. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 2424–2435. [[CrossRef](#)]
- Baino, F.; Novajra, G.; Vitale-Brovarone, C. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ribas, R.G.; Schatkoski, V.M.; Montanheiro, T.L.D.A.; de Menezes, B.R.C.; Stegemann, C.; Leite, D.M.G.; Thim, G.P. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 21051–21061. [[CrossRef](#)]
- Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Dean, D.D.; Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* **1996**, *17*, 137–146. [[CrossRef](#)]
- Bosetti, M.; Cannas, M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3873–3879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wubneh, A.; Tsekoura, E.K.; Ayranci, C.; Uludag, H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2018**, *80*, 1–30. [[CrossRef](#)]
- Qu, H.; Fu, H.; Han, Z.; Sun, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26252–26262. [[CrossRef](#)]
- Bruyas, A.; Lou, F.; Stahl, A.M.; Gardner, M.; Maloney, W.; Goodman, S.; Yang, Y.P. Systematic characterization of 3D-printed PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds for biomedical devices and bone tissue engineering: Influence of composition and porosity. *J. Mater. Res.* **2018**, *33*, 1948–1959. [[CrossRef](#)]
- López-Álvarez, M.; Rodríguez-Valencia, C.; Serra, J.; González, P. Bio-inspired Ceramics: Promising Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Procedia Eng.* **2013**, *59*, 51–58. [[CrossRef](#)]
- Lugo, G.J.; Mazón, P.; De Aza, P.N. Phase transitions in single phase Si-Ca-P-based ceramic under thermal treatment. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2015**, *35*, 3693–3700. [[CrossRef](#)]
- Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A.M.; Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 403–440. [[CrossRef](#)]
- Hild, N.; Schneider, O.D.; Mohn, D.; Luechinger, N.A.; Koehler, F.M.; Hofmann, S.; Vetsch, J.R.; Thimm, B.W.; Muller, R.; Stark, W.J. Two-layer membranes of calcium phosphate/collagen/PLGA nanofibres: In vitro biomineralisation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale* **2011**, *3*, 401–409. [[CrossRef](#)]
- Shi, C.; Yuan, Z.; Han, F.; Zhu, C.; Li, B. Polymeric biomaterials for bone regeneration. *Ann. Jt.* **2016**, *1*, 27. [[CrossRef](#)]
- Carrodegua, R.G.; De Aza, S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 3536–3546. [[CrossRef](#)]
- Kim, H.W.; Kim, H.E.; Knowles, J.C. Production and Potential of Bioactive Glass Nanofibers as a Next-Generation Biomaterial. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 1529–1535. [[CrossRef](#)]

18. Xie, J.; Blough, E.R.; Wang, C.H. Submicron bioactive glass tubes for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 811–819. [\[CrossRef\]](#)
19. Yoshimoto, H.; Shin, Y.M.; Terai, H.; Vacanti, J.P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2077–2082. [\[CrossRef\]](#)
20. Lee, S.; Choi, D.; Shim, J.H.; Nam, W. Efficacy of three-dimensionally printed polycaprolactone/ $\beta$  tricalcium phosphate scaffold on mandibular reconstruction. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4979. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Lee, J.S.; Park, T.H.; Ryu, J.Y.; Kim, D.K.; Oh, E.J.; Kim, H.M.; Shim, J.H.; Yun, W.S.; Huh, J.B.; Moon, S.H.; et al. Osteogenesis of 3D-Printed PCL/TCP/bdECM Scaffold Using Adipose-Derived Stem Cells Aggregates; An Experimental Study in the Canine Mandible. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5409. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Lin, H.R.; Yeh, Y.J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro studies. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2004**, *71*, 52–65. [\[CrossRef\]](#)
23. Turco, G.; Marsich, E.; Bellomo, F.; Semeraro, S.; Donati, I.; Brun, F.; Grandolfo, M.; Accardo, A.; Paoletti, S. Alginate/Hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: A trabecular structure with high and isotropic connectivity. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1575–1583. [\[CrossRef\]](#)
24. Ravichandran, R.; Venugopal, J.R.; Sundarajan, S.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomaterials* **2012**, *33*, 846–855. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ruhe, P.Q.; Hedberg, E.L.; Padron, N.T.; Spauwen, P.H.; Jansen, J.A.; Mikos, A.G. rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85-A* (Suppl. 3), 75–81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Meseguer-Olmo, L.; Bernabeu-Esclapez, A.; Ros-Martinez, E.; Sanchez-Salcedo, S.; Padilla, S.; Martin, A.I.; Vallet-Regí, M.; Clavel-Sainz, M.; Lopez-Prats, F.; Meseguer-Ortiz, C.L. In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 1104–1113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. LeGeros, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2002**, *395*, 81–98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Burg, K.J.L.; Porter, S.; Kellam, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2347–2359. [\[CrossRef\]](#)
29. Wang, Q.; Ye, W.; Ma, Z.; Xie, W.; Zhong, L.; Wang, Y.; Rong, Q. 3D printed PCL/ $\beta$ -TCP cross-scale scaffold with high-precision fiber for providing cell growth and forming bones in the pores. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *127*, 112197. [\[CrossRef\]](#)
30. Kumar, P.; Dehiya, B.S.; Sindhu, A. Bioceramics for Hard Tissue Engineering Applications: A Review. *Int. J. Appl. Eng. Res.* **2018**, *13*, 2744–2752.
31. Urist, M.R.; Lietze, A.; Dawson, E. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1984**, *187*, 277–280.
32. Ginebra, M.P.; Traykova, T.; Planell, J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J. Control. Release* **2006**, *113*, 102–110. [\[CrossRef\]](#)
33. Li, X.; Xie, J.; Yuan, X.; Xia, Y. Coating electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Langmuir* **2008**, *24*, 14145–14150. [\[CrossRef\]](#)
34. Liu, W.; Yeh, Y.C.; Lipner, J.; Xie, J.; Sung, H.W.; Thomopoulos, S.; Xia, Y. Enhancing the stiffness of electrospun nanofiber scaffolds with a controlled surface coating and mineralization. *Langmuir* **2011**, *27*, 9088–9093. [\[CrossRef\]](#)
35. Bae, E.B.; Park, K.H.; Shim, J.H.; Chung, H.Y.; Choi, J.W.; Lee, J.J.; Kim, C.H.; Jeon, H.J.; Kang, S.S.; Huh, J.B. Efficacy of rhBMP-2 Loaded PCL/ $\beta$ -TCP/bdECM Scaffold Fabricated by 3D Printing Technology on Bone Regeneration. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 2876135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Perez, R.A.; Kim, H.W.; Ginebra, M.P. Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements. *J. Tissue Eng.* **2012**, *3*, 2041731412439555. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Ruoslahti, E. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **1984**, *3*, 43–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Bachman, H.; Nicosia, J.; Dysart, M.; Barker, T.H. Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses. *Adv. Wound Care* **2015**, *4*, 501–511. [\[CrossRef\]](#)
39. Pirraco, R.P.; Marques, A.P.; Reis, R.L. Cell interactions in bone tissue engineering. *J. Cell Mol. Med.* **2010**, *14*, 93–102. [\[CrossRef\]](#)
40. Reichert, J.C.; Wullschlegel, M.E.; Cipitria, A.; Lienau, J.; Cheng, T.K.; Schutz, M.A.; Duda, G.N.; Noth, U.; Eulert, J.; Hutmacher, D.W. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *Int. Orthop.* **2011**, *35*, 1229–1236. [\[CrossRef\]](#)
41. Shin, Y.M.; Park, J.-S.; Jeong, S.I.; An, S.-J.; Gwon, H.-J.; Lim, Y.-M.; Nho, Y.-C.; Kim, C.-Y. Promotion of human mesenchymal stem cell differentiation on bioresorbable polycaprolactone/biphase calcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2014**, *19*, 341–349. [\[CrossRef\]](#)
42. Park, S.H.; Park, S.A.; Kang, Y.G.; Shin, J.W.; Park, Y.S.; Gu, S.R.; Wu, Y.R.; Wei, J.; Shin, J.W. PCL/ $\beta$ -TCP Composite Scaffolds Exhibit Positive Osteogenic Differentiation with Mechanical Stimulation. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *14*, 349–358. [\[CrossRef\]](#)
43. Yang, D.H.; Heo, G.M.; Park, H.J.; Oh, H.K.; Kook, M.S. Comparative Effectiveness of Surface Functionalized Poly-epsilon-Caprolactone Scaffold and  $\beta$ -TCP Mixed PCL Scaffold for Bone Regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2020**, *20*, 5349–5355. [\[CrossRef\]](#)

44. Zhu, W.; Ma, X.; Gou, M.; Mei, D.; Zhang, K.; Chen, S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *40*, 103–112. [[CrossRef](#)]
45. Chen, M.; Gao, S.; Wang, P.; Li, Y.; Guo, W.; Zhang, Y.; Wang, M.; Xiao, T.; Zhang, Z.; Zhang, X.; et al. The application of electrospinning used in meniscus tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2018**, *29*, 461–475. [[CrossRef](#)]
46. Izadyari Aghmiami, A.; Heidari Keshel, S.; Sefat, F.; AkbarzadehKheyavi, A. Fabrication of 3D hybrid scaffold by combination technique of electrospinning-like and freeze-drying to create mechanotransduction signals and mimic extracellular matrix function of skin. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *120*, 111752. [[CrossRef](#)]
47. Chen, W.; Zhou, H.; Tang, M.; Weir, M.D.; Bao, C.; Xu, H.H. Gas-foaming calcium phosphate cement scaffold encapsulating human umbilical cord stem cells. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18*, 816–827. [[CrossRef](#)]
48. Moroni, L.; de Wijn, J.R.; van Blitterswijk, C.A. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials* **2006**, *27*, 974–985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Atala, A.; Yoo, J.J. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015.
50. Williams, D.F. *The Williams Dictionary of Biomaterials*; Liverpool University Press: Liverpool, UK, 1999.
51. Shie, M.Y.; Ding, S.J. Integrin binding and MAPK signal pathways in primary cell responses to surface chemistry of calcium silicate cements. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6589–6606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhu, X.D.; Fan, H.S.; Zhao, C.Y.; Lu, J.; Ikoma, T.; Tanaka, J.; Zhang, X.D. Competitive adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on characterized calcium phosphates by polyacrylamide gel electrophoresis method. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 2243–2249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hung, C.J.; Hsu, H.I.; Lin, C.C.; Huang, T.H.; Wu, B.C.; Kao, C.T.; Shie, M.Y. The role of integrin  $\alpha$ v in proliferation and differentiation of human dental pulp cell response to calcium silicate cement. *J. Endod.* **2014**, *40*, 1802–1809. [[CrossRef](#)]
54. Sukanya, V.S.; Mohanan, P.V. Degradation of Poly(epsilon-caprolactone) and bio-interactions with mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *163*, 107–118.
55. Huang, S.H.; Hsu, T.T.; Huang, T.H.; Lin, C.Y.; Shie, M.Y. Fabrication and characterization of polycaprolactone and tricalcium phosphate composites for tissue engineering applications. *J. Dent. Sci.* **2017**, *12*, 33–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yeo, A.; Rai, B.; Sju, E.; Cheong, J.J.; Teoh, S.H. The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: An in vitro and in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *84*, 208–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lei, Y.; Rai, B.; Ho, K.H.; Teoh, S.H. In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone—20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 293–298. [[CrossRef](#)]
58. Pena, J.; Corrales, T.; Izquierdo-Barba, I.; Serrano, M.C.; Portoles, M.T.; Pagani, R.; Vallet-Regi, M. Alkaline-treated poly(epsilon-caprolactone) films: Degradation in the presence or absence of fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *76*, 788–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Liu, S.; Jin, F.; Lin, K.; Lu, J.; Sun, J.; Chang, J.; Dai, K.; Fan, C. The effect of calcium silicate on in vitro physiochemical properties and in vivo osteogenesis, degradability and bioactivity of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics. *Biomed. Mater.* **2013**, *8*, 025008. [[CrossRef](#)]
60. Khan, A.F.; Saleem, M.; Afzal, A.; Ali, A.; Khan, A.; Khan, A.R. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *35*, 245–252. [[CrossRef](#)]
61. Mushahary, D.; Spittler, A.; Kasper, C.; Weber, V.; Charwat, V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A* **2018**, *93*, 19–31. [[CrossRef](#)]
62. Maxim, M.A.; Soritau, O.; Baciut, M.; Bran, S.; Baciut, G. The role of dental stem cells in regeneration. *Clujul Med.* **2015**, *88*, 479–482. [[CrossRef](#)]
63. Baghaei, K.; Hashemi, S.M.; Tokhanbigli, S.; Asadi Rad, A.; Assadzadeh-Aghdaei, H.; Sharifian, A.; Zali, M.R. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* **2017**, *10*, 208–213.
64. Kim, Y.B.; Kim, G. Functionally graded PCL/ $\beta$ -TCP biocomposites in a multilayered structure for bone tissue regeneration. *Appl. Phys. A* **2012**, *108*, 949–959. [[CrossRef](#)]
65. Petit, C.; Tulliani, J.M.; Tadier, S.; Meille, S.; Chevalier, J.; Palmero, P. Novel calcium phosphate/PCL graded samples: Design and development in view of biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *97*, 336–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yuan, B.; Wang, Z.; Zhao, Y.; Tang, Y.; Zhou, S.; Sun, Y.; Chen, X. In Vitro and In Vivo Study of a Novel Nanoscale Demineralized Bone Matrix Coated PCL/ $\beta$ -TCP Scaffold for Bone Regeneration. *Macromol. Biosci.* **2021**, *21*, e2000336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Patrício, T.; Domingos, M.; Gloria, A.; Bártolo, P. Characterisation of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering. *Procedia CIRP* **2013**, *5*, 110–114. [[CrossRef](#)]
68. Dou, Y.; Fa, X.; Gu, Y.; Liang, L.; Wen, J.; Qin, A.; Ou, J. Fabrication and characterization of PVA/CS-PCL/gel multi-scale electrospun scaffold: Simulating extracellular matrix for enhanced cellular infiltration and proliferation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2020**, *31*, 729–746. [[CrossRef](#)]
69. Li, Z.; Wu, N.; Cheng, J.; Sun, M.; Yang, P.; Zhao, F.; Zhang, J.; Duan, X.; Fu, X.; Zhang, J.; et al. Biomechanically, structurally and functionally meticulously tailored polycaprolactone/silk fibroin scaffold for meniscus regeneration. *Theranostics* **2020**, *10*, 5090–5106. [[CrossRef](#)]
70. Kao, C.T.; Lin, C.C.; Chen, Y.W.; Yeh, C.H.; Fang, H.Y.; Shie, M.Y. Poly(dopamine) coating of 3D printed poly(lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *56*, 165–173. [[CrossRef](#)]

71. Zernik, J.; Twarog, K.; Upholt, W.B. Regulation of alkaline phosphatase and  $\alpha 2(I)$  procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation* **1990**, *44*, 207–215. [[CrossRef](#)]
72. Fishman, W.H.; Ghosh, N.K. Isoenzymes of Human Alkaline Phosphatase. In *Advances in Clinical Chemistry Volume 10*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1967; pp. 255–370.
73. Jansen, J.H.; van der Jagt, O.P.; Punt, B.J.; Verhaar, J.A.; van Leeuwen, J.P.; Weinans, H.; Jahr, H. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: An in vitro study. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2010**, *11*, 188. [[CrossRef](#)]
74. Gao, P.; Zhang, H.; Liu, Y.; Fan, B.; Li, X.; Xiao, X.; Lan, P.; Li, M.; Geng, L.; Liu, D.; et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23367. [[CrossRef](#)]
75. Chen, M.; Le, D.Q.; Kjems, J.; Bunger, C.; Lysdahl, H. Improvement of Distribution and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Hyaluronic Acid and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate-Coated Polymeric Scaffold In Vitro. *Biores. Open Access* **2015**, *4*, 363–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Jensen, J.; Kraft, D.C.; Lysdahl, H.; Foldager, C.B.; Chen, M.; Kristiansen, A.A.; Roling, J.H.; Bunger, C.E. Functionalization of polycaprolactone scaffolds with hyaluronic acid and  $\beta$ -TCP facilitates migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21*, 729–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Gurel Pekoz, G.; Ramazanoglu, M.; Schlegel, K.A.; Kok, F.N.; Torun Kose, G. Role of STRO-1 sorting of porcine dental germ stem cells in dental stem cell-mediated bone tissue engineering. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 607–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Mafi, P.; Hindocha, S.; Mafi, R.; Griffin, M.; Khan, W.S. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization—A systematic review of the literature. *Open Orthop. J.* **2011**, *5* (Suppl. 2), 253–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Feng-Juan, L.V.; Tuan, R.S.; Cheung, K.M.; Leung, V.Y. Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1408–1419.
80. Viti, F.; Landini, M.; Mezzelani, A.; Petecchia, L.; Milanesi, L.; Scaglione, S. Osteogenic Differentiation of MSC through Calcium Signaling Activation: Transcriptomics and Functional Analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Rabadan-Ros, R.; Revilla-Nuin, B.; Mazón, P.; Aznar-Cervantes, S.; Ros-Tarraga, P.; De Aza, P.N.; Meseguer-Olmo, L. Impact of a Porous Si-Ca-P Monophasic Ceramic on Variation of Osteogenesis-Related Gene Expression of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 46.
82. Karsenty, G.; Ducy, P.; Starbuck, M.; Priemel, M.; Shen, J.; Geoffroy, V.; Amling, M. Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone* **1999**, *25*, 107–108. [[CrossRef](#)]
83. Ducy, P. CBFA1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev. Dyn.* **2000**, *219*, 461–471. [[CrossRef](#)]
84. Ziros, P.G.; Basdra, E.K.; Papavassiliou, A.G. Runx2: Of bone and stretch. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 1659–1663. [[CrossRef](#)]
85. Marie, P.J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *473*, 98–105. [[CrossRef](#)]
86. Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A.L.; Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* **1997**, *89*, 747–754. [[CrossRef](#)]
87. Franceschi, R.T.; Xiao, G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J. Cell Biochem.* **2003**, *88*, 446–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. International Organization for Standardization [ISO]. *Implants for Surgery—In Vitro Evaluation for Apatite-Forming Ability of Implant Materials*; ISO/FDIS Standard No. 23317; ISO: London, UK, 2014.
89. Cudemos, E.; Izquier, A.; Medina-Martínez, M.S.; Gómez-López, V.M. Effects of shading and growth phase on the microbial inactivation by pulsed light. *Czech J. Food Sci.* **2013**, *31*, 189–193. [[CrossRef](#)]
90. De Aza, P.N.; Garcia-Bernal, D.; Cragnolini, F.; Velasquez, P.; Meseguer-Olmo, L. The effects of Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ceramics on adult human mesenchymal stem cell viability, adhesion, proliferation, differentiation and function. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 4009–4020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Meseguer-Olmo, L.; Aznar-Cervantes, S.; Mazon, P.; De Aza, P.N. “In vitro” behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> system. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 3003–3014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Mauney, J.R.; Blumberg, J.; Pirun, M.; Volloch, V.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 81–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## ANEXO 2. Evaluation of the In Vitro Antimicrobial Efficacy against *Staphylococcus aureus* and *epidermidis* of a Novel 3D-Printed Degradable Drug Delivery System Based on Polycaprolactone/Chitosan/Vancomycin—Preclinical Study



pharmaceutics



Article

### Evaluation of the In Vitro Antimicrobial Efficacy against *Staphylococcus aureus* and *epidermidis* of a Novel 3D-Printed Degradable Drug Delivery System Based on Polycaprolactone/Chitosan/Vancomycin—Preclinical Study

Iván López-González <sup>1</sup>, Ana Belén Hernández-Heredia <sup>2</sup>, María Isabel Rodríguez-López <sup>2</sup>, David Auñón-Calles <sup>2</sup>, Mohamed Boudifa <sup>3</sup>, José Antonio Gabaldón <sup>2,\*</sup> and Luis Meseguer-Olmo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Tissue Regeneration and Repair Group: Orthobiology, Biomaterials and Tissue Engineering, UCAM—Universidad Católica de Murcia, Campus de los Jerónimos 135, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain; ilopez27@ucam.edu

<sup>2</sup> Molecular Recognition and Encapsulation Research Group (REM), Health Sciences Department, UCAM—Universidad Católica de Murcia, Campus de los Jerónimos 135, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain; abhernandez@ucam.edu (A.B.H.-H.); mirodriguez@ucam.edu (M.I.R.-L.); daunon@ucam.edu (D.A.-C.)

<sup>3</sup> CRITT—Matériaux Innovation, 9 Rue Claude Chrétien, Campus Sup Ardenne, 08000 Charleville-Mézières, France; m.boudifa@critt-mi.com

\* Correspondence: jagabaldon@ucam.edu (J.A.G.); lmeseguer@ucam.edu (L.M.-O.); Tel.: +34-968-278800 (L.M.-O.)



**Citation:** López-González, I.; Hernández-Heredia, A.B.; Rodríguez-López, M.I.; Auñón-Calles, D.; Boudifa, M.; Gabaldón, J.A.; Meseguer-Olmo, L. Evaluation of the In Vitro Antimicrobial Efficacy against *Staphylococcus aureus* and *epidermidis* of a Novel 3D-Printed Degradable Drug Delivery System Based on Polycaprolactone/Chitosan/Vancomycin—Preclinical Study. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1763. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061763>

Academic Editor: Ana Isabel Fernandes

Received: 6 May 2023

Revised: 10 June 2023

Accepted: 14 June 2023

Published: 18 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

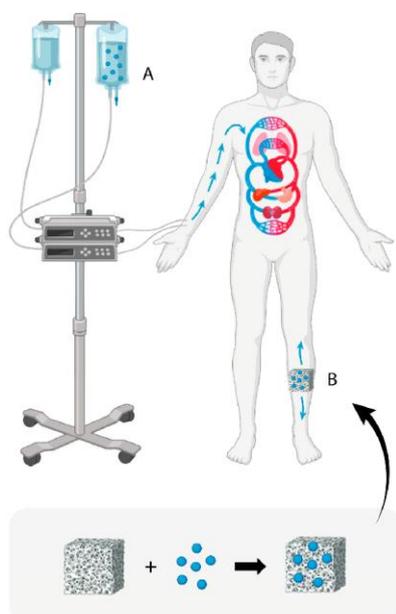
**Abstract:** Acute and chronic bone infections, especially those caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), remains a major complication and therapeutic challenge. It is documented that local administration of vancomycin offers better results than the usual routes of administration (e.g., intravenous) when ischemic areas are present. In this work, we evaluate the antimicrobial efficacy against *S. aureus* and *S. epidermidis* of a novel hybrid 3D-printed scaffold based on polycaprolactone (PCL) and a chitosan (CS) hydrogel loaded with different vancomycin (Van) concentrations (1, 5, 10, 20%). Two cold plasma treatments were used to improve the adhesion of CS hydrogels to the PCL scaffolds by decreasing PCL hydrophobicity. Vancomycin release was measured by means of HPLC, and the biological response of *ah*-BM-MSCs growing in the presence of the scaffolds was evaluated in terms of cytotoxicity, proliferation, and osteogenic differentiation. The PCL/CS/Van scaffolds tested were found to be biocompatible, bioactive, and bactericide, as demonstrated by no cytotoxicity (LDH activity) or functional alteration (ALP activity, alizarin red staining) of the cultured cells and by bacterial inhibition. Our results suggest that the scaffolds developed would be excellent candidates for use in a wide range of biomedical fields such as drug delivery systems or tissue engineering applications.

**Keywords:** 3D printing; hybrid scaffold; polycaprolactone; chitosan; vancomycin; mesenchymal stem cells; tissue engineering; drug delivery systems (DDSs); osteomyelitis

### 1. Introduction

Bone infections, such as osteomyelitis, remain a major clinical challenge in the field of bone surgery due to their serious rate of mortality and morbidity [1]. The most common causative species of surgical site infections and medical device-associated infections are the opportunistic Gram-positive staphylococci ( $\approx 75\%$  of cases), particularly *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [2,3]. In terms of pathogenesis, osteomyelitis is complex and varied, with bacteria reaching the bone in two ways: (i) endogenously via blood or originating from another nearby or distant source of infection (hematogenous osteomyelitis); and (ii) exogenously through direct inoculation, contamination of an open trauma, or postsurgical procedures [4].

The traditional treatment for chronic osteomyelitis includes extensive resection of the infected tissue, repair of the bone defect, and intravenous and local administration of antibiotics over long periods of time [5,6] (Figure 1A). In more specific cases such as infections associated with the implantation of prosthetic materials (hip, knee, and shoulder prosthesis) or osteosynthesis materials for fracture stabilization (plates, screws, pins, etc.), as a first step, treatment requires the simultaneous removal of the implant and intravenous and local antibiotherapy maintenance until normalization of biochemical parameters, as well as the performance of osteoarticular reconstruction surgery as required by the case [5].



**Figure 1.** Schematic representation of current antibiotic treatment strategies used to control bone infections (blue spheres: antibiotics; (A): intravenous route; (B): implantation of a local drug delivery system (DDS) fabricated by loading a scaffold with antibiotics).

Another strategy for the local treatment of chronic bone infections has been based on the administration of antibiotics by means of implantation of drug delivery systems (DDSs) at the site of infection (Figure 1B). One of the most used DDSs for the treatment of osteomyelitis have been antibiotic-loaded poly(methyl methacrylate) (PMMA) beads [7,8]. PMMA, also referred to as (acrylic) bone cement, is a non-resorbable biomaterial that works by slowly releasing antibiotics (generally gentamicin and vancomycin) over time, which can help to eradicate the bacteria causing the infection [9,10]. Despite having been used for decades in clinical practice, PMMA beads or blocks are far from being an ideal antibiotic carrier. The non-degradability of this biomaterial requires a second surgery to remove the beads 2 or 3 weeks after implantation [11].

Vancomycin (Van) is the most commonly used antibiotic in treatment of infections in arthroplasty surgery and chronic osteomyelitis of any etiology [10]. This glycopeptide antibiotic acts primarily as a cell wall synthesis inhibitor in susceptible organisms. It binds

rapidly and irreversibly to the cell wall of susceptible bacteria, inhibiting the synthesis of peptidoglycan, which forms the structure of the cell wall [12,13].

Polycaprolactone (PCL) is a synthetic polymer that has been commonly used in 3D-printing applications as a scaffolding component for bone and cartilage reconstruction [14–16]. Among its main advantages, we find its biocompatibility, biodegradability, good mechanical properties, and its low melting temperature ( $\approx 60$  °C), which makes it more versatile than other synthetic polymers used for 3D printing applications [17]. However, the 3D printing temperatures used to fabricate well-defined scaffolds with controlled architecture are around 120–160 °C, which makes it impossible to combine them with cells, growth factors, or other bioactive molecules during the printing process [18,19]. On the other hand, PCL lacks natural motifs that provide specific binding sites for cells that facilitate tissue integration [20]. Because of this, different strategies have been developed to overcome PCL native hydrophobicity, such as surface modification using NaOH treatment or its combination with other synthetic or naturally derived materials (hydrogels) to create hybrid scaffolds with enhanced properties [21–24]. Synthetic and naturally derived hydrogels have been widely used for different biomedical applications due to their ability to encapsulate cells, drugs, growth factors, or other bioactive molecules [25,26]. Naturally derived hydrogels principally include collagen, chitosan, alginate, silk fibroin, gelatine, cellulose, hyaluronic acid, and hydrogels derived from decellularized tissues [27].

Chitosan (CS) is a naturally derived semicrystalline polymer that is obtained by partial deacetylation of chitin under alkaline conditions [28]. It is one of the materials most widely used to prepare hydrogels due to its excellent biocompatibility, nontoxicity, and biodegradability [29,30]. However, CS hydrogels present several problems due to their unstable structures with large-sized and poorly defined pores, weak formability, and low mechanical properties, limiting their further utilization for *in vivo* studies [31,32]. For this reason, they have been combined with curable polymers such as polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA), which provide the scaffolds basic mechanical support [33,34].

The fabrication of hybrid materials that combine natural and synthetic polymers is a promising approach for creating new scaffolds that combine the intrinsic advantages of both materials and meet several requirements, such as being biodegradable, bioactive, having good mechanical properties, and being easy to fabricate [35]. In this work, we focus on the fabrication of a novel hybrid 3D-printed scaffold based on polycaprolactone and a chitosan hydrogel loaded with different vancomycin concentrations (1%, 5%, 10%, and 20%) as a DDS to evaluate its antimicrobial efficacy against *S. aureus* and *S. epidermidis*. In addition, we propose a novel method for improving the adhesion of hydrophobic polymers (PCL) to hydrogels using two different cold plasma treatments. The obtained scaffolds combine the natural biocompatibility, biodegradability, and antibacterial properties of CS with the excellent mechanical properties of PCL. The morphological characteristics of the scaffolds were studied by means of optical and scanning electron microscopy (SEM), showing that the CS/Van hydrogel successfully coated the PCL matrix homogeneously after the plasma treatments. The antibacterial efficacy of the scaffolds was tested against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, and vancomycin release was studied at different time periods by means of high-performance liquid chromatography (HPLC). Finally, we evaluated the possible systemic adverse effects of scaffolds at the cellular level by analyzing the viability, proliferation, and differentiation of a population of adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (*ah*-BM-MSC).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

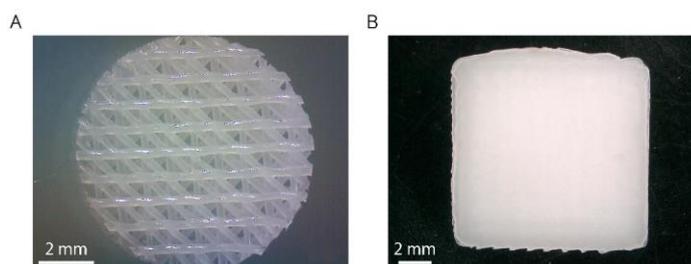
Polycaprolactone (PCL) 3D printing filament (molecular weight: 50,000 g/mol) was purchased from 3Dmakers (Haarlem, The Netherlands). Chitosan (#448869, 75–85% deacetylated, low molecular weight), acetic acid, and NaOH were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) and used as received. Vancomycin hydrochloride was purchased from Lab. Reig Jofre S.A. (Barcelona, Spain).

*Staphylococcus aureus* (CECT 239) and *Staphylococcus epidermidis* (CECT 231) strains were purchased from the Spanish Type Culture Collection (CECT) (Valencia, Spain). Tryptic Soy Broth (TSB), Tryptic Soy Agar (TSA), and buffered peptone water were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain).

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Fabrication of Porous Polycaprolactone/Chitosan Scaffolds Loaded with Vancomycin Design and Fabrication of 3D-Printed PCL Scaffolds with Controlled Porosity Using the Fused Deposition Modelling (FDM) Method

The scaffolds were designed by using REGEMAT 3D Designer software (v1.4.4) and 3D-printed using REGEMAT 3D Bio V1<sup>®</sup> bioprinter (REG4Life, REGEMAT 3D, Granada, Spain) equipped with a glass bed and a thermoplastic extruder with a 0.4 mm diameter nozzle. The scaffolds were designed with the following parameters: scaffold size 1.50 × 20 × 20 mm (height, width, length), pore size 200 μm, layer height 0.25 mm, perimeters 0, solid bottom/top layers 0, infill pattern triangular; and manufactured using a medical-grade PCL filament printed at 160 °C with an infill speed of 11 mm/s. As described in a previous work, an 8 mm biopsy punch was used to prepare defined and reproducible disk-shaped scaffolds of 8 × 1.50 mm (diameter, height) from each printed scaffold (Figure 2A) [18]. In addition, nonporous (solid) PCL scaffolds of 12 × 12 × 1.50 mm (width, length, height) were printed in order to avoid porosity interfering with some of the experimental results (Figure 2B). Porous disk-shaped scaffolds were characterized and used for all biological and microbiological experiments and solid scaffolds were only used to evaluate the effect of cold plasma treatment on the adhesion of CS/Van hydrogel to the PCL matrix (see Section 2.3.2), as it was noticed that the porosity interfered in the experimental results.



**Figure 2.** Micrographs of (A) porous and (B) solid PCL scaffolds printed using REGEMAT 3D Bio V1<sup>®</sup> bioprinter.

### Vancomycin-Loaded Chitosan Hydrogel Preparation

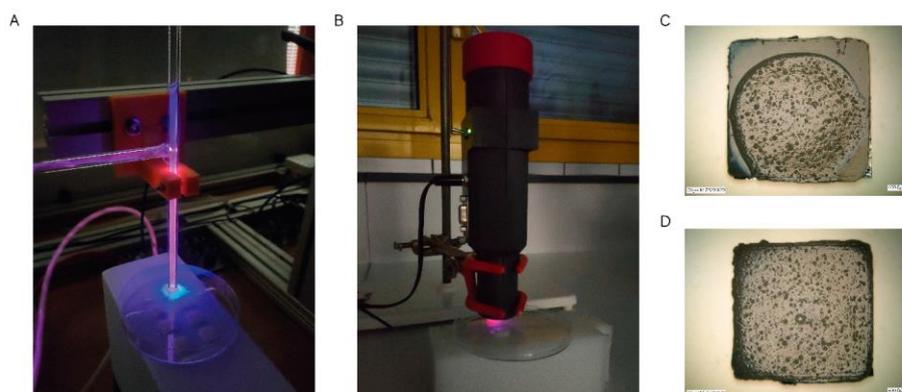
The chitosan hydrogels were prepared by dissolving low molecular weight chitosan at a concentration of 4% (*w/v*) in demineralized water containing 1.5% (*v/v*) acetic acid. The solutions were mechanically stirred for 24 h (250 rpm) and vancomycin was added to the chitosan hydrogels in a content of 1%, 5%, 10%, and 20% (*w/w* of chitosan). After 24 h, the solutions were centrifuged (3000 rpm, 1 h) to remove air bubbles.

### Hybrid Scaffold Preparation

The 3D-printed PCL scaffolds were dip-coated in the chitosan hydrogel and left to dry overnight. Then, the scaffolds were neutralized in a 1 M NaOH solution for 2 h and rinsed three times with distilled water to remove residual acids. The whole process was performed in a laminar flow cabinet to avoid sample contamination.

Preliminary tests showed that the chitosan coating remained firmly adhered to the porous PCL scaffolds, as it was trapped between the 3D-printed strands. However, that was not the case for solid PCL scaffolds, which repelled the chitosan coating as seen in

Figure 3C. This could be due to the fact that PCL is a hydrophobic polymer, which makes it difficult to adhere to hydrogels with more than 90% water content.



**Figure 3.** Plasma treatments performed on the PCL scaffolds. (A) Cold atmospheric plasma jet; (B) homemade torch with a piezoelectric plasma generator. Optical microscopy images of (C) Solid PCL scaffold (untreated) coated using CS hydrogel (scale bar 400  $\mu\text{m}$ ); (D) solid PCL scaffold coated using CS hydrogel after being exposed to cold plasma for 30 s (scale bar 400  $\mu\text{m}$ ).

Plasma treatments have recently been used to lower the hydrophobicity of polymer surfaces by forming reactive oxygen species (ROS) [36]. These newly formed reactive species generate hydrophilic groups (hydroxyl or carboxylic) on the polymer surface that can interact with the hydrogels [37]. Even if plasma treatment was not necessary for porous scaffolds, two different plasma technologies were tested on the surfaces of solid PCL scaffolds: (i) a cold atmospheric pressure plasma jet developed in GREMI-CNRS consisting of a plasma gun that is a dielectric barrier discharge (DBD) plasma and helium fed and powered using a microsecond voltage pulse [38] (Figure 3A); and (ii) a homemade torch with a piezoelectric plasma generator (CeraPlas<sup>®</sup>) developed by TDK Electronics GmbH & Co [39] (Figure 3B). This technology is based on a piezo ceramic component and a driving circuit that allows for generating cold atmospheric plasma. After being exposed for 30 s to plasma treatments with 5 mm gap, the PCL scaffolds were dip-coated in the chitosan hydrogels and left to dry overnight. As can be seen in Figure 3D, the CS hydrogel was not repelled by the scaffold, showing a homogeneous distribution.

In order to determine the amount of chitosan adhered to the scaffolds, the weight of the PCL scaffolds was compared to the weight of PCL/CS/Van scaffolds after the coating process. After weighing the scaffolds ( $n = 10$ ) in an analytical balance, an increment from  $33.34 \pm 0.34$  mg (native PCL) to  $41.16 \pm 1.01$  mg (PCL/CS/Van scaffolds) was observed. No significant differences were obtained between the weight of PCL/CS scaffolds at different vancomycin concentrations.

### 2.3. Characterization of the 3D-Printed Scaffolds

#### 2.3.1. Morphological Characterization of the 3D-Printed Scaffolds

The morphological characterization of the 3D-printed scaffolds was carried out using a digital camera coupled to a stereomicroscope. The surface morphology of the scaffolds was examined using scanning electron microscopy (SEM; model JEOL-6100, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Prior to visualization, the scaffolds were mounted on aluminum stubs with conductive paint and sputter-coated with platinum (10 mA, 120 s). SEM micrographs were

obtained at magnifications of  $\times 20$  and  $\times 45$  under an accelerating voltage of 15–20 kV and a working distance of 4–5 mm.

### 2.3.2. Wettability Assay

Static water contact angle (WCA) measurements were performed on a drop shape analyzer (DSA100S KRÜSS GmbH) to assess the effect of cold plasma treatment on PCL hydrophobicity. The water droplet volume was set to 1  $\mu\text{L}$  and the deposit speed at 2.67  $\mu\text{L/s}$ . Briefly, solid PCL scaffolds ( $n = 3$ ) were treated using a cold atmospheric plasma jet (Plasma 1) and a homemade torch with a piezoelectric plasma generator (Plasma 2) (Figure 3). Three untreated scaffolds were used as control. Each measurement was performed in triplicate in three different scaffolds for better statistical significance.

### 2.3.3. In Vitro Degradation Kinetics

The in vitro degradation of the scaffolds was assessed by measuring the weight loss of the constructs at 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days. Briefly, PCL/CS/Van scaffolds were weighed ( $W_0$ , initial weight) and subsequently immersed in eppendorf tubes containing 1 mL of complete growth medium (DMEM). Then, the scaffolds were incubated at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 95% relative humidity. At different time periods, the scaffolds were recovered from medium, slightly wiped using filter paper, and reweighed ( $W_d$ , final weight). The weight loss (WL) was calculated by applying the following equation [40]:

$$\text{WL}\% = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad (1)$$

where  $W_0$  and  $W_d$  indicate the weight of the scaffold before and after the scheduled immersion time, respectively.

### 2.3.4. Water Absorption Assay

The swelling behavior of PCL/CS/Van scaffolds was tested in PBS solutions of pH 7.4. Three PCL/CS/Van scaffolds of known weight were put into stainless steel baskets in order to prevent scaffolds from floating. At different timepoints (0.5, 1, 3, 6, 24, 48 h), the scaffolds were collected and gently wiped using filter paper before being weighed. Water absorption percentage was calculated using the following equation [41]:

$$\text{Water absorption (\%)} = \frac{w_t - w_0}{w_0} \times 100 \quad (2)$$

where  $w_t$  is the weight of the scaffolds at time  $t$ , and  $w_0$  is the initial weight of the dry scaffolds.

### 2.3.5. Vancomycin Release Quantification

Vancomycin-loaded chitosan scaffolds were immersed into 1.5 mL eppendorf tubes containing 1 mL phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) medium at 37 °C in darkness. At predetermined timepoints (1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d, and 14 d), the medium was collected, and fresh PBS was refilled accordingly. The vancomycin concentration was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with diode array (DAD) and fluorescence (FLD) detector, equipped with a Vydac 218TP C18 column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Avantor®, Radnor Township, PA, USA). The analysis was performed under isocratic conditions (0.8 mL/min) using 89% ammonium phosphate 0.5 M and 11% acetonitrile as mobile phase. Prior to the measurements, a calibration curve of vancomycin in PBS was determined by measuring absorbance values of stock solutions of vancomycin from 100 to 0.5  $\mu\text{g/mL}$  at 282 nm (linear range 12.4 to 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ;  $R^2 > 0.998$ ).

## 2.4. Evaluation of Antimicrobial Properties

### 2.4.1. Bacterial Culture

Strains of *Staphylococcus aureus* (CECT 239) and *Staphylococcus epidermidis* (CECT 231) were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT) (Valencia, Spain). To activate the *S. aureus* and *S. epidermidis* strains, they were grown in TSB medium and incubated aerobically at 35 °C for 24 h. The bacterial cultures were stored in TSA medium at 4 °C for over three months. For daily use, a working culture was prepared by transferring a single colony from TSA to 10 mL of TSB, followed by incubation at 35 °C for 24 h.

### 2.4.2. Agar Diffusion Method

In order to assess the antimicrobial properties of the chitosan coating loaded with vancomycin, experiments were conducted to measure the inhibition zones. Initially, a suspension of each microorganism (*S. aureus* and *S. epidermidis*) was prepared with a concentration of 5.0 log<sub>10</sub> colony-forming units/mL (CFU/mL) in TSB (2X) medium. Subsequently, 100 µL aliquots of the bacterial suspension were added to 6.0 mm diameter well plates containing TSA agar.

Following a brief drying period, the samples were brought into contact with the PCL/Chitosan/Van scaffolds and incubated overnight at 37 °C. Finally, the inhibition halos were measured using a ruler at 24 and 48 h. All the experiments were replicated three times.

## 2.5. Biological Assays

### 2.5.1. Isolation, Purification, Characterization, and Culture of Adult Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (*ah*-BM-MSCs)

Multipotent *ah*-BM-MSCs were isolated from bone marrow as previously described (additional information related to the applied methodology, cell isolation, culture, and expansion can be found in previous publications [42,43]). Briefly, bone marrow was collected from the iliac crest of three volunteer patients by direct puncture. Then, bone marrow aspirate was transferred into transfer bags containing heparin. The mononuclear cell fraction was obtained using Ficoll density gradient media and a cell-washing closed automated SEPAX™ S-100 system (Biosafe, Eysines, Switzerland). After assessing cell viability by using trypan blue staining (#T8154; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), cells were plated out at a density of  $3.75 \times 10^5$  mL in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with 10 mL of basal culture growth medium (GM). The growth medium used was Dulbecco's Minimum Essential Media (DMEM) (#31885-023, Gibco, Bleiswijk, The Netherlands) complemented with 10% (*v/v*) inactivated fetal bovine serum (FBS) (#F7524, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and routine antibiotics such as Penicillin and streptomycin (100 U mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin) (#P4333, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) before incubating cells under standard conditions of normoxia (21% O<sub>2</sub>) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. *ah*-BM-MSCs in passages 3–5 were used for in vitro experiments.

All biological experiments were in full compliance with the established regulations and the experimental protocol was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of UCAM—Universidad Católica de Murcia (authorization n° CE051904) UCAM Ethics Committee (CE n° 052114/05.28.2022).

### 2.5.2. Immunophenotypic Profiles of *ah*-BM-MSC Cultures

The isolated *ah*-BM-MSCs were characterized by means of flow cytometry (Beckman Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA; Navios Software v1.2) for mesenchymal (CD90, CD73, 105) and hematopoietic (CD34, CD45) markers as previously described [42,44,45]. Before performing the in vitro assays, single-cell suspensions obtained using culture trypsinization were labeled with fluorochrome-conjugated antibodies: CD73-PE, CD90-APC, CD105-FITC, CD34-APC, and CD45-FITC (Human MSC Phenotyping Cocktail,

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) in order to verify the purity of *ah*-BM-MSCs populations.

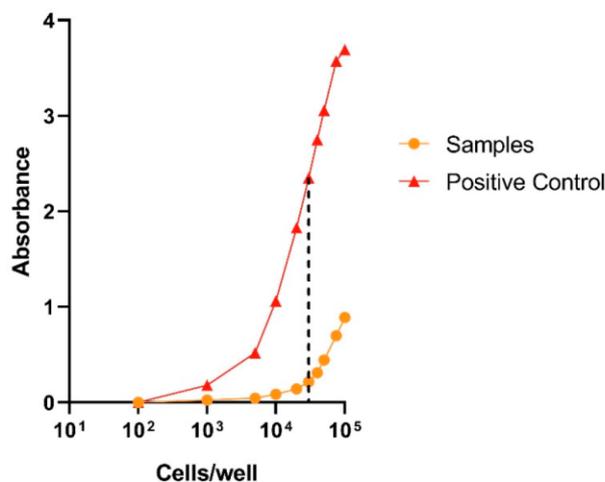
### 2.5.3. Cell Seeding Methods

For cell viability, proliferation, and osteogenic differentiation assays, *ah*-BM-MSCs were seeded at the bottom of 24 WP at a density of  $10 \times 10^3$  cells  $\text{cm}^{-2}$ , and PCL/CS/Van scaffolds were placed in 0.4  $\mu\text{m}$  pore culture well inserts (Falcon®) to be in indirect contact with the culture. Cells seeded onto tissue culture-treated polystyrene wells (TCPS; Sigma-Aldrich, Corning, NY, USA) (without materials) were taken as positive control. The culture media were changed three times a week for all the experiments performed.

### 2.5.4. Cell Viability and Proliferation Assays

#### In Vitro Cytotoxicity Assay

The cell viability of *ah*-BM-MSCs was evaluated using LDH cytotoxicity detection kit (#11644793001, Roche Diagnostics, Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) after placing PCL/CS/Van scaffolds in indirect contact with cells for 24 and 72 h. Before performing the assay, it is important to determine the optimal cell concentration for the cell line used, as different cell types may contain different amounts of LDH. In general, we choose the concentration at which the difference between the low and high control is at a maximum. For our culture of *ah*-BM-MSCs, the optimal cell concentration to be used for the subsequent experiment was found to be  $3 \times 10^4$  cells/well for 24 WP (Figure 4).



**Figure 4.** Determination of the optimal target cell concentration for *ah*-BM-MSCs. *ah*-BM-MSCs were titrated in 24 WP at densities of 100, 1000, 5000, 10,000, 20,000, 30,000, 40,000, 50,000, 75,000, and 100,000 cells/well. Culture medium was added for the determination of the spontaneous LDH activity (samples), and culture medium containing 1% Triton X-100 was added to determine the maximum LDH release (positive control).

Twenty-four hours after seeding *ah*-BM-MSCs on 24 WP, the culture medium was replaced using fresh assay medium containing 1% FBS to remove LDH activity released from the cells during the incubation step. Then, the PCL/CS/Van scaffolds were placed in indirect contact with cells using 0.4  $\mu\text{m}$  pore culture well inserts and LDH activity was assessed at 24 and 72 h. Cells growing on tissue culture polystyrene (TCPS) plates

without PCL/CS/Van scaffolds were used as low control (spontaneous LDH release) and cells cultured using assay medium containing 1% Triton X-100 solution were used as high control (maximum LDH release). At different timepoints, 100  $\mu$ L aliquots of each well were transferred to an optically clear flat-bottomed 96 WP followed by the addition of 100  $\mu$ L of the reaction mixture. After 30 min incubation at RT, the absorbance was read directly using a Spectramax iD3 plate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) at 490 nm.

#### Cellular Metabolic Activity Assay

The cellular metabolic activity of *ah*-BM-MSCs grown in the presence of PCL/CS scaffolds loaded with different vancomycin concentrations was evaluated using the AlamarBlue<sup>®</sup> assay (#DAL1100, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) on days 1, 3, 7, 14 after seeding. Cells growing onto TCPS (without PCL/CS/Van scaffolds) were used as control. Briefly, at different time periods, the inserts containing PCL/CS/Van scaffolds were temporarily removed (prior to the incubation step), and fresh medium (1 mL) containing 10% (*v/v*) AlamarBlue<sup>®</sup> reagent was added to each well. Then, the plate was incubated for 4 h in darkness (wrapped with aluminum foil) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% of relative humidity. Finally, 150  $\mu$ L aliquots of each well were transferred to a black-walled 96 WP and fluorescence was assessed at excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm (respectively) using a Spectramax iD3 plate reader (Molecular Devices, USA).

#### 2.5.5. Osteoblastic Differentiation Assays

##### Alkaline Phosphatase (ALP) Activity

The ALP activity of *ah*-BM-MSCs was assessed at 7 and 14 days using an Alkaline Phosphatase Detection Kit (#SCR004, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) after seeding the cells in the presence of PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds. At each time period, cells were detached using trypsin, and an aliquot of  $1.5 \times 10^4$  cells (per sample) was treated by adding 100  $\mu$ L p-nitrophenylphosphate (p-NPP). After 20 min incubation at RT, the catalytic reaction (p-NPP  $\rightarrow$  phosphate + p-nitrophenol) affords a yellow colored byproduct that is proportional to the amount of ALP present within the reaction. The absorbance was measured using a Spectramax iD3 plate reader (Molecular Devices, USA) at a wavelength of 405 nm.

##### In Vitro Mineralization Assay

In vitro mineralization was evaluated using an Osteogenesis Assay Kit (#ECM815; Millipore, Billerica, MA, USA) 21 days after seeding *ah*-BM-MSCs in the presence (indirect contact) of PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds. Briefly, the *ah*-BM-MSCs were fixed using 10% formaldehyde, stained using alizarin red stain solution, and visualized using an optical microscope (Axio Vert.A1, ZEISS, Jena, Germany) coupled to a digital camera (Axiocam 305 color, ZEISS, Germany). Then, the samples were treated following the manufacturer's protocol to quantify matrix mineralization and the optical density (OD) was measured using a Spectramax iD3 plate reader (Molecular Devices, USA) at 405 nm.

#### 2.6. Statistics

All data were represented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . The statistical significance was determined by a two-way ANOVA using GraphPrism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) for Windows. Comparison between groups was evaluated using the *t*-test, the significance level being  $p < 0.05$ .

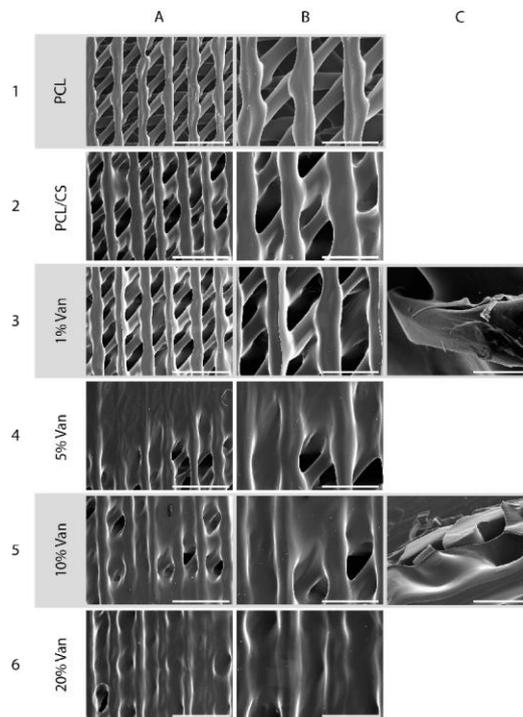
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Characterization of the 3D-Printed Scaffolds

##### 3.1.1. Morphological Characterization of the 3D-Printed Scaffolds

Microstructural examination of the scaffolds' morphology using SEM imaging showed differences in the scaffolds' surfaces depending on the vancomycin concentration loaded. Figure 5(A1,B1) shows a micrograph of the native PCL constructs before being coated with

chitosan hydrogel. The scaffolds show a parallel distribution of the printed strands in each printed layer, and the triangular printing pattern results in scaffolds with interconnected porosity with an approximate pore size of 200  $\mu\text{m}$  and an overall porosity of 59%, as calculated in a previous publication [18]. As can be seen in Figure 5(A2,B2), the chitosan coating causes a discrete thickening of the 3D-printed strands as well as at the points of contact between the strands as a result of the thin coating layer provided by CS. However, this finding intensifies progressively and proportionally when the chitosan hydrogel is loaded with increasing vancomycin concentrations (Figure 5(A3–A6,B3–B6)). The latter is observed in the micrographs corresponding to PCL/CS/20%Van scaffolds, in which almost the entire surface of the PCL scaffold was covered, making it difficult to distinguish its pores (Figure 5(A6,B6)).



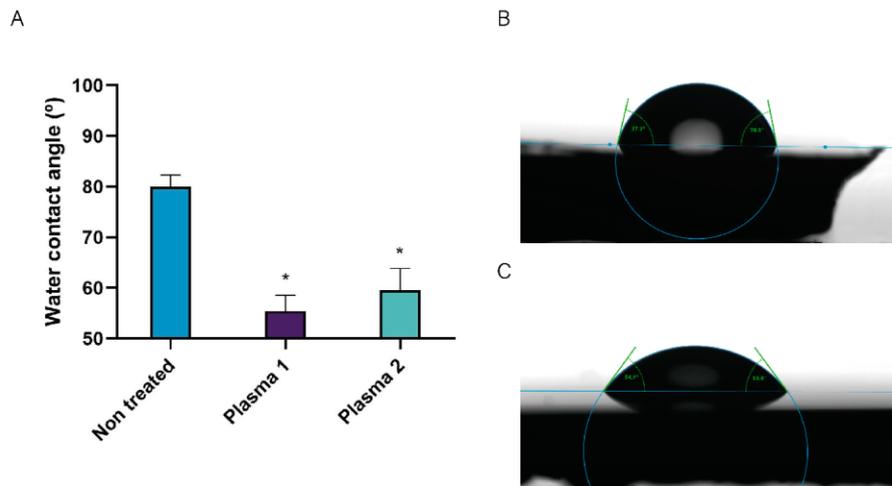
**Figure 5.** SEM micrographs of the (1) PCL, (2) PCL/CS, and (3–6) PCL/CS/Van scaffolds loaded with 1%, 5%, 10%, and 20% *w/t* vancomycin, respectively, at different magnifications: (A1–A6) 22 $\times$ , scale bar 2 mm; (B1–B6) 40 $\times$ , scale bar 1 mm; (C3) scale bar 200  $\mu\text{m}$ ; (C5) scale bar 700  $\mu\text{m}$ .

The functional characteristics of the construct developed in this study agree with the premises established by different authors for the design and fabrication of 3D scaffolds to be used for tissue engineering applications [46,47]. In fact, we have taken into account that an ideal construct or scaffold, in general, should have sufficient porosity to accommodate both differentiated and undifferentiated cells of different lineages. In addition, it was combined with a natural-derived polymer (chitosan) capable of acting as a carrier or DDS for the

controlled release of drugs or biomolecules. Likewise, these reticular pore systems should have open and interconnected porosity to facilitate the diffusion of nutrients, metabolites, and cells from the external environment to the inner parts of the scaffold [20].

### 3.1.2. Wettability Assay

The wettability of solid 3D-printed PCL scaffolds was evaluated by measuring the static water contact angle of 1  $\mu$ L water droplets before and after the plasma treatments. As shown in Figure 6, the static WCA of the untreated PCL scaffolds was  $79.93 \pm 2.36^\circ$ , demonstrating hydrophobic behavior without any surface modification. However, for plasma-activated scaffolds, we observed water contact angles of  $55.40 \pm 3.16^\circ$  and  $59.62 \pm 4.22^\circ$  for Plasma 1 and Plasma 2, respectively, showing a decrease of around  $20^\circ$  that attests to a decrease in surface hydrophobicity.



**Figure 6.** (A) Water contact angle on 3D-printed solid (nonporous) PCL scaffolds before and after plasma treatments (Plasma 1: cold atmospheric pressure plasma jet; Plasma 2: homemade torch with piezoelectric plasma generator). Water droplets with a volume of 1  $\mu$ L deposited on (B) nontreated PCL scaffolds and (C) PCL scaffolds treated using Plasma 1. Data represent mean  $\pm$  SD. \* Significant differences with the water contact angle of nontreated PCL scaffold.

A change in WCA is a clear indicator of a polymer surface chemistry modification [48]. The results obtained are in total accordance with the ones obtained by Carette et al., who studied the effects of atmospheric plasma on the surface of a polylactic acid (PLA) scaffold in order to improve the adhesion of a 1% chitosan solution, obtaining a decrease of about  $30^\circ$  in WCA (from  $85^\circ$  to  $55^\circ$ ) after plasma activation [36].

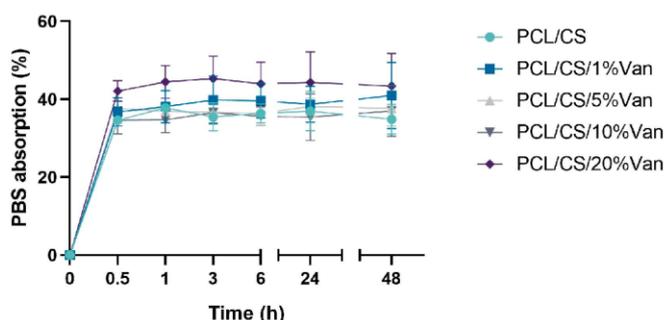
### 3.1.3. In Vitro Degradation Kinetics

The in vitro degradation assay carried out using PCL/CS/Van scaffolds did not result in any changes in the scaffold weights ( $W_0 = W_d$ ) after 28 days of immersion in culture medium at  $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 95% relative humidity. It is well known that CS, as well as other polysaccharides, is degraded in the body by depolymerization, oxidation, and hydrolysis (enzymatic or nonenzymatic) [49]. Lim et al. studied the degradation of CS porous beads with different degrees of acetylation (DA 10–50%) in different enzyme solutions (lysozyme, NAGase, and a mixture of both) [50]. As main findings, they deter-

mined that (i) CS beads did not degrade in the NAGase solution, (ii) CS beads with high DA degraded faster than those with low DA in lysozyme and enzymatic mixture solutions, and (iii) CS beads with DA values around 30 to 50% rapidly degraded into monomers in the enzymatic mixture in less than 30 to 60 days.

#### 3.1.4. Water Absorption Assay

The water absorption of the chitosan coating of PCL/CS and PCL/CS/Van scaffolds was tested in PBS solutions. As can be seen in Figure 7, the total weight of the scaffolds increased between  $34.61 \pm 1.13\%$  (PCL/CS) and  $42.14 \pm 1.46\%$  (PCL/CS/20%Van) after 30 min of immersion in PBS, and remained more or less stable for at least for 48 h. The minimum absorption values were shown by the PCL/CS scaffolds ( $34.61 \pm 1.13\%$ ), while the maximum ones were reached by the PCL/CS/20%Van scaffolds  $45.32 \pm 8.41\%$ . The latter can be justified by the results obtained in the scaffolds characterization section (SEM imaging), which showed that increasing concentrations of vancomycin caused a thickening of the 3D-printed strands, having more chitosan surface to absorb PBS.



**Figure 7.** Water absorption as a function of time of PCL/CS and PCL/CS/Van scaffolds (1%, 5%, 10%, and 20%) in contact with PBS medium (pH = 7.4).

#### 3.1.5. Vancomycin Release Quantification

The vancomycin release from the PCL/CS scaffolds loaded with 1%, 5%, 10%, and 20% vancomycin followed first-order release kinetics (Figure 8). Fast vancomycin release was observed during the first hour, followed by slower release during the next hours for all the scaffolds studied. As can be seen in the graph, vancomycin release finishes after 24 h and the cumulative drug release profiles seem to reach a plateau. These release profiles could be explained by the presence of two different drug fractions: (i) drug weakly bound or deposited on the CS hydrogel surface, and (ii) drug included in the CS network by chemical interactions. It is worth noting that the scaffolds loaded with 10% and 20% Van had similar drug release profiles, indicating that the solubility limit of the drug in PBS is probably between both concentrations.

These kinetics profiles are in total accordance with the results obtained by López-Iglesias et al., who studied vancomycin release from porous chitosan aerogels obtaining similar drug release profiles [51]. On the other hand, Kausar et al. developed chitosan films loaded with vancomycin (10 and 20% with respect to dry polymer mass), obtaining 100% dissolution of free vancomycin in 7 h with more than 50% of drug dissolved within the first hour [52].

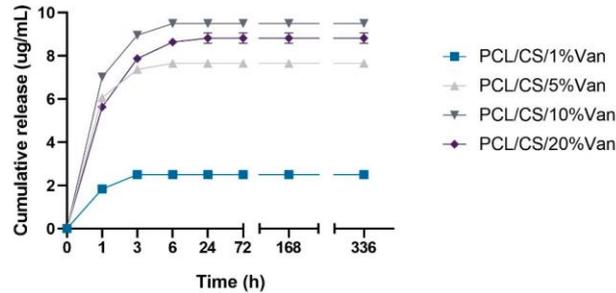


Figure 8. In vitro cumulative drug release profiles of PCL/CS scaffolds loaded with 1%, 5%, 10%, and 20% vancomycin for 14 days (336 h).

### 3.2. Evaluation of Antimicrobial Properties

PCL/Chitosan scaffolds loaded with different vancomycin concentrations have been shown to exhibit antimicrobial activity against both *S. epidermidis* and *S. aureus*. This is because, in all cases, the minimum inhibitory concentration for vancomycin was exceeded ( $2 \mu\text{g/mL}$  for *S. aureus* and  $2\text{--}4 \mu\text{g/mL}$  for *S. epidermidis*) [53,54]. The inhibition halos were measured at 24 and 48 h, with no significant differences being observed between them. This may be due to the fact that no more vancomycin is released between 6 and 24 h (Figure 9).

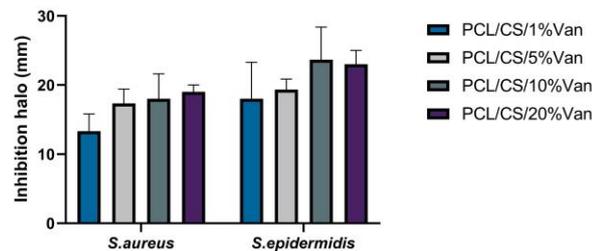


Figure 9. Inhibition halos (mm) produced by PCL/CS/Van scaffolds loaded with 1%, 5%, 10%, and 20% w/t vancomycin for *S. aureus* and *S. epidermidis*. Data represent mean  $\pm$  SD. No significant differences were found between the scaffolds for both microorganisms studied.

As seen in Figure 9, a halo of inhibition is shown in all cases. In the case of *S. aureus*, the highest inhibition halo is for PCL/CS/20%Van, but there are no significant differences with the PCL/CS/10%Van and PCL/CS/5%Van scaffolds. This is because the vancomycin concentrations in the media are similar to each other,  $9.5 \text{ mg/mL}$  and  $8.82 \text{ mg/mL}$  (Figure 9), respectively. In the case of *S. epidermidis*, the highest inhibition halo was obtained for the PCL/CS/10%Van scaffolds. If the PCL/CS/10%Van and PCL/CS/20%Van scaffolds are compared, there are no significant differences between them because the concentrations of vancomycin in the media are similar (Figure 9).

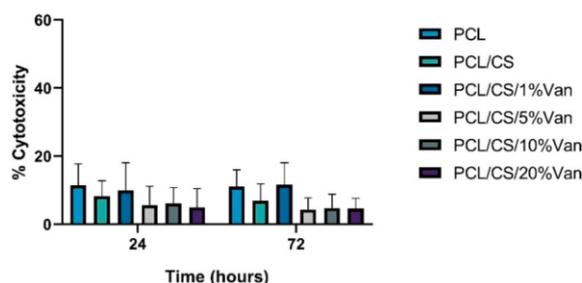
If we compare the inhibition halos of *S. epidermidis* and *S. aureus*, it is observed that although both bacteria are Gram-positive; vancomycin is more effective against *S. epidermidis*. No antimicrobial effect of PCL/CS was observed, this may be due to the low solubility and the limited amount of positive charges of the polysaccharide at the pH ( $7.4 \pm 0.1$ ) of the culture medium [55,56].

### 3.3. Biological Assays

#### 3.3.1. Cell Viability and Proliferation Assays

##### In Vitro Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity was assessed using an LDH activity assay after placing the PCL/CS/Van scaffolds in indirect contact with *ah*-BM-MSCs for 24 and 72 h (Figure 10). The results of LDH release demonstrated that none of the tested scaffolds were found to be cytotoxic. However, the maximum LDH release values were achieved by PCL, PCL/CS, and PCL/CS/1%Van scaffolds, showing cytotoxicity values of  $11.4 \pm 6.4\%$ ,  $8.3 \pm 4.5\%$ , and  $10.0 \pm 8.0\%$  at 24 h, and  $11.1 \pm 4.9\%$ ,  $6.9 \pm 5.0\%$ , and  $11.7 \pm 6.4\%$  at 72 h, respectively, with respect to low and high control. On another hand, PCL/CS scaffolds loaded with 5, 10, and 20% vancomycin reached cytotoxicity values of  $5.7 \pm 5.5\%$ ,  $6.1 \pm 4.7\%$ , and  $4.9 \pm 5.5\%$  at 24 h, and  $4.4 \pm 3.4\%$ ,  $4.8 \pm 4.0\%$ , and  $4.7 \pm 2.9\%$  at 72 h, respectively. No statistically significant differences were observed between the tested samples.

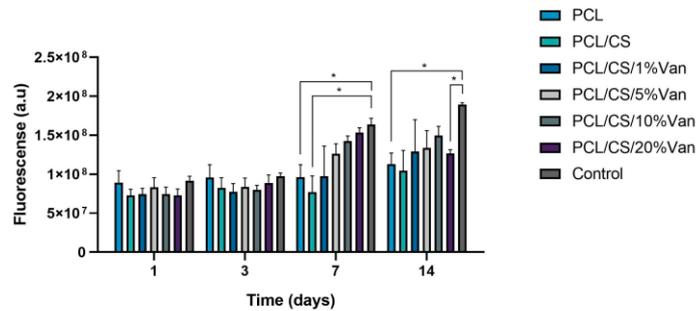


**Figure 10.** Cytotoxicity results using the LDH assay after placing PCL, PCL/CS, and PCL/CS/Van scaffolds in indirect contact with *ah*-BM-MSCs for 24 and 72 h. The mean cytotoxicity percentage was calculated and normalized with respect to spontaneous LDH release (low control) and maximum LDH release (high control). Bars represent standard deviations of the mean. No significant differences were observed between the tested samples.

Both polymers used in this study (PCL and CS) have been commonly used as DDSs or scaffolds components for tissue engineering applications due to their biocompatibility, biodegradability, and ease of modification [57,58]. Cytocompatibility of CS has already been studied, with results showing that it does not have an acute cytotoxic effect [59]. Our results are in line with previous publications that demonstrate the good biocompatibility of PCL and CS-based structures [33,60].

##### Cellular Metabolic Activity Assay

The cellular metabolic activity of *ah*-BM-MSCs growing in the presence of PCL, PCL/CS, and PCL/CS/Van scaffolds was evaluated using the AlamarBlue® assay on days 1, 3, 7, and 14 after seeding (Figure 11). As can be seen in the graph, the metabolic activity of *ah*-BM-MSCs increased gradually from days 1 to 14 for all the scaffolds studied except for PCL/CS/20%Van, in which a slight decrease was observed after day 7. No significant differences were observed at early periods (days 1 and 3), where all the scaffolds showed a similar proliferation rate. On the other hand, significant differences were noted between PCL, PCL/CS scaffolds, and the control on day 7, and between PCL, PCL/CS/20%Van, and the control on day 14. It is worth noting that the PCL/CS/10%Van scaffolds showed higher metabolic activity with respect to the scaffolds studied.



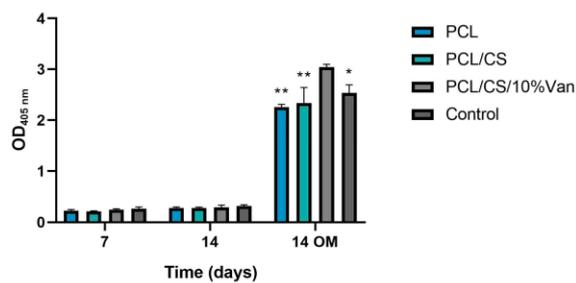
**Figure 11.** Cellular metabolic activity of *ah*-BM-MSCs using the AlamarBlue<sup>®</sup> assay at different time periods. The metabolic activity of cells seeded on plastic (TCPs) was used as positive control. Bars represent standard deviations of the mean. \* Significant differences between the bracketed groups at the same time period.

### 3.3.2. Osteoblastic Differentiation Assays

Osteogenic differentiation was assessed on PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds, as it provided the best results in the cytotoxicity and proliferation assays, as well as in the microbiological assays, showing a similar bactericidal effect to the scaffold loaded with 20% vancomycin.

#### Alkaline Phosphatase (ALP) Activity

The Alkaline Phosphatase activity of *ah*-BM-MSCs cultured in the presence of PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds is shown in Figure 12. From days 7 to 14, using growth medium (GM), no significant differences in ALP activity were observed between the different time periods or within the scaffolds studied. On the other hand, when using osteogenic medium (OM), the ALP activity significantly increased at 14 days, reaching the maximum values in the presence of PCL/CS/10%Van. In fact, significant differences were observed between the scaffold loaded with 10% vancomycin and the other experimental groups, indicating that PCL/CS/10%Van seems to increase the ALP activity of the cultured cells.

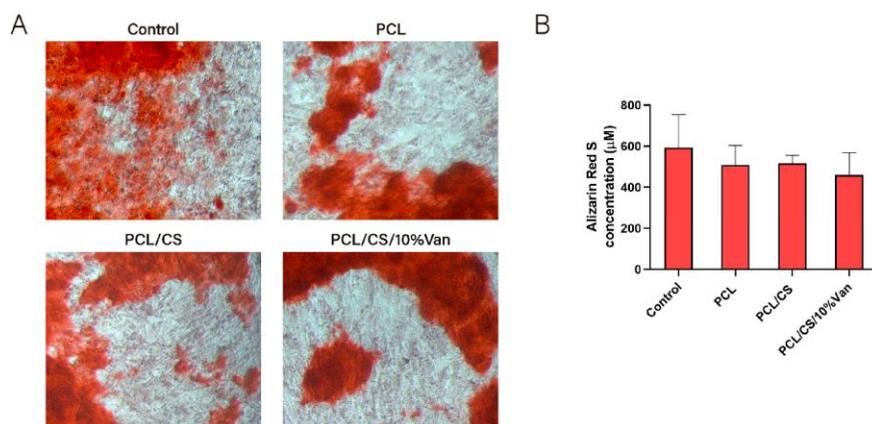


**Figure 12.** Alkaline phosphatase activity of *ah*-BM-MSCs after being cultured for 7 and 14 days in the presence of PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds using growth medium (GM) and osteogenic medium (OM). Cells seeded on plastic (TCPs) were taken as positive control. Results are shown as a function of optical density (OD<sub>405nm</sub>) units. Data represent mean  $\pm$  SD. Significant differences were found between PCL/CS/10%Van and the other samples at 14 days using OM; \*  $p < 0.001$  and \*\*  $p < 0.0001$ .

However, the PCL/CS scaffold did not show an increase in ALP activity, so this finding cannot be attributed to the presence of the chitosan coating. Other authors have followed novel strategies to increase the osteogenic activity of chitosan, consisting of its combination with hydroxyapatite (HA) via the fabrication of carboxymethyl chitosan–HA nanofibers [61] or HA/resveratrol/chitosan composite microspheres [62]. This kind of HA composite can provide necessary calcium sources that can consequently induce cell differentiation, deposition of extracellular matrix, and mineralization [63].

#### In Vitro Mineralization Assay

The osteogenic differentiation of *ah*-BM-MSCs was determined by quantifying the presence of calcium deposits after placing the PCL/CS/Van scaffolds in indirect contact with *ah*-BM-MSCs for 21 days. As shown in Figure 13A, no major visual differences were observed between the samples, although the control appears to have a slightly higher reddish coloration. Quantitative examination (Figure 13B) showed that the alizarin red staining concentration was higher in the control than in the cells exposed to the scaffolds, even if no significant differences were observed between the samples. This could be due to a cellular adaptation phase to varying environmental changes caused by the presence of the scaffolds, which could have slightly delayed or affected mineralization.



**Figure 13.** Alizarin red staining of *ah*-BM-MSCs after being cultured for 21 days in the presence of PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds. (A) Alizarin red staining showing mineralization (original magnification  $\times 10$ ); (B) quantitative determination of alizarin red staining. Cells seeded on plastic (TCPs) were taken as positive control. Quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD. No significant differences were observed between groups.

As demonstrated by both osteoblastic differentiation assays, the PCL, PCL/CS, and PCL/CS/10%Van scaffolds did not affect *ah*-BM-MSCs differentiation capacity, indicating that both the scaffold components and the vancomycin dose used did not cause adverse effects or alterations at the cellular level.

#### 4. Conclusions

Biocompatible 3D-printed hybrid PCL/CS/Van scaffolds were developed as drug delivery systems with antimicrobial efficacy against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Two cold plasma treatments were presented as novel methods to improve the adhesion of hydrophobic polymers to hydrogels, resulting in a decrease in PCL water contact angle of

20%. All the scaffolds studied (1%, 5%, 10%, and 20%Van) had antimicrobial activity against both *S. aureus* and *S. epidermidis*, showing higher inhibition halos for PCL/CS/10%Van and PCL/CS/20%Van scaffolds. In vitro assays demonstrated that the PCL/CS/Van scaffolds were found to be biocompatible and bioactive as demonstrated by no cytotoxicity or functional alteration of the cultured *ah*-BM-MSCs. In conclusion, the developed DDS could be useful in achieving a controlled and effective local release of vancomycin against *S. aureus* and *S. epidermidis*, considered as the main causes of bone infections, but further preclinical studies in vivo using animal models are needed to confirm these results.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.L.-G. and L.M.-O.; methodology, I.L.-G., A.B.H.-H., M.B., J.A.G. and L.M.-O.; software, I.L.-G., M.B. and D.A.-C.; investigation and validation, I.L.-G., M.I.R.-L., M.B., J.A.G. and L.M.-O.; formal analysis, I.L.-G., A.B.H.-H. and L.M.-O.; data curation, I.L.-G., D.A.-C., M.I.R.-L. and L.M.-O.; writing—original draft preparation, I.L.-G., D.A.-C., M.I.R.-L., M.B. and L.M.-O.; writing—review and editing, I.L.-G., A.B.H.-H., D.A.-C., M.I.R.-L., J.A.G. and L.M.-O.; visualization, I.L.-G. and L.M.-O.; supervision, L.M.-O.; project administration, I.L.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of UCAM-Universidad Católica de Murcia (authorization no. CE051904) UCAM ethics committee (CE n° 052114/05.28.2022).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are disclosed in the main text.

**Acknowledgments:** The authors of this study would like to thank the Centre Régional d’Innovation et de Transfert de Technologie—Matériaux Innovation (CRITT-MI) for support in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Wassif, R.K.; Elkayal, M.; Shamma, R.N.; Elkheshen, S.A. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis. *Drug Deliv.* **2021**, *28*, 2392–2414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Walter, G.; Kemmerer, M.; Kappler, C.; Hoffmann, R. Treatment algorithms for chronic osteomyelitis. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2012**, *109*, 257–264. [[CrossRef](#)]
- Kavanagh, N.; Ryan, E.J.; Widaa, A.; Sexton, G.; Fennell, J.; O’Rourke, S.; Cahill, K.C.; Kearney, C.J.; O’Brien, F.J.; Kerrigan, S.W. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00084–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Seebach, E.; Kubatzky, K.F. Chronic Implant-Related Bone Infections—Can Immune Modulation be a Therapeutic Strategy? *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Masters, E.A.; Trombetta, R.P.; de Mesy Bentley, K.L.; Boyce, B.F.; Gill, A.L.; Gill, S.R.; Nishitani, K.; Ishikawa, M.; Morita, Y.; Ito, H.; et al. Evolving concepts in bone infection: Redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. *Bone Res.* **2019**, *7*, 20. [[CrossRef](#)]
- Pincher, B.; Fenton, C.; Jeyapalan, R.; Barlow, G.; Sharma, H.K. A systematic review of the single-stage treatment of chronic osteomyelitis. *J. Orthop. Surg. Res.* **2019**, *14*, 393. [[CrossRef](#)]
- Walenkamp, G.H.; Vree, T.B.; van Rens, T.J. Gentamicin-PMMA beads. Pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1986**, *205*, 171–183. [[CrossRef](#)]
- Walenkamp, G.H.; Kleijn, L.L.; de Leeuw, M. Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1–12 years. *Acta. Orthop. Scand.* **1998**, *69*, 518–522. [[CrossRef](#)]
- Patel, K.H.; Bhat, S.N.; Mamatha, H. Outcome analysis of antibiotic-loaded poly methyl methacrylate (PMMA) beads in musculoskeletal infections. *J. Taibah. Univ. Med. Sci.* **2021**, *16*, 177–183. [[CrossRef](#)]
- van Vugt, T.A.G.; Arts, J.J.; Geurts, J.A.P. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate Beads and Spacers in Treatment of Orthopedic Infections and the Role of Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1626. [[CrossRef](#)]
- Makarov, C.; Cohen, V.; Raz-Pasteur, A.; Gotman, I. In vitro elution of vancomycin from biodegradable osteoconductive calcium phosphate-polycaprolactone composite beads for treatment of osteomyelitis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *62*, 49–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gallarate, M.; Chirio, D.; Chindamo, G.; Peira, E.; Sapino, S. Osteomyelitis: Focus on Conventional Treatments and Innovative Drug Delivery Systems. *Curr. Drug Deliv.* **2021**, *18*, 532–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Wilhelm, M.P. Vancomycin. *Mayo. Clin. Proc.* **1991**, *66*, 1165–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chung, J.H.Y.; Kade, J.C.; Jeiranikhameneh, A.; Ruberu, K.; Mukherjee, P.; Yue, Z.; Wallace, G.G. 3D hybrid printing platform for auricular cartilage reconstruction. *Biomed. Phys. Eng. Express* **2020**, *6*, 035003. [[CrossRef](#)]
15. Nyberg, E.; Rindone, A.; Dorafshar, A.; Grayson, W.L. Comparison of 3D-Printed Poly- $\epsilon$ -caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. *Tissue Eng. Part A* **2017**, *23*, 503–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhang, Z.Z.; Wang, S.J.; Zhang, J.Y.; Jiang, W.B.; Huang, A.B.; Qi, Y.S.; Ding, J.X.; Chen, X.S.; Jiang, D.; Yu, J.K. 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffold Augmented with Mesenchymal Stem Cells for Total Meniscal Substitution: A 12- and 24-Week Animal Study in a Rabbit Model. *Am. J. Sports Med.* **2017**, *45*, 1497–1511. [[CrossRef](#)]
17. Siddiqui, N.; Asawa, S.; Birru, B.; Baadhe, R.; Rao, S. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Mol. Biotechnol.* **2018**, *60*, 506–532. [[CrossRef](#)]
18. Lopez-Gonzalez, I.; Zamora-Ledezma, C.; Sanchez-Lorencio, M.I.; Tristante Barrenechea, E.; Gabaldon-Hernandez, J.A.; Meseguer-Olmo, L. Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/beta-tricalcium Phosphate Composite. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1216. [[CrossRef](#)]
19. Ragaert, K.; De Somer, F.; Van de Velde, S.; Degrieck, J.; Cardon, L. Methods for Improved Flexural Mechanical Properties of 3D-Plotted PCL-Based Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *Stroj. Vestn.-J. Mech. Eng.* **2013**, *59*, 669–676. [[CrossRef](#)]
20. Atala, A.; Yoo, J.J. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015.
21. Yeo, A.; Wong, W.J.; Khoo, H.H.; Teoh, S.H. Surface modification of PCL-TCP scaffolds improve interfacial mechanical interlock and enhance early bone formation: An in vitro and in vivo characterization. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *92*, 311–321. [[CrossRef](#)]
22. Mirtaghi, S.M.; Hassannia, H.; Mahdavi, M.; Hosseini-Khah, Z.; Mellati, A.; Enderami, S.E. A novel hybrid polymer of PCL/fish gelatin nanofibrous scaffold improves proliferation and differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal cells into islet-like cells. *Artif. Organs* **2022**, *46*, 1491–1503. [[CrossRef](#)]
23. Merk, M.; Chirikian, O.; Adlhart, C. 3D PCL/Gelatin/Genipin Nanofiber Sponge as Scaffold for Regenerative Medicine. *Materials* **2021**, *14*, 2006. [[CrossRef](#)]
24. Jang, C.H.; Kim, M.S.; Cho, Y.B.; Jang, Y.S.; Kim, G.H. Mastoid obliteration using 3D PCL scaffold in combination with alginate and rhBMP-2. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 614–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Do, N.H.N.; Truong, Q.T.; Le, P.K.; Ha, A.C. Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *294*, 119726. [[CrossRef](#)]
26. Dang, P.A.; Palomino-Durand, C.; Elsafi Mabrouk, M.; Marquaille, P.; Odier, C.; Norvez, S.; Pauthe, E.; Corte, L. Rational formulation design of injectable thermosensitive chitosan-based hydrogels for cell encapsulation and delivery. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *277*, 118836. [[CrossRef](#)]
27. Catoira, M.C.; Fusaro, L.; Di Francesco, D.; Ramella, M.; Boccafosci, F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, 115. [[CrossRef](#)]
28. Hamed, H.; Moradi, S.; Hudson, S.M.; Tonelli, A.E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 445–460. [[CrossRef](#)]
29. Nolan, K.; Millet, Y.; Ricordi, C.; Stabler, C.L. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell Transplant.* **2008**, *17*, 241–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Domalik-Pyzik, P.; Chłopek, J.; Pielichowska, K. Chitosan-Based Hydrogels: Preparation, Properties, and Applications. In *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*; Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 1–29.
31. Seo, J.W.; Shin, S.R.; Lee, M.Y.; Cha, J.M.; Min, K.H.; Lee, S.C.; Shin, S.Y.; Bae, H. Injectable hydrogel derived from chitosan with tunable mechanical properties via hybrid-crosslinking system. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *251*, 117036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23. [[CrossRef](#)]
33. Li, P.; Fu, L.; Liao, Z.; Peng, Y.; Ning, C.; Gao, C.; Zhang, D.; Sui, X.; Lin, Y.; Liu, S.; et al. Chitosan hydrogel/3D-printed poly( $\epsilon$ -caprolactone) hybrid scaffold containing synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration based on tetrahedral framework nucleic acid recruitment. *Biomaterials* **2021**, *278*, 121131. [[CrossRef](#)]
34. Osman, M.A.; Virgilio, N.; Rouabhia, M.; Mighri, F. Development and Characterization of Functional Poly(lactic Acid)/Chitosan Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers* **2022**, *14*, 5079. [[CrossRef](#)]
35. Zhang, L.; Yang, G.; Johnson, B.N.; Jia, X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 16–33. [[CrossRef](#)]
36. Carette, X.; Mincheva, R.; Herbin, M.; Noifalisse, X.; Nguyen, T.C.; Leclere, P.; Godfroid, T.; Kerdjoudj, H.; Jolois, O.; Boudhifa, M.; et al. Atmospheric plasma: A simple way of improving the interface between natural polysaccharides and polyesters. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2021**, *1056*, 012005. [[CrossRef](#)]
37. Wang, R.; Shen, Y.; Zhang, C.; Yan, P.; Shao, T. Comparison between helium and argon plasma jets on improving the hydrophilic property of PMMA surface. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *367*, 401–406. [[CrossRef](#)]
38. Robert, E.; Barbosa, E.; Dozias, S.; Vandamme, M.; Cachoncinlle, C.; Viladrosa, R.; Pouvesle, J.M. Experimental Study of a Compact Nanosecond Plasma Gun. *Plasma Process. Polym.* **2009**, *6*, 795–798. [[CrossRef](#)]

39. EPCOS AG. *CeraPlas® HF Series, Piezoelectric Based Plasma Generator*; Data Sheet; EPCOS AG: Munich, Germany, 2018.
40. Hu, Z.; Das, S.K.; Yan, S.; You, R.; Li, X.; Luo, Z.; Li, M.; Zhang, Q.; Kaplan, D.L. Stability and biodegradation of silk fibroin/hyaluronic acid nerve conduits. *Compos. Part B Eng.* **2020**, *200*, 108222. [[CrossRef](#)]
41. Jannah Mohd Sebri, N.; Anuar Mat Amin, K. Composite Film of Chitosan Loaded Norfloxacin with Improved Flexibility and Antibacterial Activity for Wound Dressing Application. *Orient. J. Chem.* **2017**, *33*, 628–636. [[CrossRef](#)]
42. De Aza, P.N.; Garcia-Bernal, D.; Cragnolini, F.; Velasquez, P.; Meseguer-Olmo, L. The effects of Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ceramics on adult human mesenchymal stem cell viability, adhesion, proliferation, differentiation and function. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2013**, *33*, 4009–4020. [[CrossRef](#)]
43. Rabadan-Ros, R.; Revilla-Nuin, B.; Mazón, P.; Aznar-Cervantes, S.; Ros-Tarraga, P.; De Aza, P.N.; Meseguer-Olmo, L. Impact of a Porous Si-Ca-P Monophasic Ceramic on Variation of Osteogenesis-Related Gene Expression of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 46. [[CrossRef](#)]
44. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)]
45. Horwitz, E.M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Deans, R.J.; Krause, D.S.; Keating, A.; International Society for Cellular, T. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2005**, *7*, 393–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liu, X.; Ma, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32*, 477–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Raeisdsteh Hokmabad, V.; Davaran, S.; Ramazani, A.; Salehi, R. Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: A strategy for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2017**, *28*, 1797–1825. [[CrossRef](#)]
48. Neundorfer, R.E.; Saiz, E.; Tomsia, A.P.; Ritchie, R.O. Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: Relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 1288–1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Jennings, J.A. Controlling chitosan degradation properties in vitro and in vivo. In *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2017; pp. 159–182.
50. Lim, S.M.; Song, D.K.; Oh, S.H.; Lee-Yoon, D.S.; Bae, E.H.; Lee, J.H. In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, *19*, 453–466. [[CrossRef](#)]
51. Lopez-Iglesias, C.; Barros, J.; Ardao, I.; Monteiro, F.J.; Alvarez-Lorenzo, C.; Gomez-Amoza, J.L.; Garcia-Gonzalez, C.A. Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *204*, 223–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kausar, R.; Khan, A.U.; Jamil, B.; Shahzad, Y.; Ul-Haq, I. Development and pharmacological evaluation of vancomycin loaded chitosan films. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *256*, 117565. [[CrossRef](#)]
53. Hadder, B.; Dexter, E.; Robinson, A.D.M.; Loftus, R.W. Molecular characterisation and epidemiology of transmission of intraoperative *Staphylococcus aureus* isolates stratified by vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC). *Infect. Prev. Pract.* **2022**, *4*, 100249. [[CrossRef](#)]
54. Peixoto, P.B.; Massinani, F.H.; Netto Dos Santos, K.R.; Chamon, R.C.; Silva, R.B.; Lopes Correa, F.E.; Barata Oliveira, C.; Oliveira, A.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with reduced vancomycin susceptibility from bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 41–45. [[CrossRef](#)]
55. Chang, S.H.; Lin, H.T.; Wu, G.J.; Tsai, G.J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 74–81. [[CrossRef](#)]
56. Garcia-Gonzalez, C.A.; Barros, J.; Rey-Rico, A.; Redondo, P.; Gomez-Amoza, J.L.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Monteiro, F.J. Antimicrobial Properties and Osteogenicity of Vancomycin-Loaded Synthetic Scaffolds Obtained by Supercritical Foaming. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 3349–3360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Baranwal, A.; Kumar, A.; Priyadarshini, A.; Oggu, G.S.; Bhatnagar, I.; Srivastava, A.; Chandra, P. Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *110*, 110–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Backes, E.H.; Harb, S.V.; Beatrice, C.A.G.; Shimomura, K.M.B.; Passador, F.R.; Costa, L.C.; Pessan, L.A. Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2022**, *110*, 1479–1503. [[CrossRef](#)]
59. Ferreira, M.O.G.; Leite, L.L.R.; de Lima, I.S.; Barreto, H.M.; Nunes, L.C.C.; Ribeiro, A.B.; Osajima, J.A.; da Silva Filho, E.C. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *152*, 409–418. [[CrossRef](#)]
60. Tardajos, M.G.; Cama, G.; Dash, M.; Misseuw, L.; Gheysens, T.; Gorzelanny, C.; Coenye, T.; Dubruel, P. Chitosan functionalized poly-epsilon-caprolactone electrospun fibers and 3D printed scaffolds as antibacterial materials for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *191*, 127–135. [[CrossRef](#)]
61. Zhao, X.; Zhou, L.; Li, Q.; Zou, Q.; Du, C. Biomimetic mineralization of carboxymethyl chitosan nanofibers with improved osteogenic activity in vitro and in vivo. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *195*, 225–234. [[CrossRef](#)]

62. Li, L.; Yu, M.; Li, Y.; Li, Q.; Yang, H.; Zheng, M.; Han, Y.; Lu, D.; Lu, S.; Gui, L. Synergistic anti-inflammatory and osteogenic n-HA/resveratrol/chitosan composite microspheres for osteoporotic bone regeneration. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 1255–1266. [[CrossRef](#)]
63. Cai, B.; Zou, Q.; Zuo, Y.; Li, L.; Yang, B.; Li, Y. Fabrication and cell viability of injectable n-HA/chitosan composite microspheres for bone tissue engineering. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 85735–85744. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

