UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro para la regeneración ósea

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bone regeneration

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manuel Estévez Amado

Directoras

Isabel Izquierdo Barba
Blanca González Ortiz

Madrid

© Manuel Estévez Amado, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro para la regeneración ósea

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bone regeneration

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manuel Estévez Amado

DIRECTORAS

Isabel Izquierdo Barba
Blanca González Ortiz

Agradecimientos

En las siguientes líneas quiero agradecer a todas aquellas personas e instituciones que de un modo u otro han estado presentes en esta etapa tan enriquecedora para mí.

A la profesora María Vallet Regí, por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en un grupo de investigación de excelente trayectoria científica, con infinitud de recursos y demostrada experiencia. De corazón, gracias Marita.

A mis directoras de tesis, Isabel Izquierdo Barba y Blanca González Ortiz, gracias por confiar en mí desde la primera semana que trabajamos juntos. Es muy satisfactorio echar la vista atrás y apreciar todo lo que he aprendido a vuestro lado durante estos años. Gracias por el apoyo, por la cercanía, la dedicación y la paciencia. Sin duda, todo ello ha contribuido a que esta haya sido una bonita etapa. Blanca, gracias por escuchar mis dudas infinitas, por comprenderme y por enseñarme los trucos y la química en el laboratorio. Ha sido un placer trabajar contigo, creo que en gran medida ha sido porque tenemos un carácter bastante parecido, han sido muchas las veces que me he visto reflejado en ti. Isabel, gracias por tus sabios consejos, pero, sobre todo, gracias por alentarme a conseguir cualquier cosa que me proponga. Tu constante labor ha sido un ejemplo para mí. “Dicen que las Isabeles son humildes y calladas, Isabel es la que puede llevar el pleito a Granada, ¡ole, ole, ole y ole! Y volver con los papeles.” (Sones de Montehermoso).

A la Unión Europea, por la financiación proporcionada a través del proyecto GIOTTO (*Active aGeIng and Osteoporosis: The next challenge for smarT nanobiOmaterials and 3D technologies*) dentro del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 y en virtud del convenio de subvención nº 814410, que me ha permitido colaborar con un gran número de grupos de investigación y empresas de toda Europa, y en definitiva poder llevar a cabo esta tesis doctoral. Al programa Erasmus+, por la financiación que me facilitó realizar una estancia predoctoral en el *Politecnico di Torino* (Turín, Italia). A los proyectos PID2020-117091RB-I00 (Nano&Niche) del Ministerio de Ciencia e Innovación y ERC-2015-AdG propuesta nº 694160 (VERDI) de la Unión Europea, por la financiación aportada a lo largo de todos estos años.

To Giorgia Montalbano, Sonia Fiorilli and Chiara Vitale Brovarone, for welcoming me with open arms during my pre-doctoral stay, sharing their knowledge with me and making me feel part of their research group from day one.

Thanks to all GIOTTO project partners for the good work and knowledge shared, with special mention to Lorenzo Moroni, Clarissa Tomasina, Giovanni Vozzi, Carmelo de Maria, Amedeo Bonatti, Elisa Batoni and Julian Crespo, for your efforts in collaborative research. To Chiara Vitale Brovarone, for her excellent dedication as project coordinator.

Este trabajo se ha llevado a cabo en la Unidad Docente de Química Inorgánica (Bioinorgánica y Biomateriales) del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia. Quiero dar las gracias a todos sus miembros por formar un entorno laboral tan acogedor, realizar la tesis doctoral en este espacio ha sido una experiencia muy gratificante. Gracias también a los distintos Centros de Apoyo a la Investigación, especialmente al Centro Nacional de Microscopia Electrónica.

A la profesora de investigación Puerto Morales y a Álvaro Gallo, del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC), por guiarme tan bien cuando daba mis primeros pasos en este campo, por vuestra ayuda y por los valiosos consejos.

A Juana Serrano, por el cariño demostrado y la ciencia compartida durante estos años de colaboración.

A María Teresa y África, por la simpatía y la maestría que trasmitís, aunque coincidiéramos poco tiempo, ha sido un placer conoceros.

A Juan Carlos, por tus buenos días llenos de alegría cada mañana y por ofrecerme tu ayuda siempre que la he necesitado.

A Antonio Luis y a Jesús Román, por la experiencia y las anécdotas compartidas de camino a vigilar exámenes.

A Antonio Salinas, por la amabilidad, la simpatía y el aprecio demostrado todos estos años.

Gracias a Fer, por la paciencia, el buen hacer, las llaves Allen y las horas delante de la pantalla buscando fichas en las bases de datos.

A Jose, por todos los problemas resueltos en el ordenador y en las reuniones virtuales, y por tu ayuda con los envíos de muestras por Europa.

Gracias a Ana Martín, por ayudarme con tanta amabilidad siempre que ha estado en tu mano.

A Jesús Luis Pablos, por tener siempre unas cuantas de palabras amables y animadoras.

A Carla, por llegar con alegría, por preocuparte por todos (recién llegados y veteranos), y por ser la promotora de tantos planes que nos han regalado momentos muy bonitos.

A Dani Arcos, por las risas, los momentos de desconexión, los consejos y las mil historias compartidas durante la hora de comer.

Gracias a Miguel Manzano, por tu aprecio, por los consejos, por recordarme que siempre hay una parte positiva y por tu insistencia con los hábitos saludables. *No more burgers!*

A Vicky, por ayudarme siempre que lo he necesitado, especialmente cuando de un tema de prácticas se trataba, por alentarme a conseguir mis metas, y por permitirme invadir tu despacho tantísimas veces.

A Juan, por ofrecerme una solución cada vez que algún problema técnico se presentaba. Gracias también por convertir las pesadas bromas acostumbradas al inicio de esta etapa en el afecto y la confianza del final. “Dicen que los Juanes son parecidos al demonio, señores, tengo yo un Juan que parece un San Antonio.” (Jota de Esparragosa).

A Sandra, por tu ayuda y tu cariño todos estos años. Me quedo con tus despedidas cada tarde: “hasta mañana Manolete” o “¡no te vayas tarde Manolillo!”. Y por su puesto con el divertido viaje a Mánchester.

A Dani Lozano, por tu complicidad, por confiar en mí laboral y personalmente, por ayudarme cada vez que lo he necesitado, y por tener siempre un as debajo de la manga para compartir conmigo.

Ana, gracias por ser una excelente compañera de trabajo y acabar convirtiéndote en una gran amiga. Por ayudar, por animar y por ser capaz de transformar con tanta facilidad mis preocupaciones en momentos distendidos y graciosos. Tengo que mencionar la suerte que tuve al aprender contigo la tarea de la docencia en el laboratorio, gracias por enseñarme tan bien.

A Montse, por estar siempre dispuesta a enseñarme algo nuevo, y además hacerlo con gusto y gran detalle. Han sido muchos y buenos los momentos vividos, como los viajes a Cáceres, a Montecatini o a Mánchester. Recuerdo cuando un pinchazo en un momento inoportuno me obligó a cambiar una rueda del coche en el parking de la facultad, hasta ahí me echaste una mano, tengo pendiente regalarte una llave nueva. Como he dicho antes, fui afortunado al aprender la tarea de la docencia con Ana, pero además pude estrenarme compartiendo laboratorio contigo. Gracias por darme seguridad, libertad y confianza.

Nati, llegué cuando te habías marchado a Australia, no te conocía, pero digamos que algo podía imaginar por como hablaba la gente de ti. Efectivamente, estaban en lo cierto, eres una persona maravillosa en todos los aspectos. Gracias por ayudarme y guiarme cada vez que lo he necesitado, pero sobre todo gracias por escucharme con empatía.

A Miguel Gisbert, el Maño, contigo me pasó lo contrario, estabas en Japón cuando llegué al departamento, y no me preguntes por qué, pero al escuchar eso de “el Maño” al resto de compañeros me imaginaba a un tipo duro e inaccesible. Regresaste a Madrid, y para mi sorpresa el Maño resultó ser un tipo cercano, bromista, generoso y con muy buen corazón. Encontré en ti un gran apoyo personal y profesional, hasta convertirte en uno de mis imprescindibles allí. Maño gracias por los consejos, por las

charlas eternas, por los trucos en el laboratorio, por las caminatas aceleradas y por las risas aseguradas.

Querida Mónica, gracias por aparecer cuando más te necesitaba. Llevaba la mitad de esta carrera de fondo recorrida, la fatiga se notaba, y las circunstancias de la vida no acompañaban. Me cuesta expresar lo que supuso tu llegada para mí, pero fue algo así como un gran trago de agua fresca cuando más sediento estás. Pero eso solo fue el principio, jamás pude imaginar lo importante que llegarías a ser para mí. Gracias por escucharme con tantísima paciencia, por comprenderme, por dedicarme tu atención y tu tiempo y por enseñarme tantísimas cosas, desde el cuarto de cultivos a los ratos en Plaza Castilla.

A Anna, a Patricia y a Clara, por vuestra ayuda en el laboratorio y los bonitos momentos vividos cuando vosotras terminabais esta etapa y yo la comenzaba.

A mis primeros compañeros de despacho, que suerte tuve, ¡qué gran combinación, Elena, Javi y Víctor! Lo recuerdo como una etapa maravillosa, rompíamos a reír cada vez que alguno de nosotros ponía un pie en el despacho. Gracias a Víctor por tu espontaneidad y naturalidad, por tu ayuda y tu gran corazón, por tus adorables cabreos y por alguna que otra fiesta. A Javi, por pausar tus tareas cada vez que me surgía una duda (podéis imaginar la de veces que habrán sido…), por tu paciencia, tu generosidad y tu ayuda, por los ratos en deportes y por alguna que otra tarde de juegos de mesa, gracias de corazón chicos. A Elena, por vivir la vida con humor y contagiarlo a los demás. Sin duda, me quedo con lo felices que hemos sido riéndonos juntos, gracias de verdad. Aunque fueron muchas jornadas de trabajo, nos bastaron dos para convertirnos en inseparables. Gracias por conseguir que todos los momentos vividos fueran divertidos, desde Cantoblanco hasta Aluche pasando por las Rozas.

A mis últimos compañeros de despacho, Alberto y Álex I, gracias por todos los momentos de desconexión que tanto me han ayudado en estos meses. Me da pena no haber podido compartir más tiempo con vosotros, pero me alegro mucho de que por lo menos hayamos coincidido. Álex, gracias de corazón por hablar tan bien de mí siempre, me llena de orgullo que recuerdes aquella charla antes de comenzar esta andadura. Alberto, nada más conocerte pude intuir el gran corazón que tenías, gracias por demostrarlo a diario con todas las personas que te rodean. Sé que Barcelona y Segovia no fueron mis mejores momentos, pero los disfruté mucho por compartirlos contigo. Jamás te prometeré un congreso con noche en un barco-hotel, pero te prometo una fiesta en condiciones, te la debo.

A las últimas incorporaciones, Jose y Álex II, os deseo la mejor de las experiencias, disfrutad del camino.

Quiero agradecer también a todas aquellas personas con las que, aunque por menos tiempo, he compartido buenos momentos en la Facultad, Noemí, Gonzalo,

Alejandro, Tamara, Rafa, Monica Mura, Bianca, Cathe, Rafi, Vero, Laura, Rim y muchas más que seguro se me olvidan.

To my colleagues in Turin, Francesco, Mattia, Alice, Laura, Ilaria, Fede and Giorgia, for welcoming me with so much love and helping me in everything I needed. Also to Clarissa, for hosting me in Milan and our trips to Manchester and Camogli.

A mis amigos de Madrid, por cuidar de mí y hacerme sentir tan bien. A mis amigos de Villa del Rey y Brozas, por mantener la lumbre encendida para que uno siempre esté deseando volver a casa.

A Isabel, Celia, Joseja, Josemi y Felipe, por estar siempre cerca y sostenerme, pase lo que pase.

A Belén, gracias por ser tan generosa conmigo y quererme tan bonito, por cuidar de mí y por entenderme con media mirada.

A mis abuelos, los que están y los que se adelantaron en el viaje, por ser el mejor ejemplo de esfuerzo, trabajo y perseverancia para mí, por abrirnos camino a todos, por el cobijo y el amor puro. A Flora, por enseñarme lo bonito que es vivir con humor, amor, coraje y una fuerza arrolladora.

A mis tíos, Luis y Oresti, Rosa y Manolo, Fernando y Ana, Julián y Yolanda, a mis primos, Ricardo, María, Héctor, Mireia, Beatriz, Saioa y Eneko, por vuestro apoyo y amor, no solo estos años de tesis, sino todos los años de mi vida.

A Cristina, mi hermana, porque no soy nada sin ti. Hemos compartido todo y solo deseo que sea siempre así. Gracias por llevarme de la mano, desde mi primer día de cole hasta mi último viaje a Turín, no me sueltes nunca.

Te adoro.

A mi madre, Ana, por ser ejemplo de lucha, esfuerzo y superación. Por no esconder nunca la crudeza de la vida. Por recordarme mi valía cada día, sin olvidarte de la importancia del esfuerzo y la dedicación. Pero, sobre todo, gracias por enseñarme que lo más importante es ser feliz, aunque haya mucho que perder en el camino.

Te amo.

A mi padre, Manolo, por la vida, por el campo, por los recuerdos, por nuestras raíces, por las fechas, por los valores, por compartir tu sabiduría conmigo, por enseñarme algo nuevo hasta en el último de tus días. Sembraste tanto y tan bien, que todavía aquí seguimos recogiendo tu cosecha. No te doy las gracias por haberlo hecho así, sino por haberme enseñado a hacerlo, al menos, parecido.

Te quiero.

Índice

Índice

Resumen / Summary **15**

1. Introducción **25**

1.1. Tejido óseo 27

1.2. Osteoporosis y fracturas osteoporóticas 33

1.3. Curación de fracturas óseas 36

1.4. Injertos óseos e ingeniería del tejido óseo 41

1.5. Andamiajes y dispositivos (biomateriales, propiedades y técnicas de fabricación) 44

1.6. Mecanotransducción 53

1.7. Nanotecnología y nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) 60

1.7.1. Síntesis de SPIONs 64

1.7.2. Recubrimiento y funcionalización de SPIONs 67

1.7.3. Aplicación de las SPIONs en la ingeniería del tejido óseo 70

2. Objetivos / Objectives **119**

3. Resultados y discusión **125**

3.1. SPIONs sintetizadas por descomposición térmica para su uso en regeneración ósea 127

3.1.1. Introducción y resumen 127

Artículo: *Magnetic colloidal nanoformulations to remotely trigger mechanotransduction for osteogenic differentiation* 135

3.2. Fabricación de andamios tridimensionales magnéticos mediante electrohilado .163

3.2.1. Introducción y resumen 163

Artículo: *Incorporation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Collagen Formulation for 3D Electrospun Scaffolds* 169

3.3. Fabricación de andamios funcionales 3D combinando el modelado por deposición fundida y la impresión por inyección de tinta de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro 191

3.3.1. Introducción 191

3.3.2. Materiales y métodos 195

3.3.3. Resultados y discusión 204

3.3.4. Conclusiones 218

3.4. Escalabilidad: SPIONs sintetizadas mediante pirólisis por pulverización en llama 227

3.4.1. Introducción y resumen 227

Artículo: *Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: In vitro biological evaluation for biomedical applications* 235

4. Conclusiones / Conclusions..... 255

Anexo I. Glosario de abreviaturas y siglas 265

Anexo II. Glosario de materiales desarrollados.....273

Anexo III. Técnicas de caracterización fisicoquímica y bioanalíticas.....277

Anexo IV. Biorreactor magnético 291

Anexo V. Publicaciones científicas y comunicaciones a congresos durante la tesis doctoral.....295

Resumen / Summary

Resumen

Cada tres segundos una persona sufre una fractura osteoporótica en el mundo y, con el aumento progresivo de la esperanza de vida, se espera que la incidencia se duplique en pocas décadas. Las fracturas óseas osteoporóticas causan dolor permanente, disminuyen la calidad y la esperanza de vida de los pacientes afectados y en muchas ocasiones precisan intervención quirúrgica. Cuando la intervención para tratar la fractura consiste en el implante de un injerto óseo, los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos e implantes sintéticos son las alternativas disponibles. En este sentido, las conocidas limitaciones asociadas con el uso clínico de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos continúan impulsando los esfuerzos para desarrollar implantes sintéticos que favorezcan la regeneración ósea, utilizando los principios de los biomateriales y la ingeniería de tejidos. Sin embargo, a pesar de años de esfuerzo, aún no se ha desarrollado el material de reconstrucción ósea perfecto. Por tanto, existe una necesidad médica insatisfecha de implantes capaces de aumentar las posibilidades de devolver al hueso fracturado su forma y función.

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo dentro del marco del proyecto europeo GIOTTO (*Active aGeIng and Osteoporosis: The next challenge for smarT nanobiOmaterials and 3D technologies*), cuyo objetivo consistía en desarrollar nuevos dispositivos médicos para tratar las fracturas osteoporóticas, ofreciendo soluciones específicas para distintos tipos de fracturas, estimulando la regeneración ósea y reduciendo al mismo tiempo la pérdida de hueso. El desarrollo de nuevos dispositivos se ha basado en la utilización de tecnologías de vanguardia en los campos de la fabricación avanzada, la nanotecnología y la biotecnología.

No obstante, es necesario un mayor esfuerzo para que este objetivo sea factible. Por ello, otra de las estrategias de ingeniería tisular ósea, recogida en los objetivos del proyecto GIOTTO, consistía en el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas e incorporadas en los diferentes dispositivos para permitir la mecanotransducción controlada y aumentar así la reparación de las fracturas óseas. La presente tesis doctoral se enmarca en este objetivo concreto del proyecto. Por tanto, el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido la obtención de nuevos andamios nanoestructurados con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) que permitan la mecanotransducción celular a distancia para el tratamiento de fracturas óseas. La estrategia se basa en la capacidad de las SPIONs de responder a campos magnéticos externos generando estímulos mecánicos en las células con las que se encuentran en contacto, y en última instancia, en la capacidad de las células de transformar los estímulos mecánicos en señales bioquímicas que las dirijan hacia la diferenciación osteogénica y la formación de hueso. En la presente tesis doctoral hemos abordado este objetivo a través de los siguientes estudios:

1. Síntesis de las SPIONs mediante descomposición térmica como método reproducible y bien establecido, funcionalización de las nanopartículas con el péptido Arg-Gly-Asp (RGD) para el direccionamiento a las integrinas celulares y evaluación de su potencial como herramientas que permitan desencadenar la diferenciación osteogénica.
2. Incorporación de las SPIONs sintetizadas por descomposición térmica en dos tipos de andamios tridimensionales destinados a la regeneración ósea.
3. Producción de SPIONs mediante pirólisis por pulverización en llama, a gran escala y en colaboración con una empresa para potenciar la investigación traslacional y acercar los materiales desarrollados al mercado.

En el primer estudio presentado, las SPIONs se han sintetizado mediante la descomposición térmica de un oleato de hierro producido previamente. Tras la síntesis, se llevó a cabo un intercambio de ligando con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) para transferir las nanopartículas sintetizadas a un medio acuoso (SPIONs-DMSA). A continuación, las SPIONs se funcionalizaron con el péptido RGD (SPIONs-DMSA-RGD) para favorecer el direccionamiento hacia a las integrinas, las cuales presentan un papel mecanosensor en las células. Seguidamente se evaluó su respuesta *in vitro* con células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea (hBM-MSCs). Las nanopartículas presentaron una elevada biocompatibilidad y una captación celular dependiente de la dosis, la funcionalización y el tiempo de exposición. Por último, se demostró el aumento en la diferenciación osteogénica de las hBM-MSCs cuando estas se exponen a las SPIONs funcionalizadas con el péptido RGD y pasados 30 minutos se aplica un campo magnético externo durante 1 hora. Estos resultados confirman el potencial de las SPIONs sintetizadas por descomposición térmica para favorecer la diferenciación osteogénica.

En relación con la incorporación de las SPIONs en los andamios tridimensionales, se han seguido dos estrategias diferentes. La primera de ellas se basa en la incorporación de una suspensión acuosa de SPIONs recubiertas con DMSA en una solución de colágeno tipo I para producir andamios magnéticos mediante el procesado de la formulación por electrohilado. La metodología optimizada permitió la producción de andamios nanoestructurados compuestos por fibras de colágeno con SPIONs incrustadas en su interior. Los andamios electrohilados con SPIONs incorporadas demostraron conservar las propiedades magnéticas de las nanopartículas de partida. Finalmente, la evaluación biológica del material confirmó una alta biocompatibilidad con células preosteoblasticas de ratón (MC3T3-E1) y hBM-MSCs. El conjunto de resultados convierte a estas matrices en excelentes candidatas para explorar los estímulos magnéticos en diferentes aplicaciones biomédicas. Concretamente, como perspectiva futura, este tipo de enfoque persigue el movimiento de las SPIONs al aplicar un campo magnético externo para provocar el movimiento del conjunto de las fibras y que este sea percibido por las células adheridas al biomaterial.

La segunda estrategia se basa en la incorporación de las SPIONs descritas en el primer trabajo de esta tesis (SPIONs-DMSA y SPIONs-DMSA-RGD) en la superficie de andamios poliméricos tridimensionales compuestos por una mezcla polimérica de ácido poli-L-láctico, policaprolactona y poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). En este enfoque, el objetivo consiste en incorporar las SPIONs en la superficie del andamio para favorecer el contacto directo a largo plazo entre las nanopartículas y la superficie de las células. Para la obtención de los andamios magnéticos se combinaron dos técnicas. En primer lugar, se fabricaron los andamios tridimensionales mediante el modelado por deposición fundida (FDM) de la mezcla polimérica. En un segundo paso, se depositaron las SPIONs en la superficie de los andamios mediante la impresión por inyección térmica de tinta por goteo a demanda, utilizando las suspensiones acuosas de SPIONs como tinta. Además, se demostró la precisión y versatilidad de la técnica mediante la producción de andamios con diferentes cantidades de SPIONs (25 y 50 capas de impresión). Seguidamente, se realizaron ensayos *in vitro* con hBM-MSCs que demostraron la elevada citocompatibilidad y el potencial osteogénico de los andamios magnéticos desarrollados cuando se aplica un campo magnético externo.

En el último estudio presentado en esta tesis doctoral, se sintetizaron SPIONs a gran escala mediante pirólisis por pulverización en llama (FSP), se optimizaron los parámetros del proceso hasta obtener una distribución homogénea en el tamaño de las nanopartículas y se trató su superficie para recubrirla con DMSA con el fin de mejorar la estabilidad coloidal en medios acuosos. Todo esto se consiguió sin afectar a las propiedades superparamagnéticas de las nanopartículas. A continuación, los estudios *in vitro* con células de sangre periférica y hBM-MSCs demostraron una adecuada hemocompatibilidad y biocompatibilidad, validando el potencial de estas nanopartículas producidas a gran escala para su uso en aplicaciones biomédicas.

El conjunto de resultados recogidos en esta tesis doctoral pone de manifiesto el potencial y el interés del uso de SPIONs en combinación con campos magnéticos externos para facilitar la regeneración de defectos óseos.

Summary

Every three seconds a person suffers an osteoporotic fracture worldwide and, with the progressive increase in life expectancy, the incidence is expected to double in a few decades. Osteoporotic bone fractures cause permanent pain, decrease the quality of life and life expectancy of affected patients and often require surgical intervention. When the intervention to treat the fracture consists of the implantation of a bone graft, autografts, allografts, xenografts and synthetic implants are the available alternatives. In this regard, the known limitations associated with the clinical use of autografts, allografts and xenografts continue to drive efforts to develop synthetic implants that promote bone regeneration, using the principles of biomaterials and tissue engineering. However, despite years of effort, the perfect bone reconstruction material has not yet been developed. Therefore, there is an unmet medical need for implants capable of increasing the chances of restoring form and function to fractured bone.

This doctoral thesis has been carried out within the framework of the European project GIOTTO (*Active aGeIng and Osteoporosis: The next challenge for smarT nanobiOmaterials and 3D technologies*), whose objective was to develop new medical devices to treat osteoporotic fractures, offering specific solutions for different types of fractures, stimulating bone regeneration and reducing bone loss at the same time. The development of new devices has been based on the use of cutting-edge technologies in the fields of advanced manufacturing, nanotechnology and biotechnology.

However, more effort is needed to make this goal feasible. Therefore, another of the bone tissue engineering strategies, included in the objectives of the GIOTTO project, consisted of the use of functionalised magnetic nanoparticles incorporated into the different devices to allow controlled mechanotransduction and thus increase the repair of bone fractures. This doctoral thesis is framed within this specific objective of the project. Therefore, the general objective of this doctoral thesis has been to obtain new nanostructured scaffolds with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) that enable remote cell mechanotransduction for the treatment of bone fractures. The strategy is based on the ability of SPIONs to respond to external magnetic fields by generating mechanical stimuli in the cells with which they are in contact, and ultimately on the ability of the cells to transform the mechanical stimuli into biochemical signals that direct them towards osteogenic differentiation and bone formation. In this doctoral thesis, we have addressed this objective through the following studies:

1. Synthesis of SPIONs by thermal decomposition as a reproducible and well-established method, functionalisation of the nanoparticles with Arg-Gly-Asp (RGD) peptide for targeting cellular integrins and evaluation of their potential as tools to trigger osteogenic differentiation.
2. Incorporation of SPIONs synthesised by thermal decomposition into two types of three-dimensional scaffolds for bone regeneration.

3. Production of SPIONs by flame spray pyrolysis, on a large scale and in collaboration with a company to promote translational research and bring the developed materials closer to the market.

In the first study presented, SPIONs have been synthesised by thermal decomposition of a previously produced iron oleate. After synthesis, a ligand exchange with dimercaptosuccinic acid (DMSA) was carried out to transfer the synthesised nanoparticles to an aqueous medium (SPIONs-DMSA). The SPIONs were then functionalised with the RGD peptide (SPIONs-DMSA-RGD) to promote targeting to integrins, which play a mechanosensing role in cells. Their *in vitro* response was then evaluated with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs). The nanoparticles showed high biocompatibility and a dose-, functionalisation- and exposure time-dependent cellular uptake. Finally, increased osteogenic differentiation of hBM-MSCs was demonstrated when hBM-MSCs were exposed to SPIONs functionalised with RGD peptide and after 30 minutes an external magnetic field was applied for 1 hour. These results confirm the potential of SPIONs synthesised by thermal decomposition to promote osteogenic differentiation.

Regarding the incorporation of SPIONs in three-dimensional scaffolds, two different strategies have been followed. The first one is based on the incorporation of an aqueous suspension of DMSA-coated SPIONs in a type I collagen solution to produce magnetic scaffolds by processing the formulation by electrospinning. The optimised methodology allowed the production of nanostructured scaffolds composed of collagen fibres with SPIONs embedded inside. The electrospun scaffolds with embedded SPIONs were shown to retain the magnetic properties of the starting nanoparticles. Finally, biological evaluation of the material confirmed a high biocompatibility with mouse pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1) and hBM-MSCs. The set of results makes these matrices excellent candidates to explore magnetic stimuli in different biomedical applications. Specifically, as a future perspective, this type of approach pursues the movement of SPIONs by applying an external magnetic field to provoke the movement of the fibres as a whole, which is perceived by the cells attached to the biomaterial.

The second strategy is based on the incorporation of the SPIONs described in the first work of this thesis (SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD) on the surface of three-dimensional polymeric scaffolds composed of a polymeric mixture of poly-L-lactic acid, polycaprolactone and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). In this approach, the aim is to incorporate the SPIONs on the surface of the scaffold to promote long-term direct contact between the nanoparticles and the cell surface. Two techniques were combined to obtain the magnetic scaffolds. First, the three-dimensional scaffolds were fabricated by fused deposition modelling (FDM) of the polymer mixture. In a second step, SPIONs were deposited on the surface of the scaffolds by thermal drop-on-demand inkjet printing, using the aqueous suspensions of SPIONs as ink. Furthermore, the accuracy and versatility of the technique was demonstrated by producing scaffolds with

different amounts of SPIONs (25 and 50 printing layers). Subsequently, *in vitro* assays with hBM-MSCs demonstrated the high cytocompatibility and osteogenic potential of the developed magnetic scaffolds when an external magnetic field is applied.

In the last study presented, SPIONs were synthesised on a large scale by flame spray pyrolysis (FSP), the process parameters were optimised to obtain a homogeneous size distribution of the nanoparticles and their surface was treated and coated with DMSA to improve the colloidal stability in aqueous media. This was achieved without affecting the superparamagnetic properties of the nanoparticles. Subsequently, *in vitro* studies with peripheral blood cells and hBM-MSCs demonstrated adequate hemocompatibility and biocompatibility, validating the potential of these large-scale nanoparticles for use in biomedical applications.

The set of results collected in this doctoral thesis highlights the potential and interest of using SPIONs in combination with external magnetic fields to facilitate the regeneration of bone defects.

1. Introducción

1.1. Tejido óseo

Los huesos son órganos del sistema esquelético que proporcionan forma, soporte mecánico y protección al cuerpo y facilitan el movimiento. Además, los huesos contribuyen a la homeostasis mineral del cuerpo, participan en la regulación endocrina del metabolismo energético [1,2] y desempeñan un papel clave en la hematopoyesis y el metabolismo del calcio [3]. Los cristales óseos son el principal reservorio de calcio, fosfato e iones esenciales para los procesos metabólicos y fisiológicos [4].

Hay dos tipos de tejido óseo: **cortical** (compacto) que supone el 80% [5], y **trabecular** (esponjoso) (**Figura 1.1.**). La composición celular y molecular de ambos es idéntica [6], sin embargo, difieren en su arquitectura y función. Las diferencias en la estructura se deben a las funciones de cada tipo de hueso, el hueso esponjoso es responsable de transferir la carga mecánica al hueso cortical y de realizar funciones metabólicas [7,8], mientras que el hueso cortical proporciona funciones mecánicas y protectoras [9].

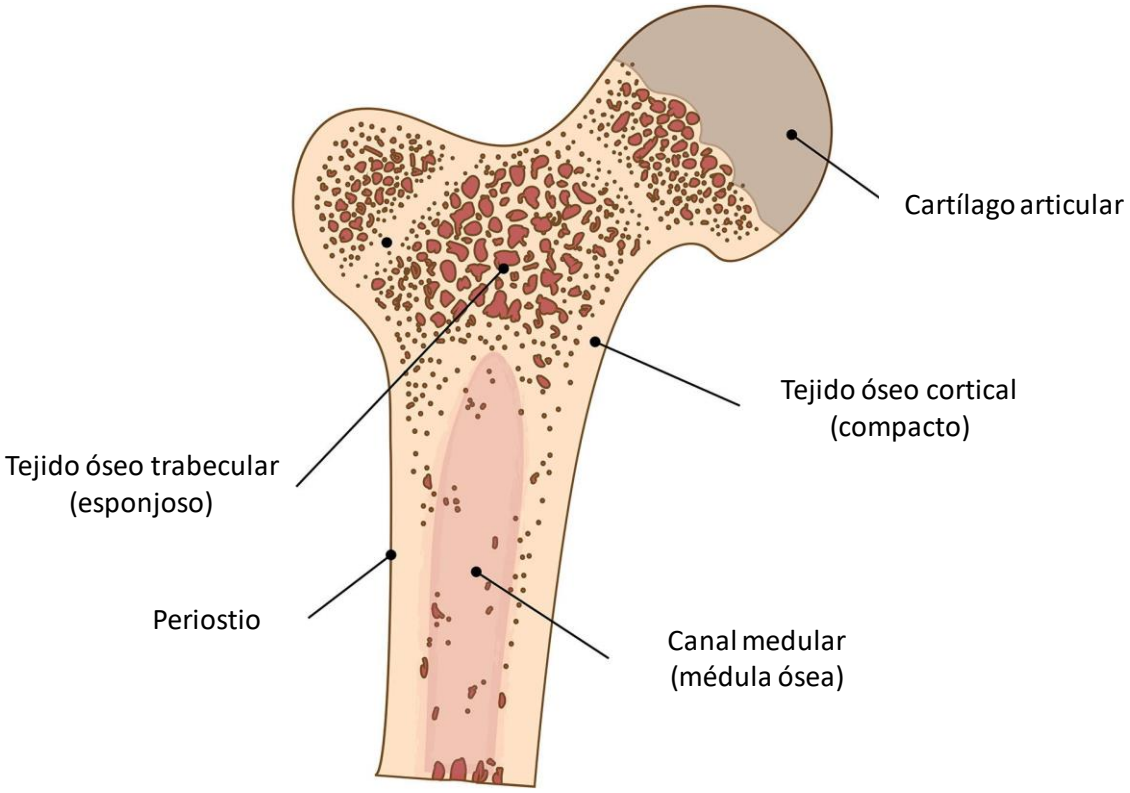


Figura 1.1. Diagrama esquemático del tejido óseo. Adaptada de la referencia [10].

El hueso es una estructura compuesta por **células** y **matriz extracelular** (ECM) [11]. Por su parte, la matriz extracelular está compuesta por componentes orgánicos y componentes inorgánicos.

Los componentes celulares del tejido óseo incluyen osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células de revestimiento óseo (BLC) y células precursoras osteogénicas (osteoprogenitoras mesenquimales) [3,12] (**Figura 1.2.**). Cada tipo celular tiene una función específica y para poder desarrollarla necesita de una continua comunicación con el resto de tipos celulares.

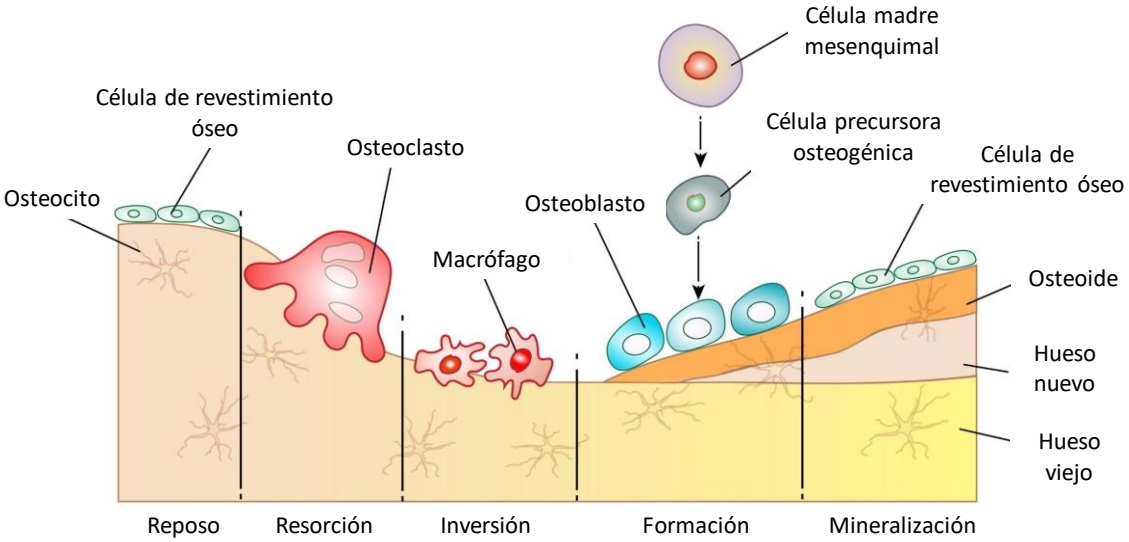


Figura 1.2. Composición celular del hueso y esquema simplificado del proceso de regeneración ósea. Adaptada de la referencia [10].

Las **células precursoras osteogénicas** son un tipo de células madre que derivan de las células mesenquimales y son capaces de diferenciarse en osteoblastos maduros y luego en células del revestimiento óseo y osteocitos [11].

Los **osteoblastos** representan el 4-6% de las células del hueso, localizándose principalmente en la superficie del hueso. Son células cuboidales que presentan un mayor tamaño de retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, además de un gran número de vesículas secretoras [13]. Estas células producen colágeno y se encargan de la síntesis, regulación, deposición y mineralización de la ECM [12,14]. Además, estas células actúan como mecanosensores para los huesos [14]. Los osteoblastos provienen de la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs) y para que este hecho tenga lugar es necesario que se activen determinados procesos dentro de las células (**Figura 1.3.**), entre los que destacamos:

- La expresión de *Runx2* y *Osterix*: estos genes son cruciales para la diferenciación de las células osteoprogenitoras a osteoblastos [15]. La carencia de *Runx2* da lugar a un fenotipo sin osteoblastos [16].

- La expresión de la fosfatasa alcalina (ALP): su expresión se correlaciona con la síntesis de colágeno I y proteínas de la matriz extracelular, la adquisición de la morfología de los osteoblastos [13] y la mineralización [17-19].

Una vez termina la diferenciación, el osteoblasto queda recubierto de la matriz extracelular que se comienza a mineralizar. Es en esta etapa cuando el osteoblasto puede iniciar la apoptosis, comenzar su diferenciación a osteocito o diferenciarse a BLC [20].

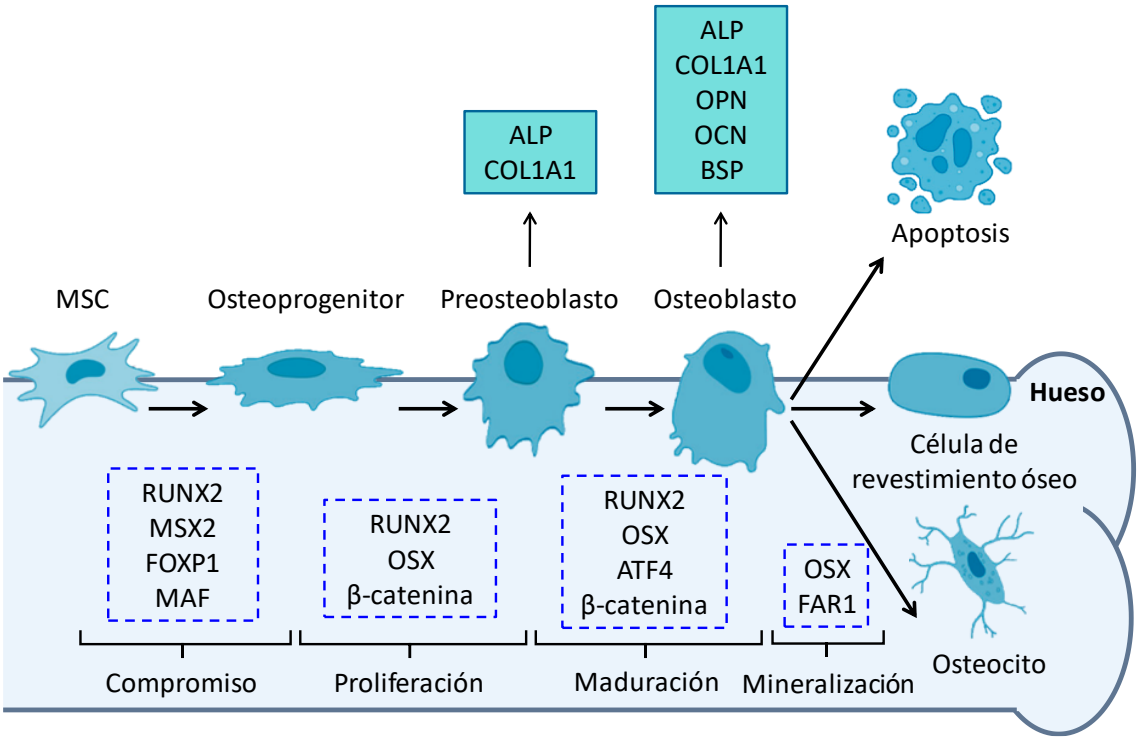


Figura 1.3. Representación esquemática de la diferenciación de las células del linaje de los osteoblastos. El proceso de diferenciación se divide en cuatro etapas. Los marcadores representativos de preosteoblastos y osteoblastos se presentan en los recuadros correspondientes encima de las flechas y los factores de transcripción implicados en la diferenciación se presentan en los recuadros con línea discontinua. Adaptada de la referencia [17].

Los **osteocitos** representan el 90-95% del número total de células que componen el hueso [21]. Los osteocitos son células con forma dendrítica con una superficie casi 100 veces superior a la superficie del hueso trabecular [22]. Como se ha mencionado, los osteocitos provienen de los osteoblastos. En el proceso de diferenciación de osteoblasto a osteocito se producen cambios morfológicos y ultraestructurales, entre los que destacan la encapsulación en el osteoide, la reducción del tamaño del citoplasma, así como de los orgánulos de su interior, y finalmente la mineralización de

la matriz extracelular [21]. Estas células también funcionan como mecanosensores, permitiendo la regulación de osteoblastos y osteoclastos en función de las presiones y cargas mecánicas [23].

Las **células de revestimiento óseo (BLC)** se caracterizan por presentar una morfología aplanada y alargada. Las BLC presentan pocos orgánulos citoplasmáticos e incluso carecen de algunos de ellos como es el caso de los ribosomas [24]. Las BLC se localizan en la superficie del hueso formando varias capas dando lugar a uniones de tipo gap entre las BLC y los osteocitos. Su función está aún en debate. Sin embargo, participan en la regulación de la remodelación ósea por medio de la secreción de osteoprotegerina (OPG) y ligando activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) necesarios para la diferenciación de los osteoclastos [25].

Los **osteoclastos** son células grandes multinucleadas que derivan del linaje de las células madre mononucleares hematopoyéticas (línea macrófagos-monocitos), producen enzimas proteolíticas y tienen un papel importante en la resorción ósea, la excreción de calcio y fosfato, la curación y la remodelación ósea [6]. Durante la remodelación ósea los osteoclastos se anclan a la matriz extracelular mediante el dominio conocido como zona de sellamiento, permitiendo la colocación del ribete en cepillo en la región del hueso en la que comenzará el proceso de reabsorción [26] Tras esto se forman unos pequeños podosomas en el ribete en forma de cepillo necesarios para la reabsorción [27]. En este momento, el ribete en cepillo se divide en dos dominios a su vez: la zona clara responsable de la endocitosis de los productos de degradación y la zona periférica de fusión, responsable de la acidificación del medio y excreción de vesículas con diversas enzimas relacionadas con la degradación y anclaje a la matriz. Las más destacadas son:

- Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP): involucrada en la adhesión de los osteoclastos al hueso por medio de la regulación de la proteína osteopontina, la desfosforilación de ciertas proteínas de la matriz, el tráfico vesicular de los productos de degradación y la formación del dominio de membrana conocido como la zona de sellado [28].
- Catepsina K: una enzima clave en la degradación de la ECM del hueso al tener como sustrato el colágeno I y la conectina entre otras [29].
- Metaloproteinasa-9 (MMP-9): una enzima colagenasa que además de degradar proteínas del tipo colágeno, también participa en la migración de los osteoclastos [30].

La interacción entre la matriz extracelular del hueso y las enzimas secretadas por el osteoclasto da lugar a una concavidad denominada laguna de reabsorción.

Aproximadamente el 20% del hueso es agua y el peso seco se compone de un 30%-35% de sustancias **orgánicas** y un 65%-70% de sustancias **inorgánicas** [31].

La **fase orgánica** de la matriz extracelular ósea, también conocida como osteoide, incluye fibras de colágeno tipo I [8], otros tipos de colágeno (como el colágeno tipo III, V, etc.), proteínas no colágenas como proteoglicanos, glicoproteínas, fosfoproteínas [7], byglicano, decorina, osteonectina, trombospondina, fibronectina, osteopontina, sialoproteína ósea, osteocalcina [12] y fosfolípidos [7]. Las proteínas colágenas constituyen aproximadamente el 90 % del contenido orgánico del hueso mientras que el 10% restante está compuesto por proteoglicanos y numerosas proteínas no colágenas. El colágeno se puede definir como una proteína estructural que contiene uno o más dominios α que se superenrollan formando una triple hélice dextrógira. Existen 21 tipos de colágeno dentro del cuerpo y se clasifican en tres grupos:

- Colágenos fibrilares: este grupo está formado por los colágenos tipo I, II, V y XI. Se caracterizan por formar triples hélices largas y continuas que se autoensamblan en fibrillas organizadas. Tienen una elevada resistencia a la tracción y juegan un papel crucial al aportar soporte estructural.
- Colágenos asociados a fibrillas: este grupo está constituido por los colágenos tipo IX, XII y XIV. Se encargan de interconectar diferentes fibrillas de colágeno y mediar interacciones con otros componentes de la matriz extracelular.
- Colágenos formadores de láminas: este grupo está compuesto por los colágenos tipo IV y VII, su función consiste en formar una red tridimensional que constituye el componente principal de las membranas basales.

De todos ellos, el colágeno de tipo I es el más importante debido a que puede recubrirse de nanocristales en el proceso de mineralización del hueso [32].

La **fase inorgánica** de la matriz ósea está formada principalmente por sales minerales cristalinas y calcio en forma de hidroxiapatita [13]. Además de esto, las sustancias inorgánicas también incluyen un 85% de fosfato tricálcico, un 10% de carbonato de calcio y un 5% de derivados de fluoruro como fluoruro de calcio y fluoruro de magnesio [11].

La **formación de hueso (osteogénesis)** se produce en el desarrollo embrionario, en el crecimiento y cuando se produce una fractura o defecto en el hueso. Este proceso se da a través de dos mecanismos, formación de hueso **intramembranosa** y **endocondral**. En la forma intramembranosa, la formación ósea se produce sin mediación de la fase cartilaginosa. En la formación de hueso endocondral, a la síntesis inicial de cartílago le sigue la secuencia endocondral de formación de hueso [33]. El hueso puede sintetizarse mediante osificación intramembranosa, endocondral o una combinación de ambas. La diferencia esencial entre estos procesos es la presencia o ausencia de fase cartilaginosa. La osificación intramembranosa ocurre cuando las células precursoras mesenquimales proliferan y posteriormente se diferencian directamente en osteoblastos que secretan los componentes del osteoide y finalmente se da la mineralización hasta la formación del hueso maduro; pero en la osificación endocondral,

las células mesenquimales en el primer paso se diferencian en condrocitos y secretan la matriz cartilaginosa. El hueso formado a partir de la osificación endocondral tiene mejores propiedades biomecánicas que el hueso formado a partir de la osificación intramembranosa porque en la osificación endocondral se forma una matriz estable a partir del cartílago y luego se inicia la calcificación, pero en la osificación intramembranosa, solo se forman las trabéculas de hueso [34].

La mineralización ósea es igual en ambos procesos de osificación, inicialmente se produce la secreción de colágeno I, así como varias proteínas no colágenas y proteoglicanos que forman la matriz extracelular. Después se lleva a cabo la mineralización de la matriz producida en dos fases: **vesicular** y **fibrilar** (**Figura 1.4.**) [35]. En la fase vesicular los osteoblastos producen pequeñas vesículas que acumulan calcio [36] y fósforo inorgánico. La presencia de fosfolípidos con afinidad por el calcio [37] mantiene separados al calcio y al fósforo acumulados [38]. Los osteoblastos secretan las vesículas a la matriz extracelular donde se unen a los proteoglicanos y otros componentes. Después los osteoblastos secretan enzimas (metaloproteinasas) que degradan los proteoglicanos, esto permite que los iones calcio y fósforo se acerquen y nucleen formando los nanocristales de hidroxiapatita [39]. En la fase fibrilar la hidroxiapatita formada en la vesícula crece y atraviesa la membrana de la vesícula, liberándose a la matriz. La hidroxiapatita crece gracias al calcio y fósforo presentes en el fluido fisiológico y se acumula entre las fibrillas de colágeno de la matriz [40,41].

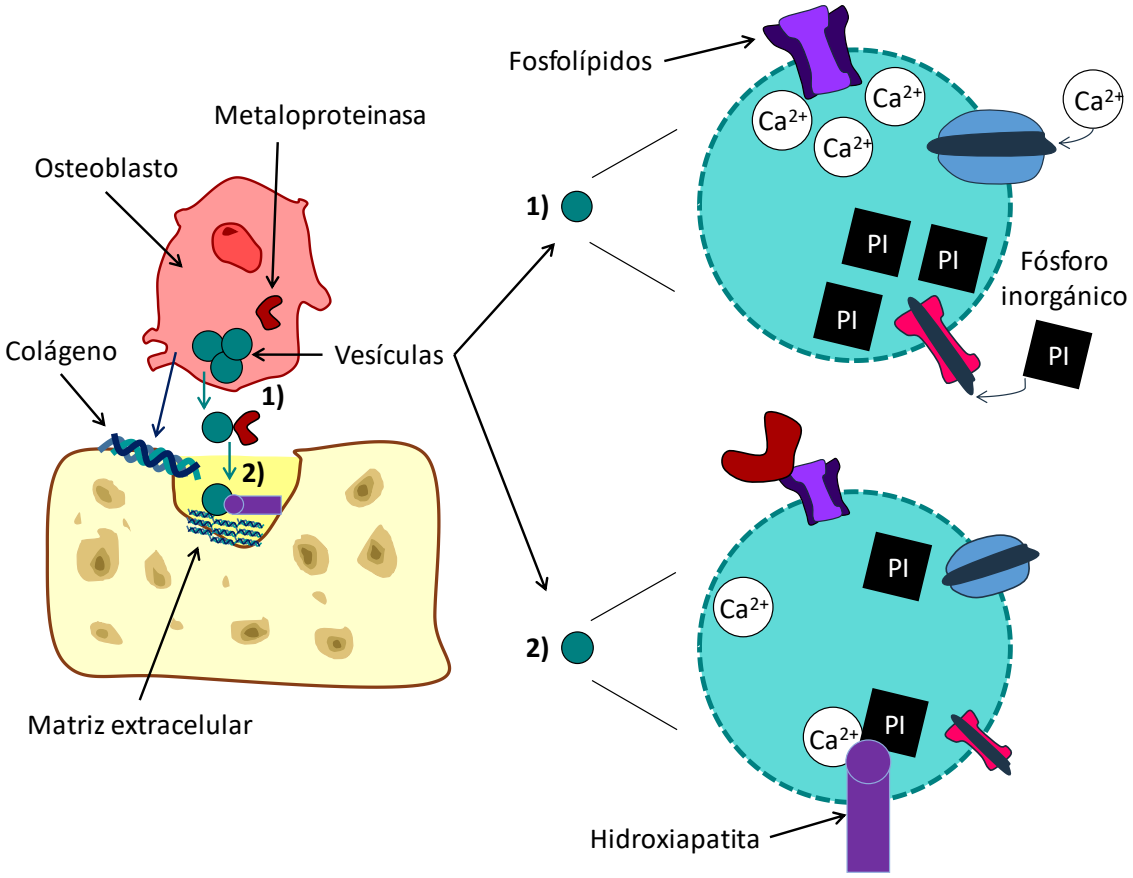
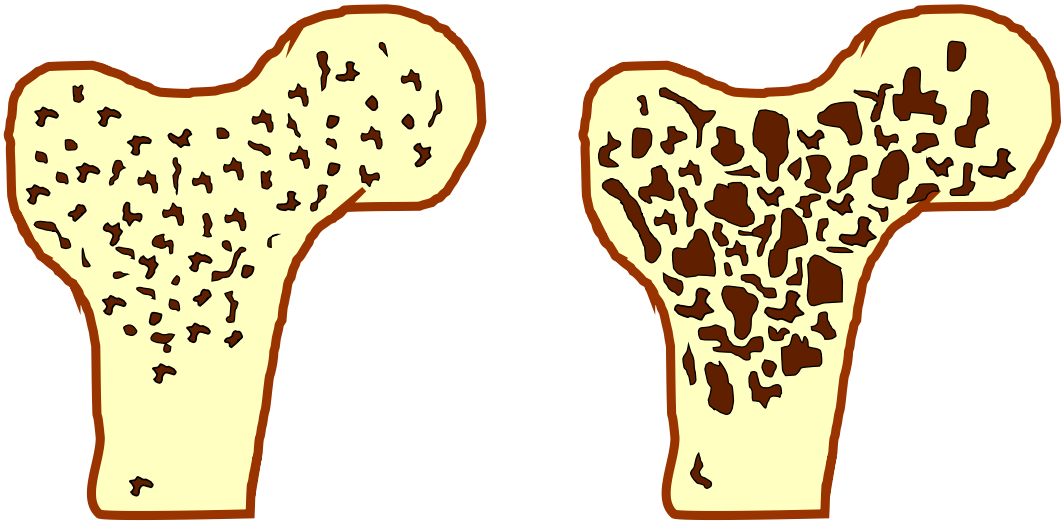


Figura 1.4. Mineralización mediada por los osteoblastos. **1)** Fase vesicular. **2)** Fase fibrilar.

Como se ha mencionado anteriormente, los huesos son órganos críticos involucrados en funciones muy importantes. Proporcionan forma, sustento, asistencia al movimiento y protección física de órganos vitales como el cerebro y el corazón. Sin embargo, las lesiones, fracturas, enfermedades, accidentes y trastornos funcionales pueden influir negativamente en las funciones cruciales de los huesos. Existen varias enfermedades que afectan al tejido óseo, una de ellas es la osteoporosis.

1.2. Osteoporosis y fracturas osteoporóticas

La osteoporosis es una enfermedad sistémica que se caracteriza por una disminución de la masa ósea con fragilidad esquelética asociada (**Figura 1.5.**), lo que se traduce en una menor resistencia de los huesos y un mayor riesgo de fractura [42-45]. La osteoporosis también se considera una enfermedad silenciosa, ya que no suele presentar síntomas hasta que se produce la primera fractura [44,46].



Hueso sano Hueso osteoporótico

Figura 1.5. Representación esquemática de un hueso trabecular sano y uno osteoporótico.

Con respecto a la etiología de la enfermedad, la mayoría de las mujeres posmenopáusicas con osteoporosis presentan una pérdida ósea relacionada con la deficiencia de estrógenos. La rápida pérdida ósea es el resultado de un aumento del recambio óseo con un desequilibrio entre la resorción y la formación de hueso [47], en el que la resorción mediada por osteoclastos supera la formación mediada por osteoblastos [48]. Dependiendo de su origen se categoriza en:

- Osteoporosis primaria: la enfermedad se asocia con la edad y la deficiencia en las hormonas como los estrógenos y la testosterona.
- Osteoporosis secundaria: causada por diferentes enfermedades y el uso de distintos fármacos relacionados con la disminución de la densidad mineral ósea. Las enfermedades que afectan a la fijación del calcio, la obtención de la vitamina D o la síntesis de las hormonas sexuales están asociadas a menudo con la osteoporosis secundaria [49].

Esta enfermedad es un problema de salud pública global en aumento debido al envejecimiento poblacional. La densidad mineral ósea en la población joven sana sigue una distribución normal y la pérdida ósea ocurre con la edad, por ello, la prevalencia de la osteoporosis aumenta con la edad y depende de la demografía de la población [50]. Se estima que 200 millones de personas en todo el mundo padecen osteoporosis [51], causando más de 8,9 millones de fracturas al año, lo que supone una fractura osteoporótica cada 3 segundos [52]. Una de cada 3 mujeres mayores de 50 años sufrirá fracturas osteoporóticas, al igual que 1 de cada 5 hombres mayores de 50 años [53].

Las fracturas óseas son la complicación más grave de la osteoporosis. Las fracturas pueden producirse en cualquier localización ósea, pero son más frecuentes en la cadera, la columna vertebral, la pelvis, el antebrazo distal y el húmero proximal [46,50,54]. Las fracturas pueden provocar dolor crónico, discapacidad, depresión, estancia en residencias, reducción de la calidad de vida y aumento de la mortalidad. Debido al debilitamiento de la arquitectura del hueso vertebral, las fracturas menores con el tiempo pueden causar fracturas por compresión. Las fracturas vertebrales son las fracturas osteoporóticas más prevalentes y, paradójicamente, las más infradiagnosticadas, ya que pueden causar dolor agudo y pérdida de funcionalidad, pero también pueden ocurrir sin síntomas graves. Sin embargo, las fracturas vertebrales suelen ser recurrentes y la discapacidad consiguiente aumenta con el número de fracturas [50,55]. Las fracturas vertebrales son las que predicen el riesgo futuro de fractura; la probabilidad se quintuplica para las fracturas vertebrales posteriores y se duplica o triplica para las fracturas en otras localizaciones [55]. Las fracturas de cadera suelen producirse tras una caída, provocan dolor agudo y pérdida de funcionalidad, y casi siempre conducen a la hospitalización [50]. Las fracturas de cadera se asocian a un aumento de la tasa de mortalidad del 15% al 20% en el plazo de 1 año, seguido de un riesgo 2,5 veces mayor de fracturas futuras. Aproximadamente entre el 20% y el 50% de los pacientes con fractura de cadera requieren cuidados a largo plazo en residencias de ancianos y sufren una disminución de la calidad de vida, aislamiento social, depresión y pérdida de autoestima [55-57]. Las fracturas distales del radio también provocan dolor agudo y pérdida de función, pero la recuperación funcional suele ser buena [50].

El número de nuevas fracturas en 2010 en la Unión Europea se estimó en 3,5 millones, de las que aproximadamente 610.000 fracturas fueron de cadera, 520.000 vertebrales 560.000 de antebrazo y 1.800.000 fracturas de otro tipo (pelvis, costillas, húmero, tibia, peroné, clavícula, escápula, esternón y otras fracturas femorales). Debido a los cambios demográficos, el número anual de fracturas por fragilidad aumentará de 3,5 millones en 2010 a 4,5 millones en 2025, lo que corresponde a un aumento del 28% [50].

Los adultos sanos pueden llevar a cabo medidas para prevenir la osteoporosis, como la ingesta adecuada de calcio y vitamina D, la práctica de ejercicio con pesas y evitar el tabaco y el consumo excesivo de alcohol. No obstante, existe una oferta farmacológica para las mujeres y hombres con osteoporosis [46]. El objetivo de las terapias farmacológicas para tratar la densidad mineral ósea baja o la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas es reducir la carga de fracturas osteoporóticas graves [58]. Los bifosfonatos suelen ser el tratamiento de primera línea por su eficacia, seguridad y coste [46]. Estos análogos del pirofosfato se unen a los cristales de hidroxiapatita del hueso, inhiben la función y el reclutamiento de los osteoclastos y aumentan su apoptosis [59,60].

Los agentes más utilizados en Europa son el raloxifeno, los bifosfonatos alendronato, ibandronato, risedronato y ácido zoledrónico, agentes derivados de la hormona paratiroidea y denosumab [50]. Se ha demostrado que todos ellos reducen el riesgo de fractura vertebral. También se ha demostrado que algunos reducen el riesgo de fracturas no vertebrales y, en algunos casos, se ha demostrado que los agentes disminuyen específicamente el riesgo de fractura de cadera [61-64]. Sin embargo, tanto los tratamientos antirresortivos como los anabolizantes óseos se asocian a efectos adversos frecuentes y poco frecuentes, por ello la elección final del tratamiento debe depender siempre de una evaluación de los pros y los contras del tratamiento, así como de la historia clínica individual, las preferencias personales y las preocupaciones del paciente en cuestión [65].

En pocas palabras, el principal problema de la osteoporosis son las fracturas osteoporóticas asociadas, y en última instancia esta enfermedad incrementa cada vez más el número de fracturas a nivel global.

1.3. Curación de fracturas óseas

Una fractura es una ruptura de la continuidad estructural del hueso, con cierto grado de lesión de los tejidos blandos circundantes. En la literatura se han descrito ampliamente varios tipos de fracturas óseas. Si bien las fracturas óseas en la mayoría de los casos son causadas por traumatismos o enfermedades óseas específicas, las macrofracturas también pueden ocurrir como resultado de la acumulación de microfracturas en el hueso sano, lo que se denomina "fractura por estrés". Estas microfracturas normalmente ocurren después de una carga continua [1,12]. Las fracturas óseas se pueden clasificar en función de varias características. Según la forma o patrón de los fragmentos fracturados, las fracturas se dividen en transversales, oblicuas, espirales, conminutas y múltiples (**Figura 1.6.**). Otros tipos incluyen fractura por compresión o aplastamiento, fractura por arma de fuego, así como fractura en tallo verde y fractura por avulsión. Según la etiología, existen tres tipos de fracturas: traumáticas, por fatiga y patológicas. Finalmente, según la naturaleza de la fractura, se distinguen fracturas cerradas y abiertas [66].

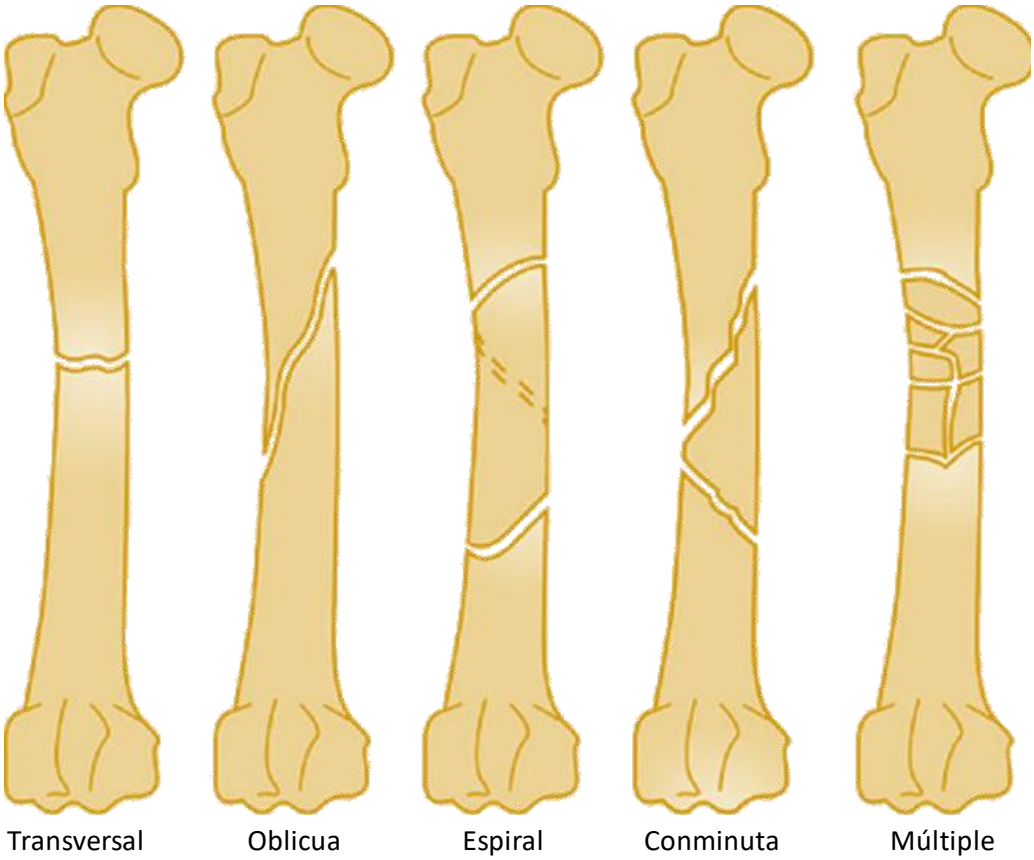


Figura 1.6. Tipos de fracturas según el patrón de los fragmentos fracturados. Adaptada de la referencia [1].

La curación de una fractura ósea es un complicado proceso regenerativo cuyo objetivo es devolver al hueso dañado su estado y composición celular anteriores a la lesión [67], recuperando así la resistencia ósea inicial [68].

El tipo de curación de las fracturas se rige por la estabilidad mecánica alcanzada en el lugar de la fractura y, en consecuencia, por la deformación. Una estimulación mecánica adecuada, como la deformación, facilita la formación de tejido en los extremos de la fractura. La cantidad de deformación implicada dicta el comportamiento biológico de las células que participan en el proceso de curación y, en consecuencia, el tipo de curación ósea [69-71]. La curación ósea primaria se produce con una deformación mecánica inferior al 2%, mientras que la curación ósea secundaria se produce cuando la deformación mecánica se sitúa entre el 2 y el 10% [72-75]. Por el contrario, una deformación superior al 10% provoca la no unión o el retraso de la unión [72,75-77].

Por tanto, existen dos tipos principales de cicatrización ósea: la cicatrización ósea primaria, dictada por construcciones de estabilidad absoluta donde tiene lugar una cicatrización ósea intramembranosa; y la cicatrización ósea secundaria, que se produce

en modalidades de fijación no rígidas como las ortesis, la fijación externa, las placas en modo puente, los clavos intramedulares, etc. Estas modalidades de fijación alcanzan una tensión mecánica entre el 2-10% y se produce una cicatrización ósea endocondral. La cicatrización ósea puede implicar una combinación de procesos primarios y secundarios en función de la estabilidad de la fractura.

La curación de las fracturas comienza con una fase anabólica en la que se produce el reclutamiento y la diferenciación de las células madre. En el lugar de la fractura se forma un callo cartilaginoso, mientras que en la periferia de este callo se hincha el periostio y comienza la formación ósea primaria [78]. Simultáneamente a la formación del callo cartilaginoso, en la masa muscular cercana se reclutan y diferencian las células implicadas en la angiogénesis. Con la progresión de la diferenciación de los condrocitos, la matriz extracelular se mineraliza y los condrocitos sufren apoptosis. A esto le sigue una fase catabólica en la que se produce la reabsorción del cartílago, lo que da lugar a una reducción del tejido y del volumen del callo [67].

Las células madre mesenquimales desempeñan un papel fundamental en el proceso de cicatrización. Estas células proceden principalmente de dos localizaciones: el periostio y el endostio. También intervienen células inflamatorias, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos [67,79].

El proceso de reparación ósea tras una fractura es complejo y comprende las siguientes fases: formación de hematomas, formación de tejido de granulación, formación de callo y remodelación ósea (**Figura 1.7.**). Sin embargo, existe un solapamiento considerable entre estas etapas.

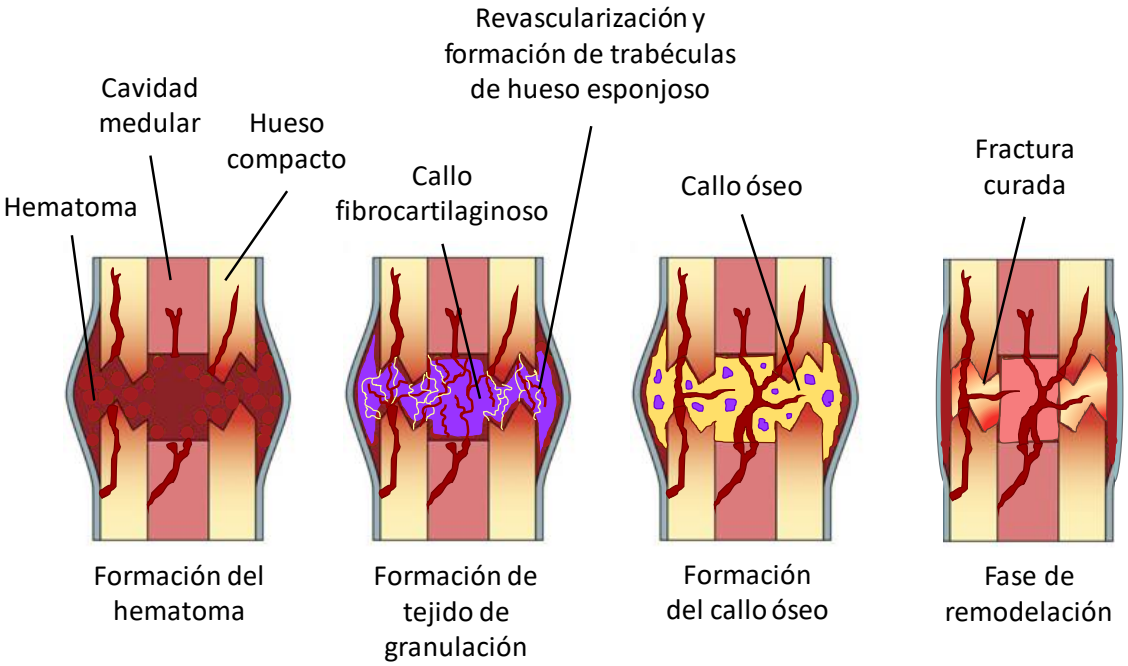


Figura 1.7. Representación esquemática de las diferentes fases del proceso de reparación ósea tras una fractura. Adaptada de la referencia [79].

La **formación del hematoma** ocurre inmediatamente después de la fractura, constituye el paso clave en la curación de una fractura. Los vasos sanguíneos que irrigan el hueso y el periostio se rompen durante la fractura, lo que provoca la formación de un hematoma en el lugar de la fractura, rico en células hematopoyéticas. El hematoma se coagula y forma el marco temporal para la posterior cicatrización. En el lugar de la fractura se recluta un número adecuado de MSCs procedentes de los tejidos cercanos y de la circulación [80,81].

Los macrófagos, neutrófilos y plaquetas liberan citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-11, IL 12, IL-23) [82]. Estas citoquinas estimulan aún más la biología celular esencial en el foco de la fractura.

La **formación de tejido de granulación** (callo primario o fibrocartilaginoso) ocurre en dos semanas y proporciona estabilidad provisional. Las plaquetas son reclutadas en el foco de la fractura. Entre los productos secretados por las plaquetas se encuentran la fibronectina (FN), el PDGF y el TGF-β, que en conjunto desencadenan una respuesta inflamatoria. Posteriormente, otras células mesenquimales e inflamatorias, como los fibroblastos y las células endoteliales, son reclutadas en el lugar de la fractura, lo que favorece la formación de tejido de granulación rico en fibrina y la angiogénesis

[283]. El tejido de granulación soporta la mayor tensión antes de desaparecer durante el proceso de curación.

Las células madre mesenquimales comienzan a diferenciarse hacia condrocitos (impulsadas por las BMP). Como resultado, empieza a producirse la condrogénesis, que establece una red fibrocartilaginosa rica en colágeno que abarca los extremos de la fractura, como un manguito circundante de cartílago hialino que estabilizará mecánicamente la zona de la fractura [84]. Al mismo tiempo, adyacentes a las capas periósticas, las células osteoprogenitoras depositan una capa de tejido óseo [85].

La liberación de citoquinas como el VEGF y el TGF-β induce la angiogénesis en el lugar de la fractura [86]. La angiogénesis es fundamental para la estructura morfológica del tejido óseo puente y para todo el proceso de curación de la fractura. El retraso en la unión o la no unión podría ser consecuencia de una angiogénesis deficiente [87,88].

En la **formación del callo óseo** el endostio y el periostio sirven de fuentes primarias de las MSCs y los fibroblastos implicados en la curación de la fractura [89]. Los fibroblastos desempeñan un papel fundamental al secretar los constituyentes de la matriz, como colágeno, fibras elásticas y glucoproteínas. Los osteoblastos procedentes de las MSCs empiezan a producir tejido óseo intramembranoso distal al foco de fractura [90] y tejido óseo endocondral en la región mecánicamente menos estable del callo cartilaginoso [91]. El hueso sustituye gradualmente al cartílago mediante la osificación endocondral, lo que da lugar a la formación de un callo duro que aumenta la estabilidad de la fractura [92]. Como resultado, el callo cartilaginoso se reabsorbe y comienza a calcificarse. Los vasos sanguíneos recién formados siguen proliferando, lo que permite una mayor migración de las células madre mesenquimales. Al final de esta fase, se forma un callo duro y calcificado de hueso inmaduro. La formación del callo óseo depende del movimiento relativo adecuado entre los fragmentos de la fractura [93,94].

La **fase de remodelación** implica la formación y mineralización del callo, la sustitución del callo mineralizado por hueso mineralizado y la escultura del hueso para devolverle su forma, tamaño y competencia biomecánica originales mediante el modelado y la remodelación [82]. Esta fase también puede denominarse formación ósea secundaria e implica la conversión del callo óseo irregular en hueso laminar [95]. En esta fase, los osteoclastos reabsorben el tejido óseo formado recientemente y los osteoblastos sustituyen esta matriz por el hueso laminar [96]. El resultado funcional importante de la fase de remodelación de la curación de fracturas es el restablecimiento de la resistencia mecánica y la estabilidad [96]. Los osteoclastos se polarizan, se adhieren a la superficie mineralizada y continúan la remodelación del hueso creando un entorno ácido y bombeando las proteasas al dominio de resorción, como resultado se crean fosas erosivas en la superficie ósea. Una vez completada la resorción, los osteoblastos son capaces de depositar hueso nuevo sobre la superficie erosionada [95]. El proceso de sustitución y reparación es continuo en el esqueleto normal, y los mecanismos

implicados en la curación de fracturas presentan grandes similitudes con el mecanismo del esqueleto sano. Para mejorar la estabilidad y la resistencia en el lugar de la fractura, el tamaño del callo debe ser lo suficientemente grande como para compensar la resistencia relativamente escasa del hueso primitivo [90]. Las laminillas se alinean en dirección paralela al eje longitudinal de la mayor fuerza y se requiere una carga adecuada para potenciar la osteogénesis y dirigir la configuración geométrica óptima de las osteonas [90]. La resistencia adecuada se desarrolla a los 6 meses y la fase de remodelación puede durar de meses a años [31]. Además, las tensiones óseas mecánicas creadas por las fuerzas musculares presentes durante la actividad física estimulan la remodelación [92].

Como se ha explicado, el esqueleto humano tiene notables propiedades regenerativas, ya que es una de las pocas estructuras del cuerpo que puede curarse recreando su composición celular, orientación y resistencia mecánica normales. Sin embargo, cuando el proceso de curación de un hueso fracturado fracasa debido a una inmovilización inadecuada, una intervención quirúrgica fallida, una respuesta biológica insuficiente o una infección, el resultado tras un periodo prolongado sin curación se define como no unión. La no unión representa una afección médica crónica que no sólo afecta a la función, sino que también puede repercutir en el bienestar psicosocial y económico de la persona [97,98]. El fracaso o el retraso en la curación puede afectar hasta al 10% de todas las fracturas y puede deberse a factores como la conminución, la infección, el tumor, la interrupción del suministro vascular [67,99], también a fracturas concurrentes múltiples, prescripción de antiinflamatorios no esteroideos y uso de opioides, fractura abierta, uso de anticoagulantes, artrosis con artritis reumatoide, osteoporosis, índice de masa corporal elevado, tabaquismo, alcoholismo etc. [100]. Además, es importante resaltar que las fracturas osteoporóticas se asocian a altas tasas de morbilidad y mortalidad [101]. Por todo ello, existe un gran interés en el desarrollo y utilización de estrategias de ingeniería tisular para aumentar la reparación de fracturas óseas [102].

1.4. Injertos óseos e ingeniería del tejido óseo

Aunque el hueso tiene una gran capacidad de curación y reparación de fracturas normales, algunos defectos o fracturas son demasiado grandes para regenerarse [93,103,104] y requieren intervenciones clínicas [105-107]. Otra complicación relativamente frecuente tras una fractura de huesos largos es la no unión [108]. En la curación de la fractura se necesita una combinación de factores de crecimiento, matriz ósea, entorno celular y fijación mecánica [108]. En ausencia de uno o varios de estos factores, las fracturas no cicatrizan y se produce la no unión, lo que conlleva morbilidad y limitación funcional para los pacientes [109]. Para tratar la fractura ósea sin unión, los

mecanismos naturales de curación del hueso tampoco son adecuados y suele ser necesaria la intervención médica.

Un injerto óseo es un material implantado que induce la reparación ósea solo o en combinación con otros materiales [110]. La selección de un tipo de injerto óseo adecuado depende de varios factores, como el tamaño del defecto, la viabilidad del tejido, la forma y el volumen, las propiedades biomecánicas y la manipulación del injerto [111]. Las cuatro opciones de materiales utilizados en los injertos óseos para promover la reparación de los defectos óseos son los autoinjertos, los aloinjertos, los xenoinjertos y los sustitutos de injertos óseos o implantes sintéticos [111]. Más importante aún son las características que debe presentar un material para que el injerto óseo tenga éxito en la regeneración ósea [112]:

- La osteoinductividad: es la capacidad de un material de estimular el reclutamiento de las células del linaje osteogénico y favorecer su diferenciación a osteoblastos, de forma que a su vez se favorezca la formación de tejido óseo nuevo [113,114].
- La osteoconductividad: es la propiedad de un material que permite el crecimiento de hueso nuevo en su superficie. Este proceso involucra un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimales, desde el tejido óseo sano al injerto [113-115].
- La osteointegración: es la capacidad del material de unirse a los tejidos óseos periféricos sin ninguna capa intermedia de tejido fibroso [112].

Además de estas tres características indispensables, se requiere que el sustituto óseo no desencadene una respuesta inflamatoria, debe poder integrarse en el hospedador, ser biocompatible, reabsorbible, estructuralmente similar al hueso, fácil de usar y rentable.

Como primera categoría y material de injerto óseo de referencia, los **autoinjertos** se definen como el trasplante de un tejido óseo esponjoso o cortical de una parte del cuerpo a otra dentro del mismo individuo [116,117]. Está demostrado que un autoinjerto fresco está compuesto por células y factores osteoinductores [110,115], carece de inmunogenicidad o riesgo de transmisión viral y ofrece una conservación inmediata de la viabilidad tras el trasplante. Los autoinjertos son el mejor material de injerto óseo disponible [118-120], además, son el único material de injerto que posee todas las características principales de un injerto ideal, dada la presencia de MSCs, células osteoprogenitoras y factores de crecimiento [113,121]. Sin embargo, el problema de este procedimiento es que se requiere de una cirugía adicional para la extracción del autoinjerto de otra región del cuerpo, con el consiguiente aumento del dolor en la zona donante, la morbilidad y las posibles complicaciones asociadas. Además, la cantidad de tejido óseo del donante es limitada [119,122].

Los autoinjertos presentan limitaciones que pueden superarse introduciendo otros materiales de injerto [120]. Desde el punto de vista clínico y experimental, los **aloinjertos**, que son tejido óseo obtenido de un individuo e implantado en otro individuo de la misma especie, se consideran un sustituto habitual de los autoinjertos [123] y actualmente dominan el mercado [124]. Los aloinjertos se obtienen de donantes vivos o de cadáveres y conservan su contenido celular y orgánico [116,125]. Las desventajas mencionadas de los autoinjertos no se tienen en cuenta para el aloinjerto, sin embargo, el riesgo de respuesta inmunitaria/rechazo del huésped y de transmisión de enfermedades, la falta de células viables y, por tanto, el menor potencial osteogénico y la menor tasa de cicatrización son limitaciones del uso de los aloinjertos para mejorar la eficacia de la cicatrización ósea [66,115,124,126-128]. Se puede llevar a cabo la descelularización para disminuir el riesgo de rechazo por respuesta inmune, pero disminuye también el potencial osteogénico.

Además de los aloinjertos, los **xenoinjertos** son otra alternativa a los autoinjertos [129]. Los xenoinjertos o injertos heterólogos proceden de una especie distinta a la humana, comúnmente de origen porcino y bovino [129,130]. Pueden considerarse una fuente ilimitada de materiales de injerto disponibles [129], sin embargo, conllevan riesgos similares a los aloinjertos, con el riesgo añadido de las enfermedades transmitidas por animales. Al igual que los aloinjertos, se procesan para evitar una respuesta inmune, no obstante, los xenoinjertos comerciales suelen someterse a procesamientos más agresivos [131] como la esterilización mediante tratamiento térmico [132] debido al riesgo asociado a enfermedades priónicas. Los xenoinjertos Bio-Oss™ se tratan a una temperatura relativamente baja de 300 °C, mientras que los productos Cerabone® se calcinan a temperaturas de hasta 1250 °C. Ambos tratamientos dañan los componentes óseos, perjudican la osteoinductividad y modifican la estructura del andamiaje al aumentar el tamaño de los cristales de hidroxiapatita [132]. Dado que los autoinjertos, los aloinjertos y los xenoinjertos óseos presentan muchos inconvenientes, los científicos llevan mucho tiempo buscando un sustituto del tejido óseo utilizando materiales biocompatibles [133-136].

Los **sustitutos de injertos óseos**, o **implantes sintéticos**, son la última opción para tratar los defectos óseos. Estos sustitutos comprenden andamiajes tisulares generados a partir de materiales naturales como colágeno, quitosano, alginato, elastina, celulosa, etc. y materiales sintéticos como diferentes tipos de fosfato mono-, bi- y tricálcico, hidroxiapatita (HA), fosfato β-tricálcico (β-TCP) y cementos de fosfato cálcico, así como cerámica vítrea [137,138]. Estos materiales son capaces de desencadenar la proliferación, migración y diferenciación de las células óseas necesarias para la regeneración ósea [137]. Además de las ventajas e inconvenientes de todos los materiales de injerto óseo utilizados para la regeneración ósea, la investigación en este campo sigue en curso.

En este último grupo de materiales (implantes sintéticos), es donde la ingeniería tisular puede experimentar su máximo desarrollo. La **ingeniería del tejido óseo** pretende combinar la tecnología de la ingeniería y los principios de las ciencias biológicas para desarrollar medios de regeneración y reparación del tejido óseo dañado o perdido [139]. Esta avanzada tecnología se considera un enfoque mutlidisciplinar. En general, esta modalidad de tratamiento consiste en combinar las biomoléculas y los mecanismos biológicos de reparación y mejora de la función de un tejido del cuerpo y la ciencia de los biomateriales. Por lo tanto, abarca el desarrollo y la expansión de las células sembradas, los factores de crecimiento y el diseño y los estudios biológicos de los biomateriales destinados a utilizarse en la fabricación de dispositivos y andamiajes. También se pueden utilizar diferentes fármacos y otros factores bioactivos para mejorar las funciones de los andamios [140-142].

El componente celular de la ingeniería tisular debe complementarse con un andamiaje tridimensional (3D) dotado de los coadyuvantes biológicos adecuados para guiar la regeneración tisular. Se espera que este andamiaje tridimensional tenga características específicas que le permitan favorecer la adhesión, diferenciación y proliferación de las células, así como facilitar la integración del mismo en el tejido del lugar de la lesión [118]. Las MSCs obtenidas de la médula ósea, el tejido adiposo, la sangre y otros tejidos son componentes importantes de la ingeniería del tejido óseo [143]. Esto se debe a que tienen el potencial de actuar como células progenitoras y también la capacidad de autorrenovación [144]. Las MSCs derivadas de la médula ósea son las mejores candidatas para la ingeniería ósea, en comparación con otras fuentes de MSCs, principalmente por su alto potencial de diferenciación condrogénica y osteogénica [145]. Numerosos estudios han demostrado que los andamios suplementados con MSCs derivadas de médula ósea promueven la regeneración ósea y tienen efectos curativos superiores en fracturas óseas [145]. Además, los andamios implantados sin MSCs no tuvieron tal impacto [146]. Las MSCs pueden utilizarse en la reparación del tejido óseo como células madre puras o pueden diferenciarse primero a precursores de osteoblastos antes de trasplantarlas al lugar de la lesión. Sin embargo, en su forma indiferenciada, las MSCs pueden funcionar como fuente de citoquinas y factores de crecimiento [147].

1.5. Andamiajes y dispositivos (biomateriales, propiedades y técnicas de fabricación)

En la ingeniería del tejido óseo, un andamio es fundamental para proporcionar soporte mecánico y biológico apropiado para las células, favoreciendo la adhesión, proliferación, diferenciación y síntesis de nuevo tejido [148,149]. Los enfoques biomiméticos para reproducir las características de la ECM nativa en un andamio de ingeniería tisular ósea incorporan muchas características de diseño, como la composición del material [150,151], la biodegradabilidad y las propiedades mecánicas

[152,153], la topología arquitectónica [154,155] las características de la superficie [156,157], la bioactividad, la biocompatibilidad, la hidrofilia [158], etc.

Los injertos o implantes sintéticos pueden clasificarse en tres grandes grupos en función del tipo de **material** con el que se fabriquen: cerámicos, metálicos y poliméricos.

Actualmente, las **cerámicas** bioactivas disponibles incluyen vidrios bioactivos, cerámicas de fosfato cálcico, cerámicas de silicato cálcico y cerámicas de sulfato cálcico. La principal propiedad común de las cerámicas bioactivas es su capacidad de enlace químico entre los tejidos biológicos y los biomateriales óseos [134]. Las biocerámicas de hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP) tienen una composición muy similar a la del hueso natural, difieren en que la HA del hueso es deficiente en calcio y presenta fases hexagonales. Tras la implantación, son capaces de guiar el crecimiento de hueso nuevo y la unión química al hueso [159-161]. La HA es muy estable y, en comparación con el TCP, tiene una degradabilidad in vivo mucho menor. Tras su degradación, aporta grandes cantidades de Ca y P minerales que, a su vez, inducen la formación de osteoblastos y la regeneración ósea [162]. Las cerámicas como los TCP ($Ca_3(PO_4)_2$) se han utilizado en la reparación ósea durante los últimos 80 años [163]. Una ventaja significativa de los α- y β-TCP es su solubilidad en agua, lo que favorece su degradación in vivo [163]. Los andamios óseos más comunes fabricados con β-TCP tienen una porosidad que oscila entre el 35 y el 50% y tamaños de poro que oscilan entre 100 y 300 µm [164]. Los vidrios bioactivos se componen de óxido de calcio, pentóxido de fósforo y dióxido de silicio. Además, algunos vidrios bioactivos contienen óxido de sodio, potasio, calcio y magnesio [134]. Se ha demostrado que los vidrios biocerámicos son capaces de unir tanto tejidos duros como blandos. En poco tiempo, pueden establecer fuertes enlaces químicos con el tejido óseo que los rodea, de modo que se osteointegran. Además, son osteoconductores, oesteoinductores y angiogénicos [165,166]. Debido a sus propiedades beneficiosas, los vidrios biocerámicos han recibido una atención considerable en los últimos años [167,168].

Los **metales** comúnmente utilizados en la ingeniería tisular ósea (BTE) son bioinertes, es decir, no inician una respuesta de cuerpo extraño cuando se implantan [169-171]. Estos metales y aleaciones incluyen aleaciones de titanio, aleaciones de tántalo, aleaciones de magnesio y zinc o cobalto y cromo. El uso de estos metales y aleaciones para la aplicación de BTE puede ser en forma de materiales compactos, nanopartículas, o ambos. Sin embargo, el problema crítico en la utilización de aleaciones metálicas en su forma de material compacto es la falta de correspondencia en las propiedades mecánicas con el hueso natural. El desajuste en las capacidades de soporte de carga puede causar la reabsorción del hueso en las zonas circundantes del implante, lo que puede provocar el aflojamiento o el fallo completo de la fijación [169-172]. Además, la naturaleza bioinerte de algunos metales y aleaciones en forma compacta y de nanopartículas limita su capacidad de interactuar positivamente con la ECM local e iniciar una respuesta de cicatrización ósea [173]. En la actualidad, las aleaciones de

cobalto y cromo, o titanio son las más utilizadas debido a que se consideran inertes y de entre todos los materiales, son los que tienen mejor resistencia mecánica. Sin embargo, en ambientes fisiológicos con el paso del tiempo comienzan a corroerse y a presentar toxicidad [174]. A las aleaciones de titanio se añaden elementos como Zr, Nb, Al y V para mejorar la interacción con el nicho local y mejorar el comportamiento frente a la corrosión [175-177].

Los metales biorreabsorbibles o biodegradables, como el Zn, el Fe y el Mg, son cada vez más populares en las aplicaciones BTE. En comparación con los polímeros biodegradables, los metales biodegradables tienen una mayor rigidez y resistencia. Además, debido a su mayor procesabilidad y tenacidad, ofrecen un potencial de carga mucho mayor que las cerámicas bioactivas. En la fase inicial de su implantación, proporcionan soporte mecánico y, posteriormente, a lo largo del crecimiento del nuevo tejido óseo, se degradan *in vivo* y liberan sus iones. Estos iones son absorbidos por el tejido circundante o pueden ser excretados con los fluidos corporales [158]. Una desventaja importante de los metales biodegradables, incluido el Mg, es su rápida degradación. Para reducir la velocidad de degradación, se han introducido técnicas de revestimiento superficial, aleación y solidificación rápida [178].

Los materiales **poliméricos** pueden dividirse en dos categorías principales: polímeros disponibles de forma natural como polisacáridos (celulosa, almidón, alginato, quitosano, derivados del ácido hialurónico) o proteínas (soja, colágeno, geles de fibrina, seda) [179] y polímeros biodegradables sintéticos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico y policaprolactona).

Los polímeros naturales se obtienen directamente de tejidos vegetales o animales. Normalmente no son tóxicos, presentan una amplia disponibilidad, tienen un bajo potencial inmunogénico y proporcionan un alto grado de hidrofilia y afinidad celular. Sus productos de degradación son moléculas naturales como los aminoácidos y, por lo tanto, son fácilmente absorbidos por los mecanismos naturales del cuerpo humano. El colágeno se considera uno de los polímeros biodegradables naturales más aplicables. Desempeña un papel importante en la fijación y el crecimiento de las células y les proporciona la elasticidad necesaria [180,181].

Algunos de los polímeros sintéticos más utilizados para fabricar andamios tridimensionales para la ingeniería de tejidos óseos son el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), los copolímeros de poli(láctico-co-glicólido) (PLGA) [182-184], el alcohol polivinílico (PVA) y la poli(ε-caprolactona) (PCL). Estos biomateriales óseos sintéticos degradables tienen diferentes comportamientos de degradación y propiedades superficiales. Debido a la posible modificación de sus estructuras, existe una gan variedad de estos polímeros con propiedades biológicas y estructurales mejoradas para biomateriales de ingeniería de tejidos óseos [185]. La superficie de estos polímeros es propensa a la degradación hidrolítica cuando se encuentran en un entorno

fisiológico. Por ejemplo, el mecanismo de degradación de la PCL es similar al del PLA, que sufre una degradación hidrolítica de los enlaces éster. Los subproductos de la degradación son absorbidos o excretados por el organismo [186]. En la actualidad, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) ha aprobado la aplicación clínica de PGA, PLA y PLGA como biomateriales óseos [158]. Los andamiajes fabricados con polímeros sintéticos pueden producirse en condiciones controladas con propiedades mecánicas (resistencia a la compresión/tracción) y estructurales (tamaño de los poros, forma de los poros y porosidad (%)) predecibles y reproducibles. Además, el uso de polímeros sintéticos evita los riesgos de impurezas y toxinas en el injerto óseo, que provocan rechazos inmunitarios en el huésped.

Finalmente, los andamios **compuestos** o **multimaterial** implican el uso de dos o más materiales, los cuales se pueden combinar de formas muy diversas. Dependiendo de la naturaleza de la combinación, las propiedades del biomaterial o dispositivo final pueden ser muy diferentes [187,188]. Los dispositivos compuestos o multimaterial constituyen una potente estrategia para superar las desventajas de los distintos biomateriales (por ejemplo, su escaso rendimiento mecánico) [189].

Un andamio ideal debe reunir algunas **características** intrínsecas, como ser biocompatible, biodegradable y tener propiedades mecánicas similares a las del tejido óseo [190,191]. Además, el andamio debe favorecer la adhesión y proliferación celular, la diferenciación y la deposición de ECM, lo que dará lugar a su sustitución gradual por el tejido nativo [191,192]. Para que esto ocurra, el tamaño de los poros y la porosidad deben ser adecuados para favorecer la migración celular y el crecimiento de los tejidos circundantes y permitir el suministro de nutrientes y la liberación de los desechos resultantes de la actividad metabólica de las células [193]. Teniendo en cuenta la porosidad de los andamios, para imitar el hueso esponjoso, el andamio debe presentar una porosidad que oscile entre el 50% y el 90% [194,195]. Sin embargo, para imitar el hueso cortical, el andamio debe presentar una porosidad de entre el 10% y el 30%. La superficie y la topografía también son aspectos clave a la hora de garantizar el anclaje, la proliferación y la diferenciación celular [196]. Además, los andamiajes deben asemejarse a la morfología del defecto y abordar todas las características del tejido del paciente. Más concretamente, los andamiajes deben imitar los elementos morfológicos y de composición del tejido óseo sano para favorecer el crecimiento y la vascularización propia del hueso [197,198], garantizando así un enfoque más satisfactorio [199]. En un escenario quirúrgico, el andamiaje óptimo debería ser fácil de manipular y adaptarse al lugar del defecto para permitir un implante preciso. Por último, un andamio debe de ser económico, reproducible a gran escala y conservarse fácilmente de cara a tenerlos disponibles a la hora de realizar una cirugía.

Además de utilizar el biomaterial adecuado para la preparación de los andamios, es necesario conformarlo en una estructura robusta que se pueda injertar en el defecto óseo, por tanto, otro aspecto importante consiste en elegir la estrategia para fabricar

dichos andamios [200]. Dependiendo del **método de fabricación**, se pueden obtener diferentes propiedades, como diferentes porosidades, propiedades mecánicas y gradientes de composición. Para elegir una estrategia de fabricación adecuada, es esencial tener en cuenta la arquitectura prevista y cómo afectarán los métodos de procesamiento al biomaterial seleccionado.

Existe un sinfín de técnicas para fabricar andamios tridimensionales [155,201-205], desde técnicas que no permiten un control preciso de la arquitectura final del andamio, incluyendo el tamaño de los poros, la geometría de los poros, la distribución o incluso la interconectividad, hasta técnicas más sofisticadas que consiguen reproducir fielmente un diseño elaborado previamente [206]. Los métodos más convencionales incluyen las técnicas de evaporación de disolventes [207], la liofilización [208], la lixiviación [209], etc [200,210]. Estas técnicas presentan una reproducibilidad limitada, la ventaja reside en su bajo coste y la velocidad con la que se obtienen los andamios [211]. Por su parte, las estrategias de fabricación aditiva (impresión tridimensional (3D), estereolitografía, modelado por deposición fundida y sinterizado selectivo por láser), permiten eclipsar las estrategias clásicas al producir andamios complejos de forma más precisa y reproducible.

La fabricación aditiva (AM) puede definirse como el proceso de construcción de objetos o piezas capa a capa [212,213]. Las técnicas de fabricación aditiva ofrecen resoluciones que van desde unas pocas micras hasta milímetros, dependiendo de la técnica utilizada; además, pueden procesar polímeros, cerámicas y metales [214]. La combinación de la AM con el modelado por ordenador permite la fabricación de piezas de forma libre que pueden abordar los requisitos fisiológicos y mecánicos únicos de las lesiones o defectos óseos.

Una de las estrategias más utilizadas para la fabricación de andamios **es la impresión 3D** [215,216]. La impresión 3D puede dividirse en diferentes técnicas, como la extrusión, la inyección de tinta y la impresión asistida por láser. Estas técnicas permiten la producción de andamios más intrincados y reproducibles. Además, los andamios obtenidos pueden aunar las características naturales del tejido óseo con gran precisión, ya que se pueden imprimir simultáneamente diferentes biomateriales, factores de crecimiento y células [217] (bioimpresión 3D) con un control preciso de su distribución.

La **impresión por extrusión** consiste en la manipulación de material a temperatura controlada que permite imprimir estructuras de diferentes tamaños utilizando archivos de diseño asistido por ordenador (CAD). El material se extruye de los cartuchos aplicando una fuerza neumática o una fuerza mecánica [218,219].

La **impresión asistida por láser** permite imprimir con alta precisión y resolución (≈10 µm) [220-222]. La técnica se basa en la deposición inducida por láser de células y/o biomateriales. En resumen, consta de un láser pulsado energizado, una cinta que

contiene el biomaterial y un escenario donde se imprimirá el biomaterial. La cinta que contiene el biomaterial suele estar compuesta por un sustrato transparente (por ejemplo, vidrio) recubierto con una capa de metal absorbente del láser (por ejemplo, oro) y con el biomaterial depositado encima. El rayo láser vaporiza la capa de metal, transfiriendo gotitas del biomaterial al sustrato [222].

La **impresión por inyección de tinta** es una técnica de alta resolución que dispensa gotitas precisas de biotinta dentro del rango de picolitros utilizando enfoques térmicos y piezoeléctricos (**Figura 1.8.A**) [223]. En ambos casos, las gotitas pueden depositarse en dos modos: i) de forma continua con una velocidad de impresión de >10 m/s o ii) de forma gota a gota con una velocidad de impresión de 5-8 m/s [215,224,225]. La resolución de la deposición continua es de 100 µm y la de la deposición gota a gota es de 20-50 µm [226]. El enfoque más común se basa en la temperatura (enfoque térmico), ya que proporciona las mayores tasas de viabilidad celular, es fácil de usar y presenta menores costes asociados [225]. En el enfoque piezoeléctrico, las gotitas se forman al aplicar una corriente a los elementos piezoeléctricos presentes [227]. Estos elementos se distorsionan o expanden con la corriente, forzando la creación de una gota a través de la boquilla, que puede variar en volumen.

La **estereolitografía** se basa en la polimerización de materiales fotosensibles en una plataforma sumergida en un fotopolímero líquido, lo que permite la polimerización de la capa expuesta a la luz. Por el contrario, la capa no expuesta no polimeriza [228-231]. Repitiendo el movimiento descendente de la plataforma, es posible producir un andamio 3D capa a capa a una velocidad de hasta 100 µm/s [232].

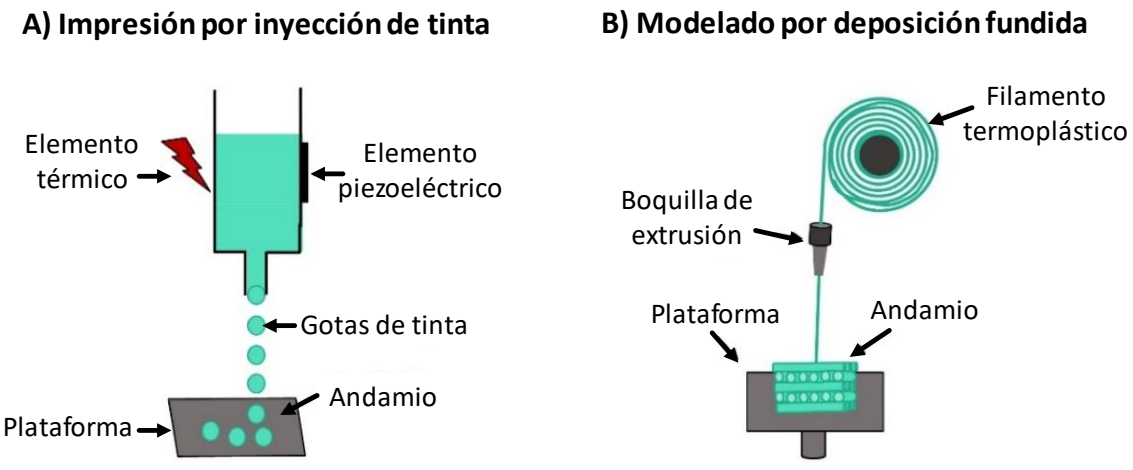


Figura 1.8. Representación esquemática de la impresión por inyección de tinta (A) y el modelado por deposición fundida (B). Adaptada de la referencia [233].

El **sinterizado selectivo por láser** es una técnica que produce andamios 3D mediante la fusión de polvos utilizando láseres de alta potencia [231]. Con esta técnica se puede utilizar una amplia variedad de biomateriales que van desde la PCL hasta la cerámica, dando como resultado una resolución de ≈200 µm [231]. Para producir un andamio 3D, se coloca capa por capa de polvo y se expone al láser fusionándose de acuerdo con el diseño deseado a una velocidad de ≈200 m/s [234]. Al final, se desecha el polvo que no se ha fusionado. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica reside en las altas temperaturas de funcionamiento necesarias para la producción de andamios, que pueden dañar las propiedades de los materiales y reducir sus propiedades mecánicas [231].

El **modelado por deposición fundida** es una técnica que utiliza filamentos prefabricados de polímeros termoplásticos (por ejemplo, PCL o PLGA). Tras calentarse, los polímeros termoplásticos pueden extruirse a una velocidad de impresión de ≈200 m/s y una resolución de 300 µm desde una boquilla creando andamios porosos 3D capa a capa sobre una plataforma (**Figura 1.8.B**) [231,235-238]. Además de la termoplasticidad, los biopolímeros también deben poseer una viscosidad adecuada y unas características de fusión y solidificación apropiadas. La PCL es un ejemplo de polímero biocompatible y biodegradable que se ha utilizado con éxito. De hecho, ha sido aprobada por la FDA para desarrollar un andamio 3D comercial obtenido mediante modelado por deposición fundida, como Osteoplug™ (Osteopore® - Singapur) [239]. Sin embargo, para mejorar las propiedades de los andamios de PCL y aumentar la similitud con el tejido óseo, se ha combinado con cerámica (por ejemplo, HA) [238]. En un ejemplo diferente, los andamios de PCL se recubrieron con matrices extracelulares derivadas de células [240]. La adición de la matriz a los andamios de PCL mejoró la adhesión y proliferación de las células madre, mejorando en última instancia sus propiedades osteoinductoras.

Por último, dentro de la categoría de las técnicas asistidas por campos eléctricos para la fabricación de andamios (también llamados enfoques electrohidrodinámicos [241]), el **electrohilado** es una técnica destacable debido a su versatilidad, simplicidad, rentabilidad, alta capacidad de carga y aplicabilidad a temperatura ambiente. Esta técnica presenta varias ventajas sobre las demás técnicas mencionadas, principalmente la posibilidad de producir matrices con fibras de escala micro y/o nanométrica con una gran superficie [242-244] que imitan la naturaleza fibrosa de la ECM nativa [245,246].

El **electrohilado** es una potente técnica para producir fibras con diámetros que van de decenas de nanómetros a varios micrómetros a partir de polimeros en solución o fundidos [247]. Un dispositivo típico de electrohilado se compone de tres partes principales (**Figura 1.9.**), una solución de polímero conectada a una bomba o inyector, un colector conectado a tierra y un campo eléctrico accionado por una fuente de alimentación de alto voltaje [248]. El procedimiento de electrohilado podría resumirse de la siguiente manera: la solución polimérica retenida por su tensión superficial y su

fuerza electrostática, se mantiene en equilibrio y forma una semiesfera cónica conocida como "cono de Taylor" en el extremo de un capilar [249]. Una vez que el campo eléctrico aumenta hasta un valor crítico, la solución cargada puede ser expulsada de la punta del cono de Taylor y se desplaza hacia la placa colectora. El disolvente se evaporará durante el proceso de desplazamiento, dejando atrás las fibras solidificadas distribuidas aleatoriamente en el colector [250,251]. Hasta ahora, se han electrohilado muchos tipos de polímeros, tanto sintéticos como naturales para formar nanofibras puras, compuestas o híbridas [252-254].

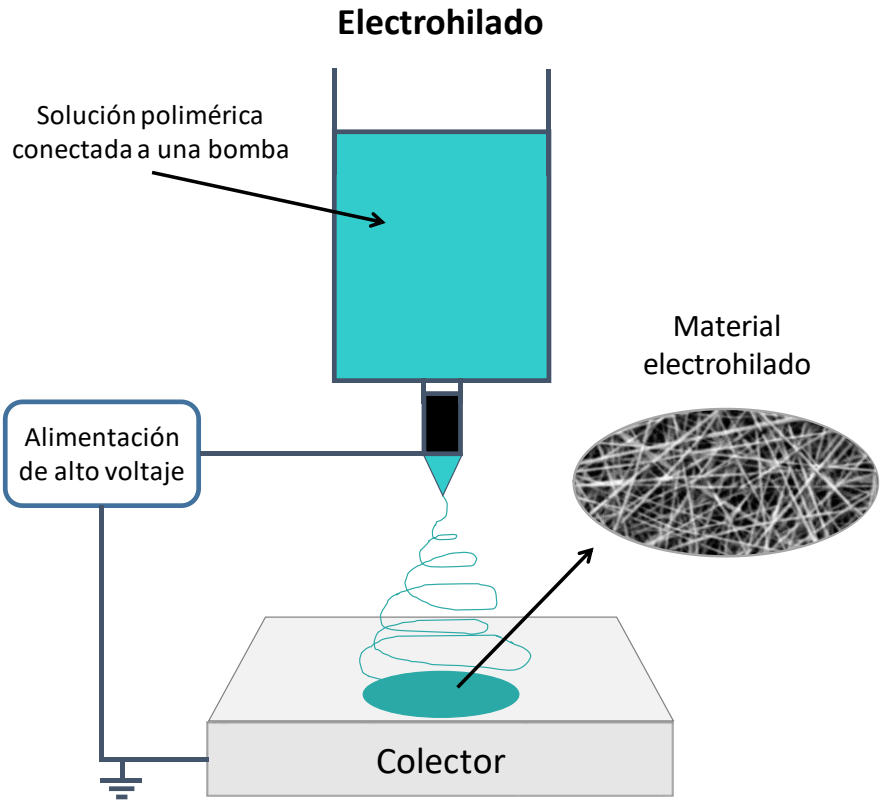


Figura 1.9. Esquema de un sistema típico de electrohilado.

Diversos parámetros experimentales, como la concentración y la velocidad de alimentación de la solución polimérica, el voltaje aplicado, la distancia entre el "spinneret" (aguja o capilar de inyección) y el colector, y la humedad y la temperatura de la atmósfera, pueden influir en el proceso de electrohilado [255]. Para obtener nanofibras con diferentes topografías, el electrohilado puede tener varias configuraciones de "spinneret", como el electrohilado coaxial [256-258], electrohilado de chorros múltiples con sistemas de boquillas múltiples [259,260] y el electrohilado coaxial multifluídico [261]. El colector puede ser en forma de varillas giratorias simples o paralelas [262], tubo giratorio [263], disco giratorio [264], electrohilado sin agujas

[265], electrodos estampados [266]. Además, la configuración del campo eléctrico también puede ajustarse a campos eléctricos auxiliares [267] o a campos eléctricos y magnéticos mixtos [268]. Hasta la fecha, se han fabricado diferentes categorías de nanofibras electrohiladas a partir de polímeros sintéticos biodegradables para aplicaciones de ingeniería tisular [269-273]. En función de los diferentes criterios de aplicación, las fibras obtenidas pueden tener componentes desde orgánicos o inorgánicos simples hasta compuestos orgánicos/orgánicos, orgánicos/inorgánicos. La topografía de las fibras puede ser aleatoria, alineada radial o paralelamente, núcleo-corteza, janus, estampada, jerárquica, multicapa, hilada, etcétera.

Las membranas fibrosas electrohiladas tienen una elevada relación superficie/volumen, esto hecho proporciona una mayor superficie para la fijación y el crecimiento celular, lo que concuerda con la arquitectura de la ECM. El diámetro y la orientación de las fibras, así como la porosidad del andamiaje electrohilado, pueden modificarse durante el proceso de electrohilado, lo que da lugar a una amplia gama de arquitecturas de andamiaje con capacidad para imitar la ECM [274]. Además, se pueden emplear varias técnicas de reticulación para mejorar las propiedades mecánicas de los andamiajes electrohilados basados en polímeros naturales como el colágeno y aumentar su resistencia a la degradación [275]. Por ejemplo, la radiación ultravioleta [276] y el tratamiento deshidrotermal [277] son métodos físicos de reticulación, mientras que el EDC/NHS es un sistema químico de reticulación habitual en este campo [278].

Además, la técnica de electrohilado se ha utilizado en la fabricación de andamios nanofibrosos para la ingeniería tisular ósea con una gran variedad de polímeros naturales y sintéticos, como alginato, quitosano, colágeno, PCL, PGA, PLA y PLGA [244,279-284]. Así mismo, el electrohilado puede utilizarse para procesar metales y cerámicas de forma indirecta, lo que implica la preparación de compuestos poliméricos que contengan el metal o la cerámica de interés y su posterior procesamiento [285,286].

Con el método de electrohilado se pueden fabricar andamios grandes, flexibles, porosos e interconectados, pero su grosor está limitado a micras [287]. Este hecho puede solventarse aumentando el tiempo de hilado, lo que hace que aumente el grosor de la membrana fabricada. Este aspecto que a priori podría parecer una desventaja, se puede aprovechar para producir membranas flexibles fácilmente implantables de una manera poco invasiva [288].

El creciente interés por la ingeniería tisular como método eficaz para fabricar materiales sintéticos de sustitución y reparación ósea es indudable [289]. La selección de los biomateriales y las técnicas de fabricación son factores cruciales a la hora de producir andamios o dispositivos con propiedades adecuadas [290]. Los andamios proporcionan una plantilla y un entorno extracelular que sirven de soporte a las células en el proceso de regeneración tisular. Sin embargo, otro aspecto muy importante y

hasta ahora no mencionado en este apartado son las diversas **señales** que pueden regular la actividad celular en el proceso de regeneración y diferenciación osteogénica. En muchas situaciones (por ejemplo, reparación de grandes defectos, deterioro de la función tisular por enfermedad), el tipo y/o la cantidad de señales endógenas no son suficientes para regenerar el tejido dañado, por lo que sería beneficioso aportar señales exógenas que favorezcan la regeneración. Estas señales bioactivas pueden ser moléculas bioquímicas como factores de crecimiento (polipétidos/proteínas) [291,292], moléculas pequeñas [293,294], hormonas [295], anticuerpos [296], ácidos nucleicos [297], fármacos [298], etc.; y señales biofísicas como estímulos estructurales internos (rigidez de la ECM [299], deformación del sustrato celular [300,301], topografía o rugosidad [302]), estímulos mecánicos externos (presión hidrostática [303], compresión [304], tensión [305], flujo de fluidos [306], microvibración [307], nanovibración [308], etc.) y estímulos electromagnéticos (corriente eléctrica [309], campo eléctrico [310], campo magnético [311], etc.). Diversas estrategias de ingeniería tisular que incorporan señales bioquímicas y señales biofísicas han demostrado que favorecen la reparación ósea [292,299,312-317].

Estos hallazgos indican que las señales biofísicas tienen una importancia crítica en la regeneración ósea y pueden incorporarse al diseño de andamios. Asimismo, las células óseas, incluidos los osteoclastos, los osteoblastos, así como los osteocitos y las células precursoras o de revestimiento óseo, responden a señales físicas y estímulos biomecánicos del microentorno fisiológico [318,319].

1.6. Mecanotransducción

La mecanotransducción es el proceso mediante el cual las células son capaces de percibir y convertir estímulos mecánicos en señales bioquímicas que dan lugar a cambios intracelulares, como la concentración de iones, la activación de vías de señalización y la regulación transcripcional [320]. La mecanotransducción interviene en muchas respuestas biológicas críticas, desde la vasodilatación [321,322] hasta la audición [323], el equilibrio y la sensación de posición de las articulaciones [324], la contracción muscular y el tacto [225,226], así como en múltiples procesos fisiopatológicos, incluyendo el desarrollo embrionario [327], la reparación tisular y la cicatrización de heridas [328], la regeneración neural [329], la fibrosis [330], la tumorigénesis [331], etc.

En el tejido óseo, la mecanotransducción es fundamental para definir la forma, la masa y la resistencia de los huesos, además desempeña un papel crucial en la reparación y regeneración de las fracturas [332-335].

El esqueleto soporta eficazmente los movimientos del cuerpo y, por tanto, está sometido continuamente a diversas fuerzas externas. Una evidencia clara de que los estímulos mecánicos están involucrados en la remodelación ósea es que la ausencia de

ellos (simulación de microgravedad) inhibe la diferenciación osteogénica de las MSCs y el proceso de mineralización [336]. Varios estudios de este tipo han demostrado una disminución en los niveles de marcadores osteogénicos tras la simulación de microgravedad [337,338]. Este hecho puede provocar una pérdida mensual del 1%-1,5% de la densidad mineral ósea volumétrica en los huesos que soportan el peso debido al aumento de la resorción ósea y la disminución de la formación de hueso [339,340]. Además, el reposo en cama y la parálisis durante tiempos prolongados pueden reducir sustancialmente la tensión mecánica ejercida sobre el hueso, lo que provoca osteoporosis por desuso [341].

Los osteocitos se encuentran enterrados entre las laminillas de matriz ósea mineralizada. En lugar de mineralizarse, los osteocitos forman pequeñas cámaras (lagunas) y conductos (canalículos) llenos de fluido que proporcionan una base estructural para la generación de tensiones de cizallamiento por el flujo del fluido (FSS). El movimiento y otras fuerzas mecánicas pueden provocar FSS, deformación ósea y modulación de la alineación de la matriz extracelular ósea [334]. Los osteocitos son los principales sensores de los estímulos mecánicos en el tejido óseo. Estas células perciben los estímulos mecánicos a través de sus cuerpos celulares, dendritas y cilios y, a continuación, transmiten las señales mecánicas del entorno externo a las MSCs, osteoblastos y osteoclastos mediante la liberación de moléculas tales como ATP, prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO) y factores de crecimiento [342-346]. Varios estudios han demostrado que los osteoclastos también son células mecanosensibles [347]. Asimismo, los estímulos mecánicos afectan a la diferenciación de las MSCs y los osteoblastos *in vitro*, donde las señales mecánicas regulan las expresiones génicas osteogénicas y la liberación de moléculas de señalización [348-352]. En última instancia, las actividades de los osteoblastos, como la diferenciación, se alteran en respuesta a las señales mecánicas, a través tanto de la mecanotransducción intracelular como de las comunicaciones célula-célula (**Figura 1.10.**).

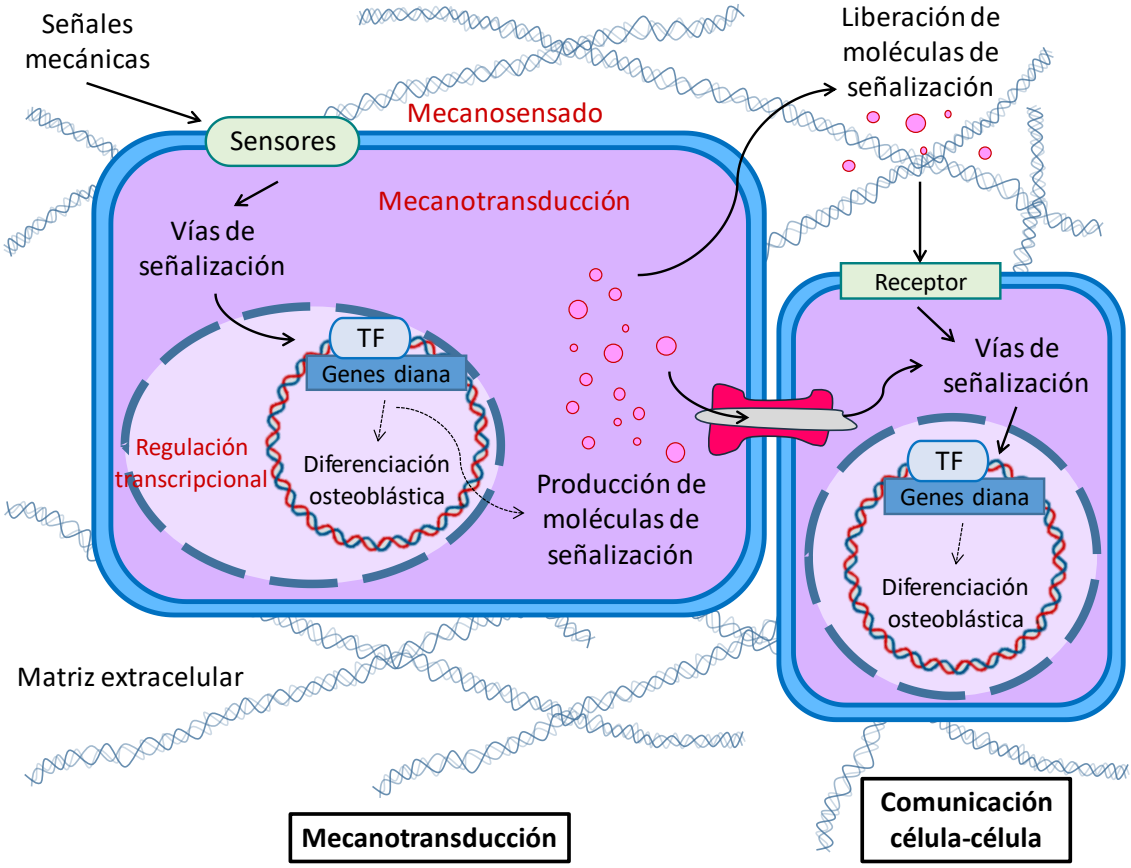


Figura 1.10. La mecanotransducción dentro de las células óseas o entre ellas. Las moléculas de señalización transmiten las señales mecánicas a las células o a las células cercanas. Las fuentes rojas destacan los tres pasos secuenciales de la mecanotransducción. Adaptada de la referencia [17].

La mecanotransducción incluye tres pasos secuenciales: la detección o sensado mecánico en los sensores mecánicos de la membrana celular, las vías de mecanotransducción citoplasmática la y regulación transcripcional.

El **mecanosensado** es el primer paso de la mecanotransducción, y dado que la carga mecánica estimula el crecimiento óseo, se han realizado numerosos estudios al respecto [353]. El mecanosensado consiste en la alteración de la estructura de los sensores y la transmisión de la señal extracelular a las vías intracelulares [354,355]. Diversas proteínas de la superficie celular o estructuras de membrana, como integrinas, canales iónicos, uniones de tipo gap, y cilios primarios, se consideran estructuras con potencial mecanosensible. Estas estructuras pueden percibir directamente fuerzas mecánicas únicas o múltiples, asimismo, estas fuerzas mecánicas pueden modular la conformación o la actividad de las estructuras para activar vías de señalización descendentes y dirigir los comportamientos celulares [334].

Las integrinas funcionan como receptores en heterodímeros que unen la ECM al citoesqueleto [356]. Las integrinas perciben señales mecánicas a través de la interacción integrina-ECM [357]. Cuando las integrinas están inactivadas, los dominios extracelulares se encuentran en una conformación cerrada y doblada con una baja afinidad de unión al ligando (**Figura 1.11.**) [358]. Las fuerzas mecánicas estiran los sitios de unión de las integrinas en las superficies celulares para cambiarlas a una conformación abierta y extendida, con alta afinidad por los ligandos de la ECM, como la laminina, la fibronectina o la vitronectina [358-360]. Las integrinas activadas se agregan y foman adhesiones focales (FA) que refuerzan las conexiones entre las células y la ECM, lo que facilita aún más la mecanotransducción [361,362]. Un ejemplo claro de que las integrinas participan activamente en la mecanotransducción es que la alteración de las integrinas αVβ3 en los osteocitos provoca la atenuación de la mecanosensibilidad [363].

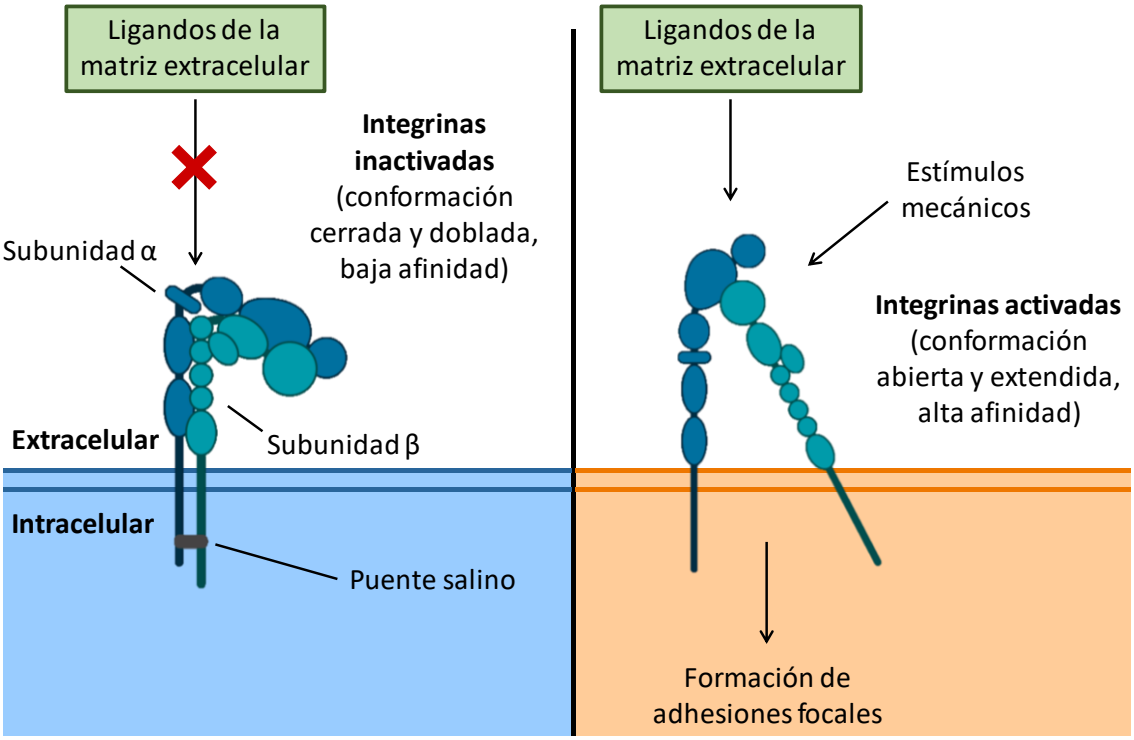


Figura 1.11. Activación de sensores por estímulos mecánicos. La conformación de las integrinas cambia de la conformación cerrada y doblada (izquierda) a la conformación abierta y extendida (derecha) por estímulos mecánicos. Las integrinas activadas inician la formación de adhesiones focales para la mecanotransducción. Adaptada de la referencia [17].

Los canales de calcio mecanosensibles Piezo1 y Piezo2, pasan de estar cerrados a abiertos en respuesta a estímulos mecánicos, lo que provoca la entrada de iones de calcio al interior celular y una serie de reacciones bioquímicas acopladas [364-366].

Multitud de estudios prueban que las piezoproteínas desempeñan papeles importantes en la diferenciación osteogénica mediada por procesos de mecanotransducción [334,367-369]. Las señales mecánicas inducen la deformación de la membrana celular, y la tensión de la membrana celular deformada estira el canal Piezo1 para abrir el módulo de poro central (**Figura 1.12.**) [370,371]. Los cationes extracelulares, incluidos los iones de calcio, entran en las células a través de los canales Piezo para activar las vías acopladas correspondientes [372].

El cilio primario, un orgánulo no móvil basado en microtúbulos y con forma de antena que sobresale de la superficie celular, detecta señales químicas y mecánicas extracelulares y transduce señales mecánicas a las células [373,374]. Los cilios primarios se encuentran en MSCs, osteoblastos y osteocitos [375,376]. Cuando las células se exponen al flujo de fluidos los cilios se desvian por la tensión de cizallamiento. En este caso, son también varios los estudios que han demostrado que sin cilios primarios las células no responden al flujo de fluidos afectando a la diferenciación osteogénica [355,375,377-380]

Tanto las uniones de tipo gap como los hemicanales, compuestos por conexinas, intervienen en la transmisión de señales mecánicas. Los hemicanales proporcionan comunicación entre el citoplasma intracelular y la ECM [381] y las uniones gap entre células adyacentes [382]. Los estímulos mecánicos en el tejido óseo hacen que las uniones gap y los hemicanales se abran para permitir que las moléculas de señalización, incluidos los iones de calcio, el ATP, el AMPc y la PGE2, se trasladen a las células vecinas y a la ECM (**Figura 1.12.**) [342,383,384].

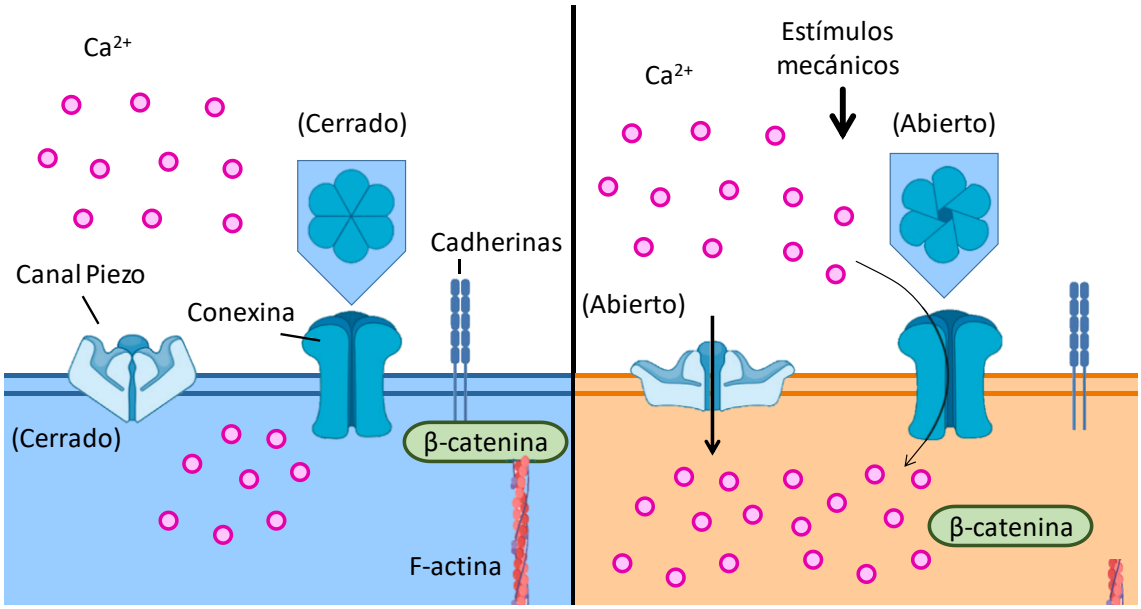


Figura 1.12. Activación de sensores por estímulos mecánicos. Los estímulos mecánicos transforman las proteínas de canal, incluyendo Piezo y conexina, de la conformación cerrada (izquierda) a la conformación abierta (derecha). La β-catenina se combina con las cadherinas en un estado estático (izquierda), pero se liberan al citoplasma con los estímulos mecánicos (derecha). Adaptada de la referencia [17].

Tras el mecanosensado, los estímulos mecánicos se pueden traducir en señales bioquímicas a través de las **vías de señalización citoplasmáticas mecanosensibles**. Esas señales bioquímicas podrán controlar en última instancia el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y la migración celular [334].

En la mecanotransducción durante la osteogénesis, las vías de señalización citoplasmáticas integrina-FA-citoesqueleto [385,386] y RhoA [387] dependen de la activación de las integrinas. Las integrinas activadas reclutan proteínas de señalización y proteínas estructurales para formar FA que conectan las integrinas al citoesqueleto de F-actina y responden a estímulos mecánicos. Las proteínas señalizadoras, como Src y la quinasa de adhesión focal (FAK), son cruciales para la transmisión mecánica [388]. Las proteínas estructurales tienen también un papel muy importante, por ejemplo, la unión entre vinculina y talina estabiliza aún más la interacción entre talina y F-actina [389]. En resumen, el complejo integrina-FA reorganiza el citoesqueleto de actina y transmite las señales mecánicas extracelulares hacia el interior de las células. Por su parte, la señalización de RhoA está implicada en la mecanotransducción a través de la regulación de la estabilización del citoesqueleto [390]. El citoesqueleto puede transferir fuerzas mecánicas y, a su vez, estas fuerzas pueden ajustar la configuración estructural del citoesqueleto [391,392].

Por otro lado, la afluencia de iones calcio a través de canales piezo en osteoblastos promueve la fosforilación de ERK1/2 y la polimerización de los filamentos perinucleares de F-actina [367]. Además, la afluencia de calcio inducida por señales mecánicas activa el heterodímero serina/treonina fosfatasa calcineurina dependiente de calmodulina (Ppp3ca) que a su vez activa el factor nuclear de células T activadas (NFAT), el regulador transcripcional asociado a Yes1 (YAP1) y la β-catenina [393].

Asimismo, la desviación de los cilios primarios causada por el cizallamiento del fluido activa los canales de Ca^{2+}, y la afluencia intracelular de Ca^{2+} inhibe la actividad de la adenilil ciclasa 6 (AC6), lo que provoca la disminución de los niveles de AMPc [380]. La disminución del nivel de AMPc en los cilios primarios potencia la osteogénesis a través de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) produciendo PGE2 [394], y através de la proteína quinasa A (PKA) inhibiendo la degradación de β-catenina [395].

Por último, la información llega al núcleo y modifica la **regulación transcripcional**. Para que las señales mecánicas se transamitan al núcleo, es necesario el enlazador del nucleoesqueleto y el citoesqueleto (LINC). Este complejo proteico se compone por las proteínas de dominio interno SUN y de dominio externo KASH [396], su función consiste en conectar el nucleoesqueleto, la envoltura nuclear y el citoesqueleto [397]. Mediante la interacción de LINC con la F-actina del citoesqueleto, el núcleo actúa como un compartimento subcelular sensible a fuerzas mecánicas [398]. La alteración de la forma del núcleo, inducida por la deformación celular y mediada por el citoesqueleto-LINC, influye en la transcripción intranuclear. Los complejos de poros nucleares de la membrana nuclear median el transporte entre el citoplasma y el núcleo [399]. Así, los estímulos mecánicos aumentan la permeabilidad de los poros nucleares gracias al estiramiento nuclear regulado por LINC, este hecho facilita la entrada de más factores de transcripción proteicos en el núcleo [400].

A través de las vías MAPK y ERK1/2 dependientes de Ras/Raf, el estrés mecánico aumenta la ERK fosforilada activada que se transloca al núcleo para fosforilar a RUNX2, este descomprime el cromosoma y favorece la transcripción de genes osteogénicos, lo que promueve a su vez la diferenciación de los osteoblastos [401,402]. NFAT entra en el núcleo y forma complejos transcripcionales con SP7 (Osterix) para desencadenar la expresión de genes osteogénicos, incluyendo *Col1a1*, *ALP*, y *Bglap* [17,393,403]. Asimismo, el aumento de las proteínas YAP/TAZ y β-catenina en el núcleo promueven la expresión de genes osteogénicos [17,404].

El proceso de mecanotransducción se puede resumir en los tres pasos mencionados anteriormente, sin embargo, este proceso consiste en una red interconectada en la que los diferentes sensores y vías de señalización cooperan entre sí.

Por todo ello, las vías de mecanotransducción y sus componentes constituyen un conjunto de potenciales dianas terapéuticas [405] donde los estímulos mecánicos

representan un enfoque terapéutico alternativo para mitigar la pérdida ósea mediante la promoción del crecimiento óseo en pacientes con osteoporosis o como terapia adyuvante en la curación de fracturas óseas.

1.7. Nanotecnología y nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs)

La nanociencia comprende el estudio de las propiedades de materiales, estructuras, moléculas, procesos o dispositivos en la escala nanométrica (tamaños que oscilan entre 1 y 100 nm), y la tecnología que la utiliza en aplicaciones prácticas se denomina nanotecnología [406,407]. En otras palabras, la nanotecnología es la rama que incluye la síntesis, ingeniería y utilización de materiales cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm, conocidos como nanomateriales [408]. Esta innovadora tecnología se ha aplicado en múltiples campos como la física, la química, la biología, la ingeniería y la medicina [409].

El estudio de materiales en la nanoescala revela propiedades muy distintas a las que se atribuyen a estos mismos materiales en una escala mayor. Estas diferencias se dan en aspectos tan diversos como la estabilidad, solubilidad, punto de fusión, estructura electrónica, magnetismo, etc. [410]. Los principales factores responsables de este fenómeno son los efectos superficiales y los efectos cuánticos [411]. Los efectos superficiales implican una mayor superficie en ralación con la masa o el volumen de material, lo que expone un mayor número de átomos a la superficie. Por su parte, la energía de la densidad de estados electrónicos varía por las dimensiones del material, al reducir el tamaño del material, los efectos cuánticos se hacen más pronunciados, y los nanomateriales se convierten en estructuras cuánticas [412]. Estas diferencias hacen que los nanomateriales presenten propiedades mecánicas, térmicas, magnéticas, electrónicas, ópticas y catalíticas mejoradas o novedosas [413,414]. Gracias a sus propiedades únicas, los nanomateriales se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones, como catálisis, tratamiento de aguas, almacenamiento de energía, medicina, agricultura, etc. [415,416]. Una de las áreas de la nanotecnología con mayor repercusión socioeconómica es la nanomedicina, definida como el uso de nanomateriales para el diagnóstico, seguimiento, control, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades [417].

En función de sus dimensiones espaciales (**Figura 1.13.**), los nanomateriales se clasifican en cuatro clases diferentes:

- De dimensión cero (0D): los nanomateriales de esta clase tienen sus tres dimensiones en el rango de la nanoescala. Algunos ejemplos son los quantum dots, los fullerenos y las nanopartículas.

- Unidimensionales (1D): los nanomateriales de esta clase tienen una dimensión fuera de la nanoescala. Algunos ejemplos son los nanotubos, las nanofibras, las nanovarillas y los nanocuernos.
- Bidimensionales (2D): los nanomateriales de esta clase tienen dos dimensiones fuera de la nanoescala. Algunos ejemplos son las nanoláminas, las nanopelículas y las nanocapas.
- Tridimensionales (3D): en esta clase los materiales no están confinados a la nanoescala en ninguna dimensión. Esta clase contiene materiales nanoestructurados, matrices de nanocables y nanotubos, etc.

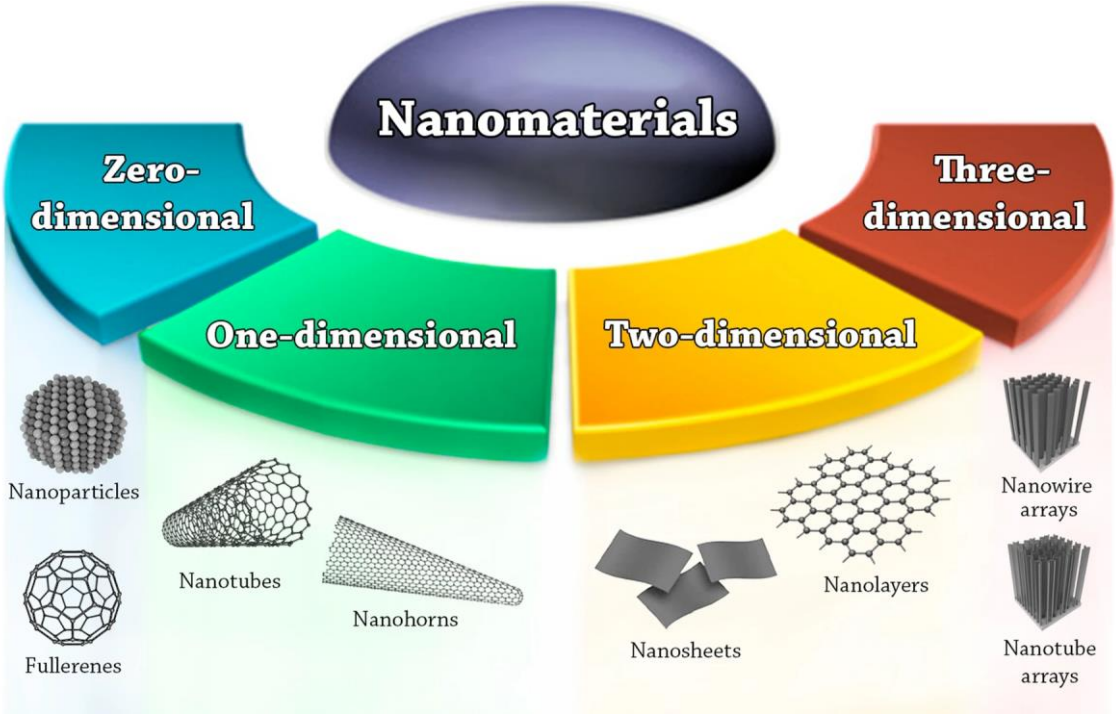


Figura 1.13. Clasificación de nanomateriales basada en las dimensiones espaciales. Reproducido de la referencia [418].

En base a su composición, los **nanomateriales** se clasifican generalmente en **orgánicos** e **inorgánicos**. Entre los nanomateriales de naturaleza orgánica que se utilizan en nanomedicina, destacan los liposomas [419], los dendrímeros [420], las nanopartículas poliméricas [421] y lipídicas [422], las micelas poliméricas [423], etc. Entre los de naturaleza inorgánica destacan las nanopartículas metálicas (Au, Ag, etc.) [424], las nanopartículas de óxidos metálicos [425,426], nanoestructuras de carbono [427] y nanopartículas de sílice [428,429] (**Figura 1.14.**). En la actualidad las nanopartículas de óxidos metálicos están ganando cada vez mayor consideración como importantes materiales tecnológicos y biomédicos, a la vez que presentan un tremendo potencial de aplicación y un enorme valor de mercado [430].

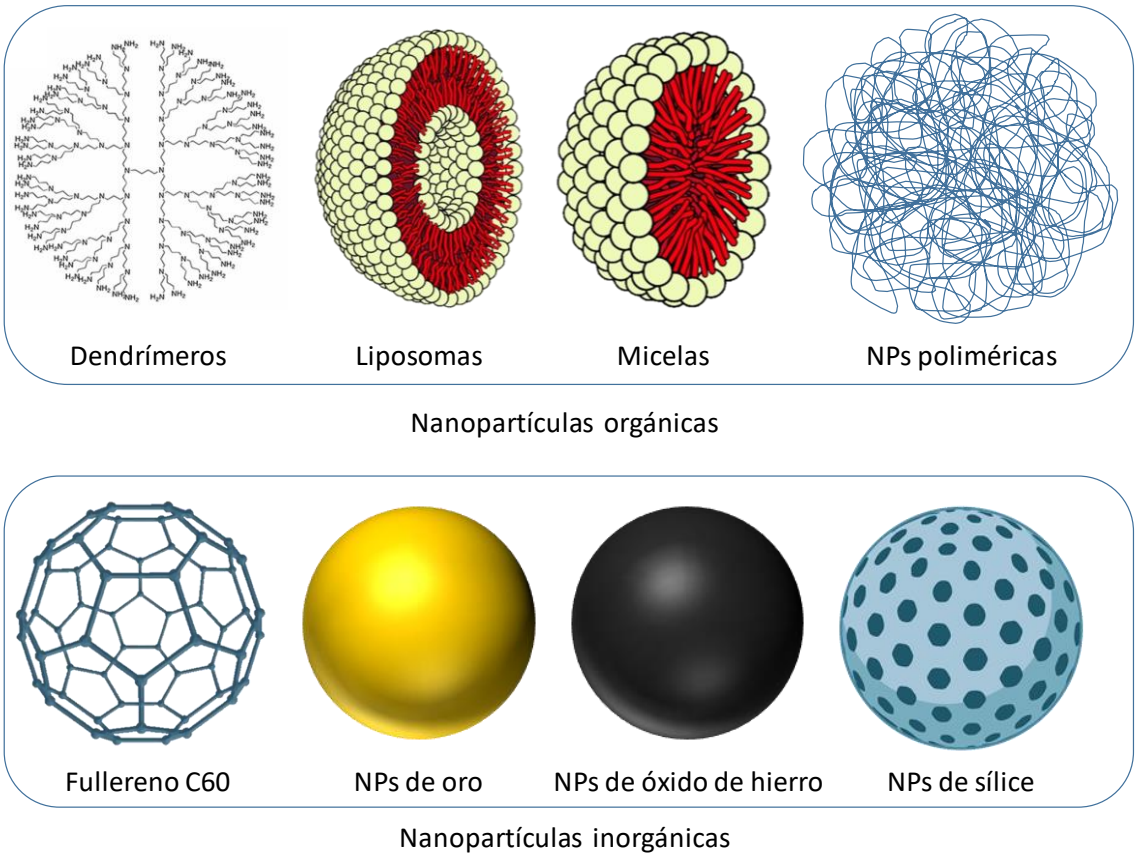


Figura 1.14. Diferentes tipos de nanopartículas orgánicas e inorgánicas. Adaptada de la referencia [418].

En el contexto de las nanopartículas de óxidos metálicos, las SPIONs han irrumpido en el área de la nanomedicina como pequeños actuadores magnéticos que ofrecen ventajas innegables para manipular vías celulares, ya que combinadas con campos magnéticos pueden responder de forma remota y espaciotemporal generando una estimulación mecánica específica sobre receptores mecanosensibles celulares [431-433].

Entre los diferentes tipos de nanopartículas de óxidos metálicos, las **SPIONs** ocupan un lugar importante debido a sus propiedades superparamagnéticas y su pequeño tamaño [434]. Además, su bajo coste, su multifuncionalidad, la posibilidad de modificar su superficie con diversos agentes químicos, el guiado a través de un campo magnético externo, la generación de calor en respuesta a un campo magnético alterno, su biocompatibilidad y su baja toxicidad permiten que las SPIONs se utilicen ampliamente en aplicaciones biomédicas [435-438].

Las nanopartículas de **magnetita** (Fe_3O_4) y **maghemita** (γ-Fe_2O_3) son las SPIONs más utilizadas en aplicaciones biomédicas (administración de fármacos, diagnóstico, terapia, etc.) [439]. Estas nanopartículas de óxido de hierro (IONPs) se denominan

SPIONs cuando presentan propiedades **superparamagnéticas**. Esta propiedad depende del tamaño y generalmente surge cuando el tamaño de las nanopartículas es inferior a 20-30 nm [440-442]. Tanto la maghemita como la magnetita a granel son ferrimagnéticas por naturaleza. Sin embargo, al disminuir su tamaño pierden su imanación permanente y se vuelven superparamagnéticas [440,443].

Al aplicar un campo magnético externo, las SPIONs se magnetizan hasta su magnetización de saturación y, al retirar el campo magnético no presentan ninguna interacción magnética residual (no retienen la magnetización). Con un tamaño tan pequeño, presentan un único dominio magnético y actúan como un "superespín único" que exhibe una alta susceptibilidad magnética. Así, al aplicar un campo magnético, estas nanopartículas proporcionan una respuesta magnética más fuerte y rápida en comparación con las partículas de mayor tamaño o los materiales a granel, con una remanencia (magnetización residual) y una coercitividad (campo necesario para llevar el magnetismo a cero) despreciables [436,444-446]. Sin embargo, cuando un material ferrimagnético o ferromagnético se somete a un campo magnético externo, permanece magnetizado hasta cierto punto incluso cuando se retira el campo. La razón es que los momentos magnéticos permanecen alineados incluso en ausencia de campo magnético debido a que exhiben multiples dominios magnéticos. Como resultado, su momento de magnetización (M) muestra un bucle de histéresis en función del campo magnético externo (H) [438]. En otras palabras, las SPIONs sólo presentan sus propiedades magnéticas cuando se someten a un campo magnético externo, mientras que las partículas de mayor tamaño o la magnetita a granel conservan sus propiedades magnéticas incluso en ausencia de campo magnético externo. Mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM) o magnetometría con dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID) se pueden analizar la magnetización de saturación, la remanencia y la coercitividad de los diferentes materiales [447,448]. Las curvas de magnetización características de cada tipo de material magnético (paramagnético, diamagnético, ferromagnético y superparamagnético) se obtienen variando el campo magnético aplicado a la muestra (**Figura 1.15.**).

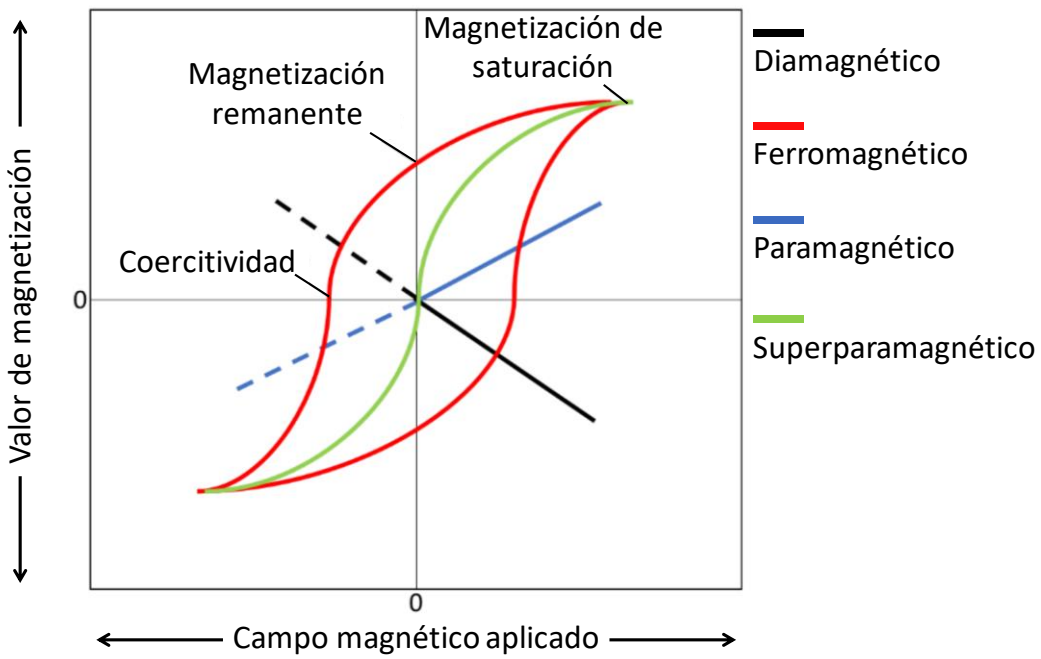


Figura 1.15. Curvas de magnetización en función del campo magnético aplicado para diferentes tipos de materiales. La respuesta magnética de un material superparamagnético se caracteriza por la ausencia de histéresis y sus altos valores de magnetización de saturación. Adaptada de la referencia [449].

La naturaleza superparamagnética implica que las partículas no se atraerán entre sí, por lo que el riesgo de aglomeración en un entorno médico se reduce al mínimo [450]. Además, el Fe es un metal presente de forma natural en el cuerpo humano (ferritina), por lo que las nanopartículas que contienen hierro son biocompatibles, ya que el cuerpo está adaptado para metabolizar las partículas en sus elementos, que pueden ser utilizados en procesos metabólicos posteriores [451].

1.7.1. Síntesis de SPIONs

Las SPIONs se pueden sintetizar por diferentes métodos, incluyendo métodos físicos, químicos y biológicos. La elección del método de síntesis es un factor importante para producir SPIONs con las propiedades deseadas (forma, tamaño, estructura, estabilidad coloidal y propiedades magnéticas). La deposición en fase gaseosa [452], la litografía por haz de electrones [453], la ablación por láser pulsado [454], la pirólisis inducida por láser [455], la molienda por bolas [456], la combustión [457] y la pirólisis por pulverización en llama [458] son muchos de los métodos **físicos** disponibles. De igual modo, la coprecipitación química [459], la descomposición térmica [460,461], las microemulsiones [462] y la síntesis hidrotermal [463] son algunos de los métodos **químicos** a los que se puede recurrir para producir nanopartículas de óxido de hierro.

En cuanto a los métodos **biológicos**, una gran variedad de plantas, bacterias, levaduras, algas y hongos se han aplicado para la fabricación de nanopartículas magnéticas basadas en óxido de hierro [464].

Entre los métodos mencionados, la coprecipitación química es uno de los más exitosos y más utilizados para sintetizar IONPs con alta magnetización de saturación [465]. Sin embargo, este método presenta algunas deficiencias como la amplia distribución del tamaño de las partículas y la utilización de una base fuerte en el proceso de reacción [466]. El método de coprecipitación implica velocidades de formación de partículas rápidas y, por lo tanto, el tamaño de las partículas y su distribución apenas se controlan. Para evitar las limitaciones de este método, se han desarrollado diferentes alternativas como las estrategias de **descomposición térmica** [466]. En el método de descomposición térmica generalmente se emplean precursores orgánicos de hierro, disolventes apolares y surfactantes. El precursor o la mezcla de precursores de hierro disueltos en un disolvente apolar y con una proporción adecuada de surfactante, se lleva a altas temperaturas mediante un calentamiento progresivo produciendo la descomposición de los reactivos y generando la formación de las nanopartículas (**Figura 1.16.**). La elección del disolvente de la reacción, la relación hierro-surfactante, la concentración inicial de los reactivos o la temperatura de estabilización de la reacción son factores que permiten modular el tamaño y la forma de las nanopartículas [467-470]. En los métodos de coprecipitación, la mayoría de las reacciones transcurren a temperatura ambiente y por ello las nanopartículas obtenidas suelen presentar baja cristalinidad. Por el contrario, a partir de la descomposición térmica a alta temperatura se obtienen IONPs magnéticas más monodispersas, de distribución de tamaño estrecha y altamente cristalinas, que presentan propiedades superiores a las obtenidas por coprecipitación, ya que la nucleación se puede separar del crecimiento y se pueden evitar las complejas reacciones de hidrólisis [466,471]. Algunas de las sales férricas más utilizadas son $Fe(CO)_5$ [472], $Fe(acac)_3$ (acac = acetilacetonato) [473], oleato de hierro [474], etc. [466]. El ácido oleico, el oleato sódico, el oleato de dibutilamonio y la oleilamina son algunos de los compuestos orgánicos utilizados como estabilizadores en el proceso de reacción para obtener IONPs monodispersas [469,475,476]. Asimismo, utilizando diferentes tipos de solventes es posible controlar los diámetros de las IONPs de manera fina: 1-octadeceno (6-14 nm), trioctilamina (13-20 nm), docosano (19-24 nm) [467], eicoseno (14 nm), di-n-octil éter (11 nm), dibencil éter (9 nm), di-n-octil éter (5 nm), hexadeceno (3,5 nm), y di-n-hexil éter (2,5 nm) [477].

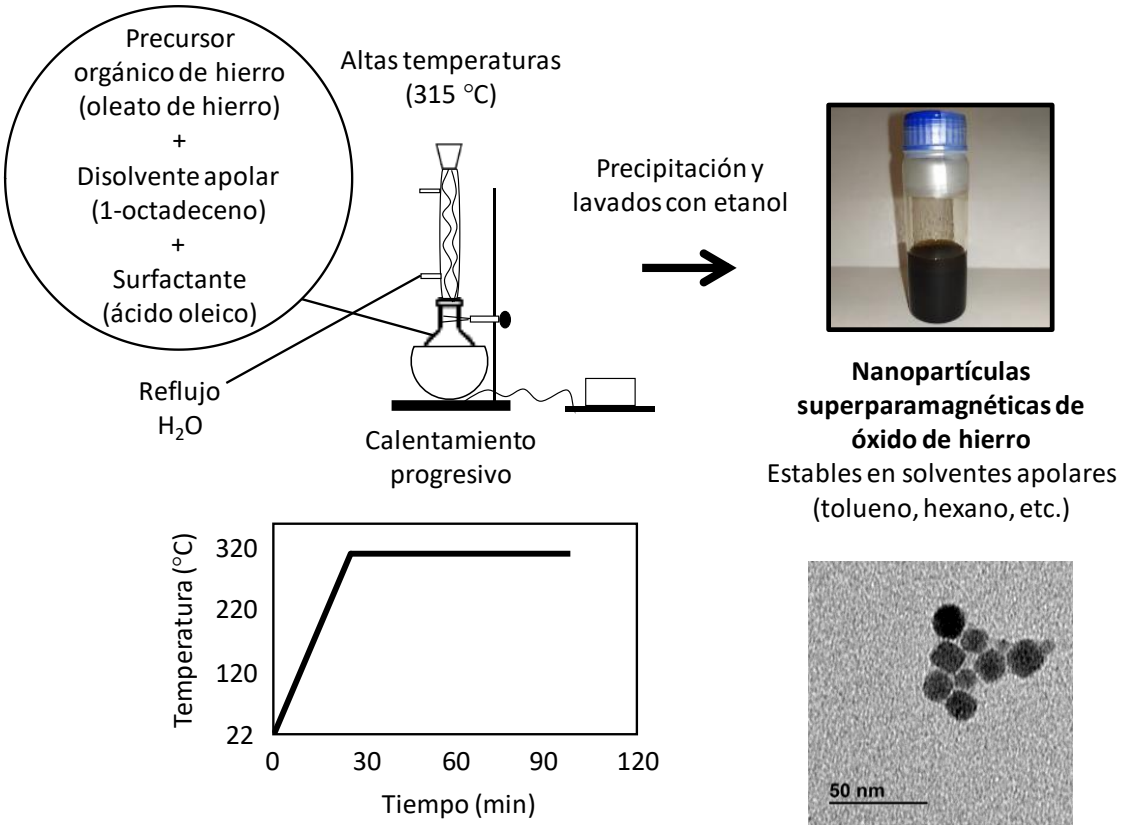


Figura 1.16. Esquema del proceso de síntesis de SPIONs mediante el método de descomposición térmica.

La ventaja de los procedimientos basados en la descomposición del oleato de Fe es que las nanopartículas de óxido de hierro pueden prepararse en una amplia gama de tamaños (de 6 a 30 nm) [478] simplemente variando las condiciones de las reacciones. No obstante, la interacción con los surfactantes hace que las nanopartículas adquieran un carácter apolar que impide sus aplicaciones biomédicas, por lo tanto, es necesario un paso adicional para poder transferirlas a un medio acuoso.

Por otra parte, la **pirólisis por pulverización en llama (FSP)** es un método físico sencillo que permite la fabricación continua de nanopartículas de gran pureza, con altos rendimientos, bajo coste y a gran escala [479-482], y hasta ahora muy poco estudiado para aplicaciones biomédicas. La vía de síntesis FSP en un solo paso incluye una serie de subprocesos físicos y químicos que ocurren simultáneamente. La producción de SPIONs mediante esta tecnología se basa en la preparación de una mezcla precursora líquida constituida por precursores orgánicos de hierro y disolventes orgánicos, que se atomiza en una boquilla justo antes de pasar por una llama. En este proceso se quema toda la materia orgánica y se produce la nucleación y el crecimiento de las partículas (**Figura 1.17.**). Como este periodo es muy corto, las partículas permanecen en el rango nanométrico. Además, como el proceso se produce a alta temperatura (2000 °C), las nanopartículas obtenidas presentan baja tasa de aglomeración, alta resistencia térmica

y elevada superficie específica. La variación de algunos parámetros del proceso como la composición de la mezcla precursora, sus concentraciones, las condiciones oxidativas de la llama, el caudal de alimentación, etc., permiten controlar el tamaño de partícula, la forma y la fase cristalina de las nanopartículas [458,483-488]. En estos procesos, generalmente se utiliza oxígeno como gas de dispersión y una mezcla de metano y óxigeno como gas de combustión para formar una llama automantenida. Al final del proceso, las nanopartículas producidas se recogen en un filtro de mangas.

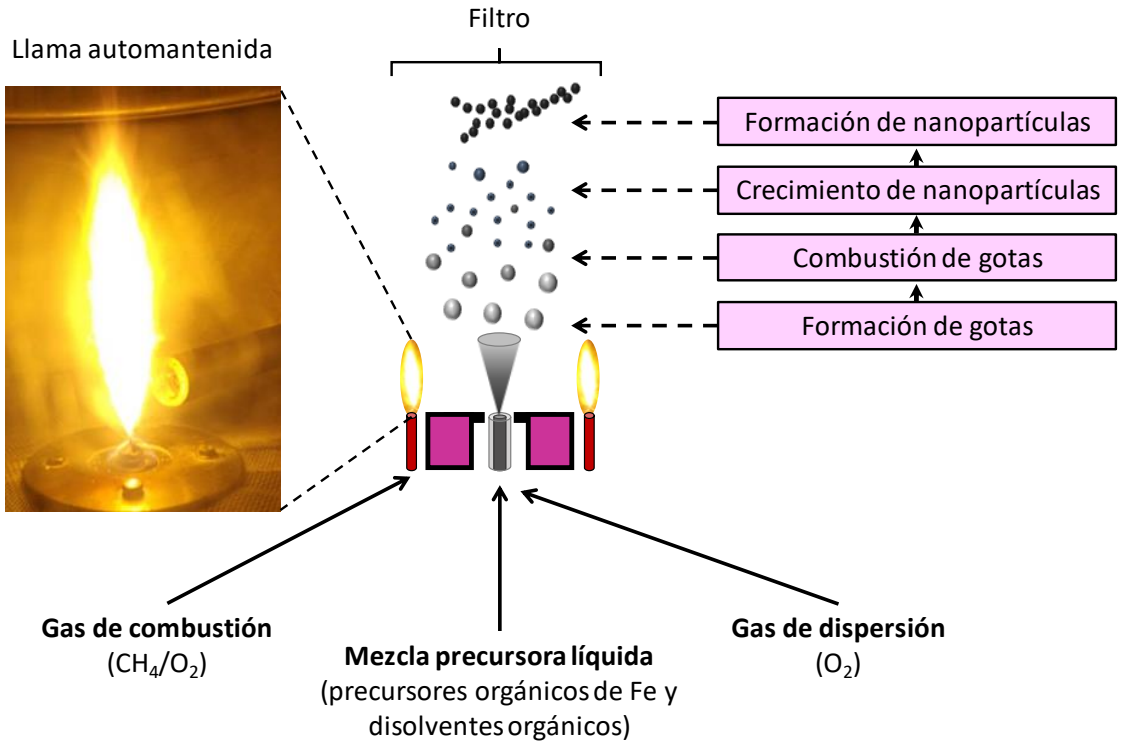


Figura 1.17. Esquema del proceso de síntesis de SPIONs mediante la tecnología de pirolisis por pulverización en llama. Adaptada de la referencia [489].

1.7.2. Recubrimiento y funcionalización de SPIONs

La presencia de grupos hidroxilo (Fe-OH) en la superficie de las SPIONs proporciona puntos de anclaje que permiten la unión de diferentes grupos funcionales. A la vez, existe un sinfín de materiales orgánicos e inorgánicos que pueden ser utilizados en la funcionalización y el recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro [466]. Estas modificaciones se dan a través de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, quelantes y covalentes [490].

El recubrimiento y la modificación de la superficie de las SPIONs es de gran importancia por varios motivos: reduce la tendencia a la agregación de las partículas desnudas, mejorando así su dispersabilidad y estabilidad coloidal; protege su superficie

de la oxidación, con lo que se preservan sus propiedades magnéticas; proporciona una superficie para la conjugación de moléculas de fármacos y ligandos; favorece la biocompatibilidad de las nanopartículas; y aumenta su eficacia de internalización por las células diana [436,491]. Si bien, es importante que las modificaciones o recubrimientos proporcionen características favorables a la vez que preserven las propiedades deseables de las SPIONs de partida. Con respecto a la metodología, se dispone de una gran variedad de estrategias que permiten el recubrimiento y la modificación de la superficie de las SPIONs [466,490]. Estas pueden recubrirse durante o después del proceso de síntesis, asimismo, dependiendo de la ruta de síntesis empleada, las nanopartículas obtenidas pueden presentar la superficie desnuda, recubrimientos hidrofóbicos que facilitan la suspensión en medios orgánicos o ligandos hidrofílicos que proporcionan estabilidad coloidal en medios acuosos [466]. Además, para las aplicaciones biomédicas, es necesario obtener nanopartículas dispersables en agua, ya que la mayoría de los medios biológicos son soluciones acuosas.

Las numerosas estrategias existentes para funcionalizar las SPIONs pueden clasificarse en cuatro tipos en función de su estructura (**Figura 1.18.**):

- Núcleo-corteza: en esta estructura, el núcleo de óxido de hierro se recubre de un componente orgánico o inorgánico que aporta estabilidad y funcionalidad. Una variante de este tipo es la estructura núcleo-corteza inversa, donde las SPIONs recubrirán la superficie de otro material funcional no magnético [492-494].
- Materiales compuestos dispersos en una matriz: las SPIONs se incorporan de manera dispersa en una matriz para evitar la agregación de las mismas [495].
- Estructuras Janus: son un ejemplo de nanomaterial compuesto por dos mitades con propiedades diferentes. Una de las caras está compuesta por óxido de hierro y la otra por otro material funcional [496,497].
- Corteza-núcleo-corteza: en esta estructura, las SPIONs se encuentran entre los otros dos materiales funcionales [466].

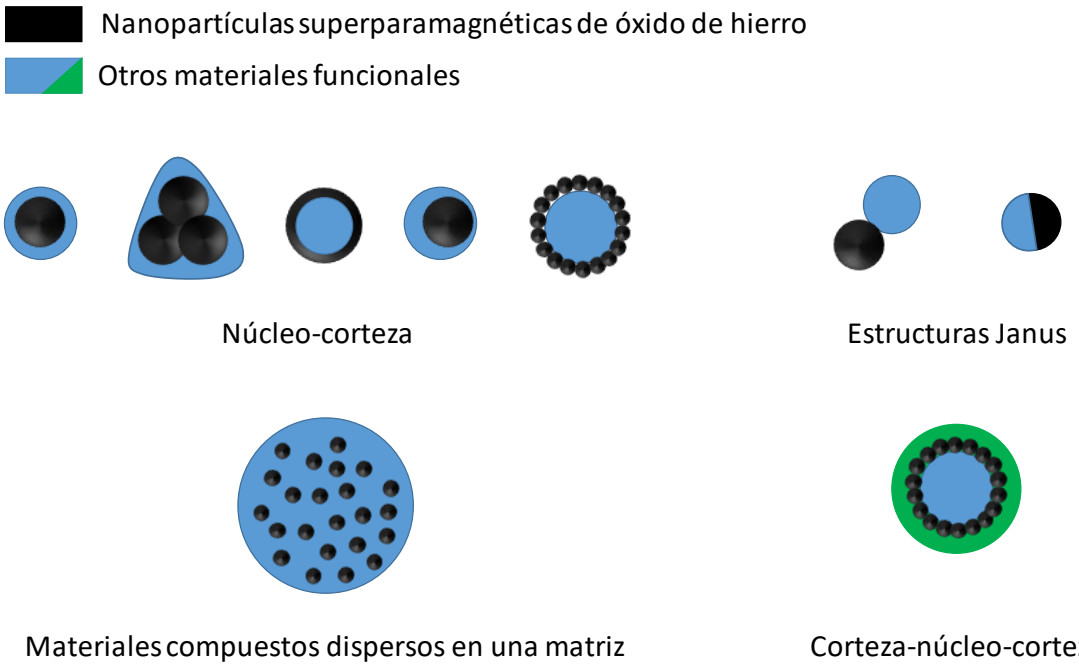


Figura 1.18. Estructuras típicas de nanomateriales compuestos magnéticos. Las esferas negras representan las SPIONs, las entidades no magnéticas y otros materiales funcionales aparecen en otros colores. La entidad no magnética puede dotar al material compuesto de otras funcionalidades y propiedades, proporcionando sistemas híbridos multifuncionales. Adaptada de la referencia [466].

Estas modificaciones pueden consistir en funcionalizaciones y recubrimientos con materiales orgánicos como pequeñas moléculas y ácidos orgánicos (silanos, ácido oleico, ácido cítrico, ácido dimercaptosuccínico, etc.) [468,498-500]; polímeros (almidón, alginato, colágeno, quitosano, ácido hialurónico, etc.) [501-503]; biomoléculas (anticuerpos, agentes terapéuticos, agentes de targeting, etc.) [504,505]; y con materiales inorgánicos como sílice, carbonos, metales y óxidos metálicos [506-509] (**Figura 1.19.**). La modificación de la superficie de estas nanopartículas permite que puedan utilizarse en una amplia gama de aplicaciones.

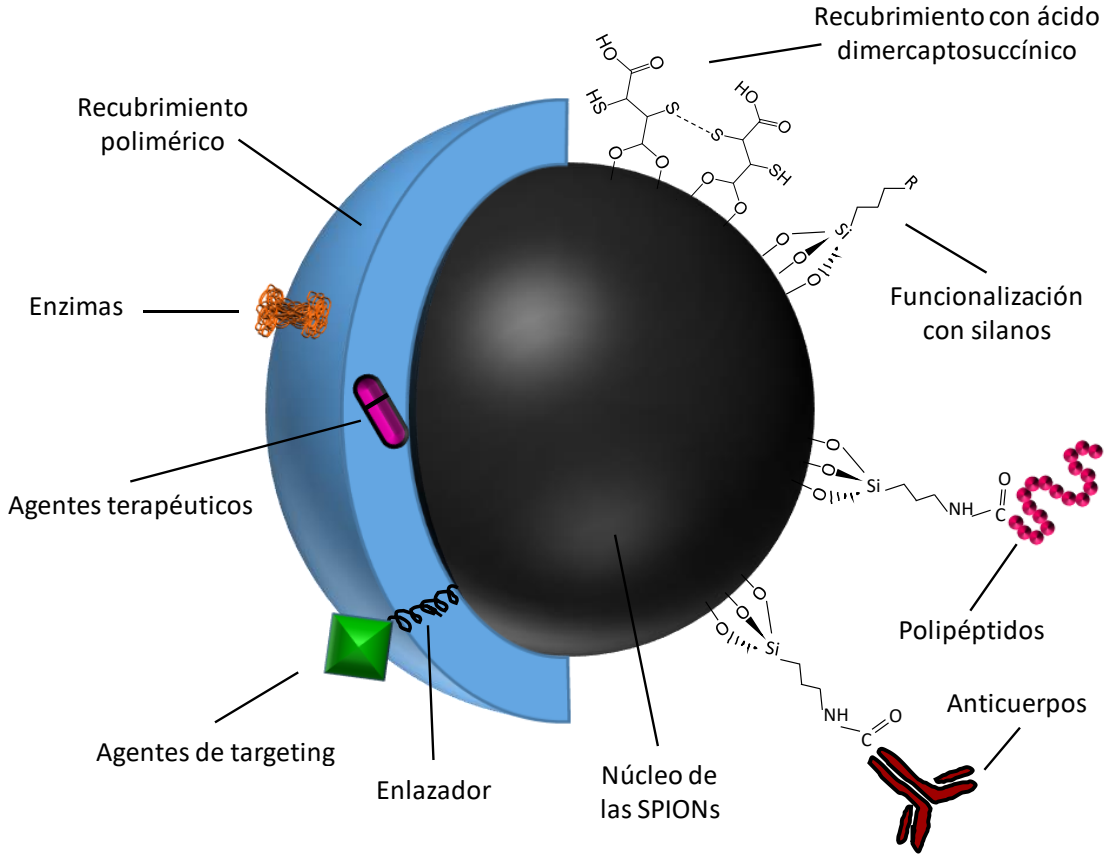


Figura 1.19. Representación esquemática de algunos ejemplos de recubrimientos y funcionalizaciones de SPIONs.

1.7.3. Aplicación de las SPIONs en la ingeniería del tejido óseo

En las últimas décadas, las SPIONs han sido ampliamente estudiadas no sólo por su interés científico fundamental, sino también por sus numerosas aplicaciones tecnológicas en campos como la recuperación ambiental, la electrónica, la energía, la agricultura y la biomedicina; destacando en este último la administración dirigida de fármacos, la imagen por resonancia magnética, la hipertermia magnética, la bioseparación y biodetección, la ingeniería de tejidos, etc. [438,465,466,510-513].

Dentro del campo de la ingeniería del tejido óseo, las nanopartículas magnéticas han surgido como una herramienta con gran potencial que aprovecha el magnetismo inherente de las mismas en microambientes celulares, para mejorar las propiedades osteogénicas en el diseño de andamios [514].

En primer lugar, las nanopartículas magnéticas pueden ser internalizadas por las células y promover la activación de vías intracelulares que favorecen la osteogénesis. Algunos estudios han demostrato la capacidad de las SPIONs para potenciar la osteogénesis en células madre en ausencia de un campo magnético externo [515-518]. En sugundo lugar, varios estudios han demostrado que los campos magnéticos externos

también presentan un efecto osteogénico propio [519-522]. En tercer lugar, la combinación de un campo magnético externo con las SPIONs dentro de un defecto óseo podría aumentar la diferenciación osteogénica de las células mediante tres mecanismos [514,519,523]:

- Efectos del campo micromagnético: las SPIONs expuestas a campos magnéticos externos se magnetizan rápidamente hasta la saturación, momento en el que se comportan en cierto modo como microimanes. En ese momento, las células adyacentes quedan expuestas al campo micromagnético resultante. En los andamios con SPIONs incorporadas también se genera un microentrono magnético. Este magnetismo puede provocar cambios en los receptores y canales iónicos de las membranas celulares que lo detectan, lo que se traduce en mejoras significativas de la diferenciación y proliferación osteogénicas.
- Estimulación mecánica: los estímulos mecánicos desempeñan un papel clave en la proliferación y la diferenciación de osteoblastos y MSCs [334,524]. Debido a la magnetización, las nanopartículas magnéticas pueden considerarse dipolos magnéticos. Bajo un campo magnético generado por un imán permanente, las nanopartículas magnéticas están sometidas a la fuerza de atracción del campo magnético externo y a las interacciones magnéticas dipolares entre las nanopartículas magnéticas. Dentro de la estimulación magneto-mecánica, existen varias estrategias para proporcionar estímulos biomecánicos a nivel celular. Por ejemplo, las células crecidas sobre andamios o matrices magnéticas pueden percibir estímulos mecánicos provenientes de la distorsión o movimientos que las SPIONs provoquen en dichos dispositivos bajo la aplicación de un campo magnético externo [525-528]. Otra estrategia consiste en recubrir las SPIONs con ligandos específicos y unirlas directamente a receptores de la superficie celular implicados en procesos de mecanotransducción, de esta manera se pueden inducir fuerzas de compresión y tracción a nanoescala en la membrana celular bajo la acción de un campo magnético externo [529-531]. En la **Figura 1.20.** se muestran los diferentes tipos de fuerzas que se pueden generar en función de la configuración de los aplicadores de campo magnético [431].
- Aumento en las nanoportículas de óxido de hierro intracelulares: puede ocurrir que la aplicación de un campo magnético externo aumente la captación de SPIONs intracelulares, resultando en una mayor diferenciación osteogénica de las MSCs [532,533]. Por tanto, los cambios en las propiedades fisicoquímicas y la endocitosis celular de las SPIONs bajo la aplicación de campos magnéticos pueden mejorar significativamente la capacidad de regeneración ósea.

En pocas palabras, la información disponible en la bibliografía atribuye efectos osteogénicos a las SPIONs solas, a los campos magnéticos solos y a la combinación de ambos a través de diferentes mecanismos. En muchas ocasiones este hecho dificulta el descubrimiento de los mecanismos implicados en los efectos observados.

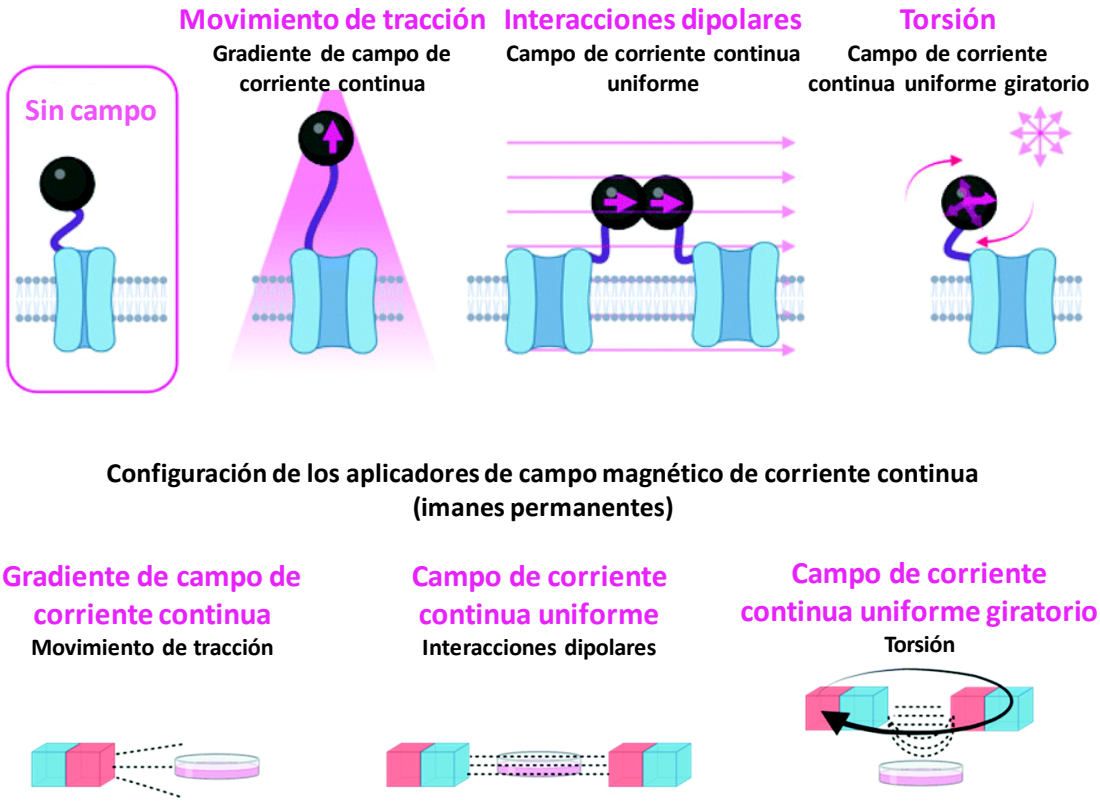


Figura 1.20. Representación esquemática de los diferentes mecanismos utilizados para manipular actuadores magnéticos (SPIONs) en función de las diferentes configuraciones de los aplicadores de campo magnético de corriente continua utilizando imanes permanentes. Adaptada de la referencia [431].

Las SPIONs se han utilizado en la ingeniería del tejido óseo para la activación celular debido a la capacidad de cada nanopartícula de generar un campo magnético intrínseco. Este hecho también ha facilitado su aplicación en la obtención de imágenes por resonancia magnética. Además, otra aplicación de las SPIONs bajo la influencia de un campo magnético externo consiste en el transporte de determinados agentes bioactivos o células madre mesenquimales a un defecto óseo [517,534-537].

Algunos trabajos estudian el efecto osteogénico de las SPIONs solas o funcionalizadas con algún ligando específico, sin embargo, la mayoría de los artículos de investigación publicados consisten en SPIONs incorporadas en algún andamio, matriz o dispositivo [514-519,529,538-542]. Estos dispositivos están compuestos por biomateriales como hidroxiapatita, colágeno, gelatina, quitosano, PCL, PLA, PLGA, PGA, vidrio mesoporo bioactivo, cementos de fosfato cálcico, entre otros. El contenido de nanopartículas magnéticas en los andamios varía entre el 0,05 y el 20% y las propiedades osteogénicas mejoradas se demuestran *in vitro* e *in vivo* [514]. En cuanto a los métodos

de preparación de los andamios magnéticos, los más utilizados son la liofilización, el electrohilado, la impresión 3D, los métodos de síntesis química y el método de autoensamblaje inducido por evaporación, entre otros [523,543].

Referencias bibliográficas

[1] Bigham-Sadegh, A., & Oryan, A. (2015). Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *International wound journal*, *12*(3), 238-247.

[2] Marolt, D., Knezevic, M., & Vunjak-Novakovic, G. (2010). Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem cell research & therapy*, *1*(2), 1-11.

[3] Webb, J. C. J., & Tricker, J. (2000). A review of fracture healing. *Current Orthopaedics*, *6*(14), 457-463.

[4] Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*, 121-145.

[5] Riggs, B. L., Melton III, L. J., Robb, R. A., Camp, J. J., Atkinson, E. J., McDaniel, L., Amin, S., Rouleau, P. A., & Khosla, S. (2008). A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *Journal of Bone and Mineral Research*, *23*(2), 205-214.

[6] Ralston, S. H. (2013). Bone structure and metabolism. *Medicine*, *41*(10), 581-585.

[7] Jacobs, C. R. (2000). The mechanobiology of cancellous bone structural adaptation. *Journal of rehabilitation research and development*, *37*(2), 209-216.

[8] Huiskes, R., Ruimerman, R., Van Lenthe, G. H., & Janssen, J. D. (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, *405*(6787), 704-706.

[9] Monier-Faugere, M. C., Langub, M. C., & Malluche, H. H. (1998). Bone biopsies: a modern approach. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders* (pp. 237-280e). Academic Press.

[10] Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., & Uludağ, H. (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *80*, 1-30.

[11] Boskey, A. L., & Coleman, R. (2010). Aging and bone. *Journal of dental research*, *89*(12), 1333-1348.

[12] Ulstrup, A. K. (2008). Biomechanical concepts of fracture healing in weight-bearing long bones. *Acta Orthopaedica Belgica*, *74*(3), 291.

[13] Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of biochemistry and biophysics*, *561*, 3-12.

[14] Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*, *4*(8), 743-765.

[15] Sinha, K. M., & Zhou, X. (2013). Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry*, *114*(5), 975-984.

[16] Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *cell*, *89*(5), 755-764.

[17] Liu, Z., Wang, Q., Zhang, J., Qi, S., Duan, Y., & Li, C. (2023). The Mechanotransduction Signaling Pathways in the Regulation of Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 14326.

[18] Marom, R., Shur, I., Solomon, R., & Benayahu, D. (2005). Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. *Journal of cellular physiology*, *202*(1), 41-48.

[19] Granéli, C., Thorfve, A., Ruetschi, U., Brisby, H., Thomsen, P., Lindahl, A., & Karlsson, C. (2014). Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem cell research*, *12*(1), 153-165.

[20] Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *Journal of bone and mineral research*, *13*(5), 793-802.

[21] Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *235*(1), 176-190.

[22] Mullender, M. G., Van Der Meer, D. D., Huiskes, R., & Lips, P. (1996). Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*, *18*(2), 109-113.

[23] Rochefort, G. Y., Pallu, S., & Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis international*, *21*, 1457-1469.

[24] Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M., & Jee, W. S. (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning microscopy*, *3*(3), 27.

[25] Donahue, H. J., McLeod, K. J., Rubin, C. T., Andersen, J., Grine, E. A., Hertzberg, E. L., & Brink, P. R. (1995). Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: Cell line–

dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of bone and mineral research*, *10*(6), 881-889.

[26] Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikko, K., & Vaananen, H. K. (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*, *276*(5310), 270-273.

[27] Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., & Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PloS one*, *2*(1), e179.

[28] Hollberg, K., Hultenby, K., Hayman, A. R., Cox, T. M., & Andersson, G. (2002). Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. *Experimental cell research*, *279*(2), 227-238.

[29] Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Thompson, S. K., Amegadzie, B. Y., Hanning, C. R., Jones, C., Kurdyla, J. T., McNulty, D. E., Drake, F. H., Gowen, M., & Levy, M. A. (1996). Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K: EXPRESSION, PURIFICATION, ACTIVATION, AND SUBSTRATE IDENTIFICATION (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *271*(21), 12517-12524.

[30] Engsig, M. T., Chen, Q. J., Vu, T. H., Pedersen, A. C., Therkidsen, B., Lund, L. R., Henriksen, K., Lenhard, T., Foged, N. T., Werb, Z., & Delaissé, J. M. (2000). Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *The Journal of cell biology*, *151*(4), 879-890.

[31] Pilitsis, J. G., Lucas, D. R., & Rengachary, S. R. (2002). Bone healing and spinal fusion. *Neurosurgical focus*, *13*(6), 1-6.

[32] Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., & Martin, T. J. (Eds.). (2008). *Principles of bone biology*. Academic press.

[33] Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*, *15*(53), e76.

[34] Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S., & Francis-West, P. (2021). Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics*, *250*(3), 414-449.

[35] Anderson, H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports*, *5*(3), 222-226.

[36] Anderson, H. C. (2007). The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. *Current Opinion in Orthopaedics*, *18*(5), 428-433.

[37] Wuthier, R. E. (1975). Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *409*(1), 128-143.

[38] Arana-Chavez, V. E., Soares, A. M. V., & Katchburian, E. (1995). Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Archives of histology and cytology*, *58*(3), 285-292.

[39] Glimcher, M. J. (1998). The nature of the mineral phase in bone: biological and clinical implications. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders* (pp. 23-52e). Academic Press.

[40] Ali, S. Y., Sajdera, S. W., & Anderson, H. C. (1970). Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *67*(3), 1513-1520.

[41] Anderson, H. C. (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *The Journal of cell biology*, *41*(1), 59-72.

[42] Arceo-Mendoza, R. M., & Camacho, P. (2015). Prediction of fracture risk in patients with osteoporosis: a brief review. *Women's health*, *11*(4), 477-484.

[43] WA, P. (1993). Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, *94*(6), 646-650.

[44] Anthamatten, A., & Parish, A. (2019). Clinical update on osteoporosis. *Journal of midwifery & women's health*, *64*(3), 265-275.

[45] on Osteoporosis, N. C. D. P., & Prevention, D. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*, *285*(6), 785-795.

[46] Johnston, C. B., & Dagar, M. (2020). Osteoporosis in older adults. *Medical Clinics*, *104*(5), 873-884.

[47] Cheng, C. H., Chen, L. R., & Chen, K. H. (2022). Osteoporosis due to hormone imbalance: an overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1376.

[48] Li, H., Xiao, Z., Quarles, L. D., & Li, W. (2021). Osteoporosis: mechanism, molecular target and current status on drug development. *Current medicinal chemistry*, *28*(8), 1489-1507.

[49] Tu, K. N., Lie, J. D., Wan, C. K. V., Cameron, M., Austel, A. G., Nguyen, J. K., Van, K., & Hyun, D. (2018). Osteoporosis: a review of treatment options. *Pharmacy and Therapeutics*, *43*(2), 92.

[50] Kanis, J. A., Cooper, C., Rizzoli, R., & Reginster, J. Y. (2019). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international*, *30*, 3-44.

[51] Kanis, J. A. (2008). Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report. *http://www. shef. ac. uk/FRAX*.

[52] Johnell, O., & Kanis, J. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international*, *17*, 1726-1733.

[53] Kanis, J. A., Johnell, O., Oden, A., Sernbo, I., Redlund-Johnell, I., Dawson, A., De Laet, C., & Jonsson, B. (2000). Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporosis international*, *11*, 669-674.

[54] Qaseem, A., Forciea, M. A., McLean, R. M., Denberg, T. D., & Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians*. (2017). Treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures in men and women: a clinical practice guideline update from the American College of Physicians. *Annals of internal medicine*, *166*(11), 818-839.

[55] Melton, L. 3., Achenbach, S. J., Atkinson, E. J., Therneau, T. M., & Amin, S. (2013). Long-term mortality following fractures at different skeletal sites: a population-based cohort study. *Osteoporosis International*, *24*, 1689-1696.

[56] Larrainzar-Garijo, R., Fernández-Tormos, E., Collado-Escudero, C. A., Alcantud Ibáñez, M., Oñorbe-San Francisco, F., Marin-Corral, J., Casadevall, D., Donaire-Gonzalez, D., Martínez-Sanchez, L., Cabal-Hierro, L., Benavent, D., & Brañas, F. (2024). Predictive model for a second hip fracture occurrence using natural language processing and machine learning on electronic health records. *Scientific Reports*, *14*(1), 532.

[57] Larrainzar-Garijo, R., Díez-Pérez, A., Fernández-Tormos, E., & Prieto-Alhambra, D. (2022). Risk factors for a second nonsimultaneous hip fracture in a prospective cohort study. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, *142*(10), 2611-2617.

[58] Reid, I. R., & Billington, E. O. (2022). Drug therapy for osteoporosis in older adults. *The Lancet*, *399*(10329), 1080-1092.

[59] Rodan, G. A. (1998). Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *38*(1), 375-388.

[60] Oryan, A., & Sahvieh, S. (2021). Effects of bisphosphonates on osteoporosis: Focus on zoledronate. *Life Sciences*, *264*, 118681.

[61] Kanis, J. A., Cooper, C., Rizzoli, R., Abrahamsen, B., Al-Daghri, N. M., Brandi, M. L., Cannata-Andia, J., Cortet, B., Dimai, H. P., Ferrari, S., Hadji, P., Harvey, N. C., Kraenzlin, M., Kurth, A., McCloskey, E., Minisola, S., Thomas, T., & Reginster, J. Y. (2017). Identification and management of patients at increased risk of osteoporotic fracture: outcomes of an ESCEO expert consensus meeting. *Osteoporosis International*, *28*, 2023-2034.

[62] Saito, T., Sterbenz, J. M., Malay, S., Zhong, L., MacEachern, M. P., & Chung, K. C. (2017). Effectiveness of anti-osteoporotic drugs to prevent secondary fragility fractures: systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International*, *28*, 3289-3300.

[63] Compston, J., Cooper, A., Cooper, C., Gittoes, N., Gregson, C., Harvey, N., Hope, S., Kanis, J. A., McCloskey, E. V., Poole, K. E. S., Reid, D. M., Selby, P., Thompson, F., Thurston, A., & Vine, N. (2017). UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Archives of osteoporosis*, *12*, 1-24.

[64] Kanis, J. A., McCloskey, E. V., Johansson, H., Cooper, C., Rizzoli, R., & Reginster, J. Y. (2013). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international*, *24*(1), 23-57.

[65] Skjødt, M. K., Frost, M., & Abrahamsen, B. (2019). Side effects of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease. *British journal of clinical pharmacology*, *85*(6), 1063-1071.

[66] Oryan, A., Alidadi, S., & Moshiri, A. (2013). Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard tissue*, *2*(2), 1-12.

[67] Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. (2015). Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*, *11*(1), 45-54.

[68] Brandi, M. L. (2010). How innovations are changing our management of osteoporosis. *Medicographia*, *32*(1), 1-6.

[69] Cheal, E. J., Hayes, W. C., White III, A. A., & Perren, S. M. (1985). Stress analysis of compression plate fixation and its effects on long bone remodeling. *Journal of Biomechanics*, *18*(2), 141-150.

[70] Holmström, T., Paavolainen, P., Slätis, P., & Karaharju, E. (1986). Effect of compression on fracture healing: plate fixation studied in rabbits. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, *57*(4), 368-372.

[71] Lewallen, D. G., Chao, E. Y., Kasman, R. A., & Kelly, P. J. (1984). Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *JBJS*, *66*(7), 1084-1091.

[72] Chen, J. C., & Jacobs, C. R. (2013). Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells. *Stem cell research & therapy*, *4*, 1-10.

[73] Perren, S. M. (1979). Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, *138*, 175-196.

[74] Egol, K. A., Kubiak, E. N., Fulkerson, E., Kummer, F. J., & Koval, K. J. (2004). Biomechanics of locked plates and screws. *Journal of orthopaedic trauma*, *18*(8), 488-493.

[75] Duan, Z. W., & Lu, H. (2021). Effect of mechanical strain on cells involved in fracture healing. *Orthopaedic Surgery*, *13*(2), 369-375.

[76] Saunders, M. M., & Lee, J. S. (2008). The influence of mechanical environment on bone healing and distraction osteogenesis. *Atlas of the oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, *16*(2), 147-158.

[77] Aro, H. T., & Chao, E. Y. (1993). Biomechanics and biology of fracture repair under external fixation. *Hand clinics*, *9*(4), 531-542.

[78] Phillips, A. M. (2005). Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, *36*(3), S5-S7.

[79] Bahney, C. S., Zondervan, R. L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J. W., Ahn, J., Miclau, T., Marcucio, R. S., & Hankenson, K. D. (2019). Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research®*, *37*(1), 35-50.

[80] Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, *42*(6), 551-555.

[81] Ito, H. (2011). Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Modern rheumatology*, *21*(2), 113-121.

[82] Thompson, D. D. (2003). Introduction-Mechanisms of fracture healing and pharmacologic control. *JOURNAL OF MUSCULOSKELETAL AND NEURONAL INTERACTIONS*, *3*(4), 295-296.

[83] Marsh, D. R., & Li, G. (1999). The biology of fracture healing: optimising outcome. *British medical bulletin*, *55*(4), 856-869.

[84] Geris, L., Gerisch, A., Vander Sloten, J., Weiner, R., & Van Oosterwyck, H. (2008). Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *Journal of theoretical biology*, *251*(1), 137-158.

[85] Goldhahn, J., Féron, J. M., Kanis, J., Papapoulos, S., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., Dere, W., Mitlak, B., Tsouderos, Y., & Boonen, S. (2012). Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper. *Calcified tissue international*, *90*(5), 343-353.

[86] Ferrara, N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of molecular medicine*, *77*, 527-543.

[87] Hausman, M. R., Schaffler, M. B., & Majeska, R. J. (2001). Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone*, *29*(6), 560-564.

[88] Glowacki, J. (1998). Angiogenesis in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *355*, S82-S89.

[89] Dwek, J. R. (2010). The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?. *Skeletal radiology*, *39*(4), 319-323.

[90] LaStayo, P. C., Winters, K. M., & Hardy, M. (2003). Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. *Journal of Hand Therapy*, *16*(2), 81-93.

[91] Mountziaris, P. M., & Mikos, A. G. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *14*(2), 179-186.

[92] Haverstock, B. D., & Mandracchia, V. J. (1998). Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. *The journal of foot and ankle surgery*, *37*(1), 69-74.

[93] Claes, L., Augat, P., Suger, G., & Wilke, H. J. (1997). Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *Journal of orthopaedic research*, *15*(4), 577-584.

[94] Claes, L. E., Heigele, C. A., Neidlinger-Wilke, C., Kaspar, D., Seidl, W., Margevicius, K. J., & Augat, P. (1998). Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, *355*, S132-S147.

[95] Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. In *Seminars in cell & developmental biology, 19*(5), 459-466. Academic Press.

[96] Puzas, J. E., O Keefe, R. J., Schwarz, E. M., & Zhang, X. (2003). Pharmacologic modulators of fracture healing: the role of cyclooxygenase inhibition. *JOURNAL OF MUSCULOSKELETAL AND NEURONAL INTERACTIONS*, *3*(4), 308-312.

[97] Nicholson, J. A., Makaram, N., Simpson, A. H. R. W., & Keating, J. F. (2021). Fracture nonunion in long bones: A literature review of risk factors and surgical management. *Injury*, *52*, S3-S11.

[98] Wildemann, B., Ignatius, A., Leung, F., Taitsman, L. A., Smith, R. M., Pesántez, R., Stoddart, M. J., Richards, R. G., & Jupiter, J. B. (2021). Non-union bone fractures. *Nature reviews Disease primers*, *7*(1), 57.

[99] Morgan, E. F., De Giacomo, A., & Gerstenfeld, L. C. (2014). Overview of skeletal repair (fracture healing and its assessment). *Skeletal Development and Repair: Methods and Protocols*, 13-31.

[100] Zura, R., Xiong, Z., Einhorn, T., Watson, J. T., Ostrum, R. F., Prayson, M. J., Della Rocca, G. J., Mehta, S., McKinley, T., Wang, Z., & Steen, R. G. (2016). Epidemiology of fracture nonunion in 18 human bones. *JAMA surgery*, *151*(11), e162775-e162775.

[101] Yaacobi, E., Sanchez, D., Maniar, H., & Horwitz, D. S. (2017). Surgical treatment of osteoporotic fractures: an update on the principles of management. *Injury*, *48*, S34-S40.

[102] Toosi, S., Behravan, N., & Behravan, J. (2018). Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *106*(9), 2552-2562.

[103] Verrier, S., Alini, M., Alsberg, E., Buchman, S. R., Kelly, D., Laschke, M. W., Menger, M. D., Murphy, W. L., Stegemann, J. P., Schütz, M., Miclau, T., Stoddart, M. J., & Evans, C. (2016). Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects. *Eur Cell Mater*, *32*, 87-110.

[104] Majidinia, M., Sadeghpour, A., & Yousefi, B. (2018). The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of cellular physiology*, *233*(4), 2937-2948.

[105] Burchardt, H. (1987). Biology of bone transplantation. *Orthopedic Clinics of North America*, *18*(2), 187-196.

[106] Ateschrang, A., Ochs, B. G., Lüdemann, M., Weise, K., & Albrecht, D. (2009). Fibula and tibia fusion with cancellous allograft vitalised with autologous bone marrow: first results for infected tibial non-union. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, *129*, 97-104.

[107] Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine*, *9*, 1-10.

[108] Calori, G. M., Mazza, E. L., Mazzola, S., Colombo, A., Giardina, F., Romanò, F., & Colombo, M. (2017). Non-unions. *Clinical cases in mineral and bone Metabolism*, *14*(2), 186.

[109] Tseng, S. S., Lee, M. A., & Reddi, A. H. (2008). Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing. *JBJS*, *90*(Supplement_1), 92-98.

[110] Bauer, T. W., & Muschler, G. F. (2000). Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *371*, 10-27.

[111] Sheikh, Z., Sima, C., & Glogauer, M. (2015). Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. *Materials*, *8*(6), 2953-2993.

[112] Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, *10*(Suppl 2), S96-S101.

[113] Keating, J. F., & McQueen, M. M. (2001). Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, *83*(1), 3-8.

[114] Di Martino, A., Liverani, L., Rainer, A., Salvatore, G., Trombetta, M., & Denaro, V. (2011). Electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *Musculoskeletal surgery*, *95*, 69-80.

[115] Parikh, S. N. (2002). Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of postgraduate medicine*, *48*(2), 142-148.

[116] Zimmermann, G., & Moghaddam, A. (2011). Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*, *42*, S16-S21.

[117] Marques Pereira-Junior, O. C., Rahal, S. C., Iamaguti, P., Felisbino, S. L., Pavan, P. T., & Vulcano, L. C. (2007). Comparison between polyurethanes containing castor oil (soft segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications*, *21*(3), 283-297.

[118] Khan, Y., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G., & Laurencin, C. T. (2008). Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *Jbjs*, *90*(Supplement_1), 36-42.

[119] Lichte, P., Pape, H. C., Pufe, T., Kobbe, P., & Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*, *42*(6), 569-573.

[120] Janicki, P., & Schmidmaier, G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, *42*, S77-S81.

[121] Oryan, A., Meimandi Parizi, A., Shafiei-Sarvestani, Z., & Bigham, A. S. (2012). Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, hidtopathological and biomechanical evaluation. *Cell and tissue banking*, *13*, 639-651.

[122] Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L., & Greenfield, M. L. V. (1997). Autogenous iliac crest bone graft: complications and functional assessment. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *339*, 76-81.

[123] Ehrler, D. M., & Vaccaro, A. R. (2000). The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, *371*, 38-45.

[124] Steijvers, E., Ghei, A., & Xia, Z. (2022). Manufacturing artificial bone allografts: a perspective. *Biomaterials translational*, *3*(1), 65.

[125] Bostrom, M. P., & Seigerman, D. A. (2005). The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS Journal®*, *1*(1), 9-18.

[126] Killington, K., Mafi, R., Mafi, P., & Khan, W. S. (2018). A systematic review of clinical studies investigating mesenchymal stem cells for fracture non-union and bone defects. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *13*(4), 284-291.

[127] Moshiri, A., & Oryan, A. (2012). Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: current concepts, approaches and concerns. *Hard Tissue*, *1*(2), 11.

[128] Gomes, K. U., Carlini, J. L., Biron, C., Rapoport, A., & Dedivitis, R. A. (2008). Use of allogeneic bone graft in maxillary reconstruction for installation of dental implants. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *66*(11), 2335-2338.

[129] Develioglu, H., Saraydin, S. U., & Kartal, U. (2009). The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental materials journal*, *28*(4), 396-400.

[130] Oryan, A., Moshiri, A., Parizi, A. H. M., & Jahromi, A. R. (2012). Repeated administration of exogenous Sodium-hyaluronate improved tendon healing in an in vivo transection model. *Journal of Tissue Viability*, *21*(3), 88-102.

[131] Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*, *9*, 1-27.

[132] Perić Kačarević, Z., Kavehei, F., Houshmand, A., Franke, J., Smeets, R., Rimashevskiy, D., Wenisch, S., Schnettler, R., Jung, Ole., & Barbeck, M. (2018). Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *The International journal of artificial organs*, *41*(11), 789-800.

[133] Cancedda, R., Mastrogiacomo, M., Bianchi, G., Derubeis, A., Muraglia, A., & Quarto, R. (2003, March). Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. In *Tissue Engineering of Cartilage and Bone: Novartis Foundation Symposium 249* (Vol. 249, pp. 133-147). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

[134] Miguez-Pacheco, V., Hench, L. L., & Boccaccini, A. R. (2015). Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. *Acta biomaterialia*, *13*, 1-15.

[135] Toosi, S., Vahednia, E., & Behravan, J. (2016). Ream content a stem cell source for bone defects. *Stem Cells Transl Investig*, *3*, e1380.

[136] Toosi, S., Naderi-Meshkin, H., Kalalinia, F., Peivandi, M. T., HosseinKhani, H., Bahrami, A. R., Heirani-Tabasi, Asieh., Mirahmadi, M., & Behravan, J. (2016). PGA-incorporated collagen: Toward a biodegradable composite scaffold for bone-tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *104*(8), 2020-2028.

[137] Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, *36*(3), S20-S27.

[138] Finkemeier, C. G. (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *JBJS*, *84*(3), 454-464.

[139] Mistry, A. S., & Mikos, A. G. (2005). Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Regenerative medicine Ii: clinical and preclinical applications*, 1-22.

[140] Nerem, R. M., & Sambanis, A. (1995). Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue engineering*, *1*(1), 3-13.

[141] Nerem, R. M. (2003). Role of mechanics in vascular tissue engineering. *Biorheology*, *40*(1-3), 281-287.

[142] Ahsan, T., & Nerem, R. M. (2005). Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthodontics & craniofacial research*, *8*(3), 134-140.

[143] Ciuffi, S., Zonefrati, R., & Brandi, M. L. (2017). Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, *14*(2), 217.

[144] Raulo, B. C., Dash, C., Rath, S., Chakrabarty, S., Rautray, P., Sahoo, J., & Padhy, R. N. (2012). Use of bone marrow derived stem cells in a fracture non-union. *Journal of Acute Disease*, *1*(2), 156-158.

[145] Shao, J., Zhang, W., & Yang, T. (2015). Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biological research*, *48*, 1-7.

[146] Agacayak, S., Gulsun, B., Ucan, M. C., Karaoz, E., & Nergiz, Y. (2012). Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, *16*(5).

[147] Virk, M. S., & Lieberman, J. R. (2012). Biologic adjuvants for fracture healing. *Arthritis research & therapy*, *14*, 1-13.

[148] Liu, X., & Ma, P. X. (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, *32*, 477-486.

[149] Ma, P. X. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, *60*(2), 184-198.

[150] Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *27*(18), 3413-3431.

[151] Zhang, R., & Ma, P. X. (1999). Porous poly (l-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, *45*(4), 285-293.

[152] Blaker, J. J., Maquet, V., Jérôme, R., Boccaccini, A. R., & Nazhat, S. N. (2005). Mechanical properties of highly porous PDLLA/Bioglass® composite foams as scaffolds for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, *1*(6), 643-652.

[153] Wu, L., & Ding, J. (2004). In vitro degradation of three-dimensional porous poly (D, L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, *25*(27), 5821-5830.

[154] Ma, P. X., & Zhang, R. (1999). Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, *46*(1), 60-72.

[155] Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, *4*(7), 518-524.

[156] Burdick, J. A., & Anseth, K. S. (2002). Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *23*(22), 4315-4323.

[157] Wei, G., & Ma, P. X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *25*(19), 4749-4757.

[158] Gao, C., Peng, S., Feng, P., & Shuai, C. (2017). Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone research*, *5*(1), 1-33.

[159] Ogose, A., Kondo, N., Umezu, H., Hotta, T., Kawashima, H., Tokunaga, K., Ito, T., Kudo, N., Hoshino, M., Gu, W., & Endo, N. (2006). Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion®) in human bones. *Biomaterials*, *27*(8), 1542-1549.

[160] Yuan, J., Cui, L., Zhang, W. J., Liu, W., & Cao, Y. (2007). Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, *28*(6), 1005-1013.

[161] Saito, A., Suzuki, Y., Kitamura, M., Ogata, S. I., Yoshihara, Y., Masuda, S., Ohtsuki, C., Tanihara, M., & Tanihara, M. (2006). Repair of 20-mm long rabbit radial bone defects using BMP-derived peptide combined with an α-tricalcium phosphate scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *77*(4), 700-706.

[162] Eliaz, N., & Metoki, N. (2017). Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, *10*(4), 334.

[163] Bohner, M. (2000). Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, *31*, D37-D47.

[164] Fleming, J. E., Cornell, C. N., & Muschler, G. F. (2000). Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthopedic Clinics*, *31*(3), 357-374.

[165] Izquierdo-Barba, I., Salinas, A. J., & Vallet-Regí, M. (2013). Bioactive glasses: from macro to nano. *International Journal of Applied Glass Science*, *4*(2), 149-161.

[166] Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *17*(11), 967-978.

[167] Pamula, E., Kokoszka, J., Cholewa-Kowalska, K., Laczka, M., Kantor, L., Niedzwiedzki, L., Reilly, G. C., Filipowska, J., Madej, W., Kolodziejczyk, M., Tylko, G., & Osyczka, A. M. (2011). Degradation, bioactivity, and osteogenic potential of composites made of PLGA and two different sol–gel bioactive glasses. *Annals of biomedical engineering*, *39*, 2114-2129.

[168] Filipowska, J., Pawlik, J., Cholewa-Kowalska, K., Tylko, G., Pamula, E., Niedzwiedzki, L., Szuta, M., Laczka, M., & Osyczka, A. M. (2014). Incorporation of sol–gel bioactive glass into PLGA improves mechanical properties and bioactivity of composite scaffolds and results in their osteoinductive properties. *Biomedical Materials*, *9*(6), 065001.

[169] Jodati, H., Yılmaz, B., & Evis, Z. (2020). A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceramics International*, *46*(10), 15725-15739.

[170] Ma, H., Feng, C., Chang, J., & Wu, C. (2018). 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta biomaterialia*, *79*, 37-59.

[171] Samavedi, S., Whittington, A. R., & Goldstein, A. S. (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta biomaterialia*, *9*(9), 8037-8045.

[172] Langdahl, B., Ferrari, S., & Dempster, D. W. (2016). Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, *8*(6), 225-235.

[173] Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R., & Gogia, A. K. (2009). Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants–a review. *Progress in materials science*, *54*(3), 397-425.

[174] Balamurugan, A., Rajeswari, S., Balossier, G., Rebelo, A. H. S., & Ferreira, J. M. F. (2008). Corrosion aspects of metallic implants—An overview. *Materials and corrosion*, *59*(11), 855-869.

[175] Izquierdo-Barba, I., Santos-Ruiz, L., Becerra, J., Feito, M. J., Fernández-Villa, D., Serrano, M. C., Díaz-Güemes, I., Fernández-Tomé, B., Enciso, S., Sánchez-Margallo, F. M., Monopoli, D., Afonso, H., Portolés, M. T., Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2019). Synergistic effect of Si-hydroxyapatite coating and VEGF adsorption on Ti6Al4V-ELI scaffolds for

bone regeneration in an osteoporotic bone environment. *Acta Biomaterialia*, *83*, 456-466.

[176] Xu, W., Tian, J., Liu, Z., Lu, X., Hayat, M. D., Yan, Y., Li, Z., Qu, X., & Wen, C. (2019). Novel porous Ti35Zr28Nb scaffolds fabricated by powder metallurgy with excellent osteointegration ability for bone-tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, *105*, 110015.

[177] Wang, S., Liu, L., Li, K., Zhu, L., Chen, J., & Hao, Y. (2019). Pore functionally graded Ti6Al4V scaffolds for bone tissue engineering application. *Materials & Design*, *168*, 107643.

[178] Peng, Q., Huang, Y., Zhou, L., Hort, N., & Kainer, K. U. (2010). Preparation and properties of high purity Mg–Y biomaterials. *Biomaterials*, *31*(3), 398-403.

[179] Seal, B. L., Otero, T. C., & Panitch, A. J. M. S. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, *34*(4-5), 147-230.

[180] Montalbano, G., Molino, G., Fiorilli, S., & Vitale-Brovarone, C. (2020). Synthesis and incorporation of rod-like nano-hydroxyapatite into type I collagen matrix: A hybrid formulation for 3D printing of bone scaffolds. *Journal of the European Ceramic Society*, *40*(11), 3689-3697.

[181] Sonia, T. A., & Sharma, C. P. (2012). An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug discovery today*, *17*(13-14), 784-792.

[182] Vozzi, G., Flaim, C., Ahluwalia, A., & Bhatia, S. (2003). Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. *Biomaterials*, *24*(14), 2533-2540.

[183] Melo, P., Naseem, R., Corvaglia, I., Montalbano, G., Pontremoli, C., Azevedo, A., Quadros, P., Gentile, P., Ferreira, A. M., Dalgarno, K., Vitale-Brovarone, C., & Fiorilli, S. (2020). Processing of sr2+ containing poly l-lactic acid-based hybrid composites for additive manufacturing of bone scaffolds. *Frontiers in Materials*, *7*, 601645.

[184] Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., & Jing, X. (2012). Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, *37*(2), 237-280.

[185] Asti, A., & Gioglio, L. (2014). Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *The International journal of artificial organs*, *37*(3), 187-205.

[186] de Gracia Lux, C., Joshi-Barr, S., Nguyen, T., Mahmoud, E., Schopf, E., Fomina, N., & Almutairi, A. (2012). Biocompatible polymeric nanoparticles degrade and release cargo in response to biologically relevant levels of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(38), 15758-15764.

[187] Feng, P., Wu, P., Gao, C., Yang, Y., Guo, W., Yang, W., & Shuai, C. (2018). A multimaterial scaffold with tunable properties: toward bone tissue repair. *Advanced science*, *5*(6), 1700817.

[188] Koushik, T. M., Miller, C. M., & Antunes, E. (2023). Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds. *Advanced healthcare materials*, *12*(9), 2202766.

[189] Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., & Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive materials*, *3*(3), 278-314.

[190] White, A. A., & Best, S. M. (2009). Properties and characterisation of bone repair materials. In *Bone repair biomaterials* (pp. 121-153). Woodhead Publishing.

[191] Tariverdian, T., Sefat, F., Gelinsky, M., & Mozafari, M. (2019). Scaffold for bone tissue engineering. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One* (pp. 189-209). Woodhead Publishing.

[192] Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, *26*(27), 5474-5491.

[193] Marew, T., & Birhanu, G. (2021). Three dimensional printed nanostructure biomaterials for bone tissue engineering. *Regenerative Therapy*, *18*, 102-111.

[194] Bose, S., Vahabzadeh, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials today*, *16*(12), 496-504.

[195] Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., & Moradi, A. (2018). Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. *Archives of bone and joint surgery*, *6*(2), 90.

[196] Webster, T. J., Siegel, R. W., & Bizios, R. (1999). Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*, *20*(13), 1221-1227.

[197] Wu, C., Zhou, Y., Xu, M., Han, P., Chen, L., Chang, J., & Xiao, Y. (2013). Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials*, *34*(2), 422-433.

[198] Min, Z., Shichang, Z., Chen, X., Yufang, Z., & Changqing, Z. (2015). 3D-printed dimethyloxallyl glycine delivery scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis. *Biomaterials science*, *3*(8), 1236-1244.

[199] Stuckensen, K., Schwab, A., Knauer, M., Muiños-López, E., Ehlicke, F., Reboredo, J., Granero-Moltó, F., Gbureck, U., Prósper, F., Walles, H., & Groll, J. (2018). Tissue mimicry in morphology and composition promotes hierarchical matrix remodeling of invading

stem cells in osteochondral and meniscus scaffolds. *Advanced Materials*, *30*(28), 1706754.

[200] Pina, S., Ribeiro, V. P., Marques, C. F., Maia, F. R., Silva, T. H., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2019). Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Materials*, *12*(11), 1824.

[201] Xu, H., Cui, W., & Chang, J. (2013). Fabrication of patterned PDLLA/PCL composite scaffold by electrospinning. *Journal of applied polymer science*, *127*(3), 1550-1554.

[202] Martin, R. A., Yue, S., Hanna, J. V., Lee, P. D., Newport, R. J., Smith, M. E., & Jones, J. R. (2012). Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol–gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *370*(1963), 1422-1443.

[203] Román, J., Cabanas, M. V., Pena, J., & Vallet-Regí, M. (2011). Control of the pore architecture in three-dimensional hydroxyapatite-reinforced hydrogel scaffolds. *Science and Technology of Advanced Materials*, *12*(4), 045003.

[204] Jones, J. R., Lee, P. D., & Hench, L. L. (2006). Hierarchical porous materials for tissue engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *364*(1838), 263-281.

[205] Sánchez-Salcedo, S., Nieto, A., & Vallet-Regí, M. (2008). Hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. *Chemical engineering journal*, *137*(1), 62-71.

[206] Kumar, A., Mandal, S., Barui, S., Vasireddi, R., Gbureck, U., Gelinsky, M., & Basu, B. (2016). Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, *103*, 1-39.

[207] Wang, L. F., Rhim, J. W., & Hong, S. I. (2016). Preparation of poly (lactide)/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application. *LWT-Food Science and Technology*, *68*, 454-461.

[208] Fereshteh, Z. (2018). Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. In *Functional 3D tissue engineering scaffolds* (pp. 151-174). Woodhead Publishing.

[209] Thadavirul, N., Pavasant, P., & Supaphol, P. (2014). Development of polycaprolactone porous scaffolds by combining solvent casting, particulate leaching, and polymer leaching techniques for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part A*, *102*(10), 3379-3392.

[210] Lu, T., Li, Y., & Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 337-350.

[211] Kim, T. G., Shin, H., & Lim, D. W. (2012). Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Advanced Functional Materials*, *22*(12), 2446-2468.

[212] Jazayeri, H. E., Rodriguez-Romero, M., Razavi, M., Tahriri, M., Ganjawalla, K., Rasoulianboroujeni, M., Malekoshoaraie, M. H., Khoshroo, K., & Tayebi, L. (2018). The cross-disciplinary emergence of 3D printed bioceramic scaffolds in orthopedic bioengineering. *Ceramics International*, *44*(1), 1-9.

[213] McFarland, M., & Antunes, E. (2019). Small-scale static fire tests of 3D printing hybrid rocket fuel grains produced from different materials. *Aerospace*, *6*(7), 81.

[214] Liu, G., Zhang, X., Chen, X., He, Y., Cheng, L., Huo, M., Yin, J., Hao, F., Chen, S., Wang, P., Yi, S., Wan, L., Mao, Z., Chen, Z., Wang, X., Cao, Z., & Lu, J. (2021). Additive manufacturing of structural materials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, *145*, 100596.

[215] Salah, M., Tayebi, L., Moharamzadeh, K., & Naini, F. B. (2020). Three-dimensional bio-printing and bone tissue engineering: technical innovations and potential applications in maxillofacial reconstructive surgery. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*, *42*, 1-9.

[216] Wang, C., Huang, W., Zhou, Y., He, L., He, Z., Chen, Z., He, X., Tian, S., Liao, J., Lu, B., Wei, Y., & Wang, M. (2020). 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive materials*, *5*(1), 82-91.

[217] Costa, J. B., Park, J., Jorgensen, A. M., Silva-Correia, J., Reis, R. L., Oliveira, J. M., Atala, A., Yoo, J. J., & Lee, S. J. (2020). 3D bioprinted highly elastic hybrid constructs for advanced fibrocartilaginous tissue regeneration. *Chemistry of Materials*, *32*(19), 8733-8746.

[218] Gao, G., Kim, B. S., Jang, J., & Cho, D. W. (2019). Recent strategies in extrusion-based three-dimensional cell printing toward organ biofabrication. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *5*(3), 1150-1169.

[219] Vaezi, M., Zhong, G., Kalami, H., & Yang, S. (2018). Extrusion-based 3D printing technologies for 3D scaffold engineering. In *Functional 3D tissue engineering scaffolds* (pp. 235-254). Woodhead Publishing.

[220] Guillemot, F., Souquet, A., Catros, S., & Guillotin, B. (2010). Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine*, *5*(3), 507-515.

[221] Hadisi, Z., Walsh, T., Hossein Dabiri, S. M., Seyfoori, A., Godeau, B., Charest, G., Fortin, D., & Akbari, M. (2020). 3D printing for the future of medicine. *Journal of 3D printing in medicine*, *4*(1), 45-67.

[222] Matai, I., Kaur, G., Seyedsalehi, A., McClinton, A., & Laurencin, C. T. (2020). Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, *226*, 119536.

[223] Kačarević, Ž. P., Rider, P. M., Alkildani, S., Retnasingh, S., Smeets, R., Jung, O., Ivanišević, Z., & Barbeck, M. (2018). An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. *Materials*, *11*(11), 2199.

[224] Guo, Y., Patanwala, H. S., Bognet, B., & Ma, A. W. (2017). Inkjet and inkjet-based 3D printing: connecting fluid properties and printing performance. *Rapid Prototyping Journal*, *23*(3), 562-576.

[225] Xu, T., Zhao, W., Zhu, J. M., Albanna, M. Z., Yoo, J. J., & Atala, A. (2013). Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, *34*(1), 130-139.

[226] Miri, A. K., Mirzaee, I., Hassan, S., Oskui, S. M., Nieto, D., Khademhosseini, A., & Zhang, Y. S. (2019). Effective bioprinting resolution in tissue model fabrication. *Lab on a Chip*, *19*(11).

[227] Li, J., Rossignol, F., & Macdonald, J. (2015). Inkjet printing for biosensor fabrication: combining chemistry and technology for advanced manufacturing. *Lab on a Chip*, *15*(12), 2538-2558.

[228] Melchels, F. P., Feijen, J., & Grijpma, D. W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, *31*(24), 6121-6130.

[229] Kumar, H., & Kim, K. (2020). Stereolithography 3D bioprinting. *3D Bioprinting: Principles and Protocols*, 93-108.

[230] Luo, Y., Pan, H., Jiang, J., Zhao, C., Zhang, J., Chen, P., Lin, X., & Fan, S. (2020). Desktop-stereolithography 3D printing of a polyporous extracellular matrix bioink for bone defect regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 589094.

[231] Madrid, A. P. M., Vrech, S. M., Sanchez, M. A., & Rodriguez, A. P. (2019). Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, *100*, 631-644.

[232] Anandakrishnan, N., Ye, H., Guo, Z., Chen, Z., Mentkowski, K. I., Lang, J. K., Rajabian, N., Andreadis, S. T., Ma, Z., Spernyak, J. A., Lovell, J. F., Wang, D., Xia, J., Zhou, C., & Zhao, R. (2021). Fast stereolithography printing of large-scale biocompatible hydrogel models. *Advanced healthcare materials*, *10*(10), 2002103.

[233] Maia, F. R., Bastos, A. R., Oliveira, J. M., Correlo, V. M., & Reis, R. L. (2022). Recent approaches towards bone tissue engineering. *Bone*, *154*, 116256.

[234] Fina, F., Madla, C. M., Goyanes, A., Zhang, J., Gaisford, S., & Basit, A. W. (2018). Fabricating 3D printed orally disintegrating printlets using selective laser sintering. *International journal of pharmaceutics*, *541*(1-2), 101-107.

[235] Kontogianni, G. I., Bonatti, A. F., De Maria, C., Naseem, R., Melo, P., Coelho, C., Vozzi, G., Dalgarno, K., Quadros, P., Vitale-Brovarone, C., & Chatzinikolaidou, M. (2023). Promotion of in vitro osteogenic activity by melt extrusion-based plla/pcl/phbv scaffolds enriched with nano-hydroxyapatite and strontium substituted nano-hydroxyapatite. *Polymers*, *15*(4), 1052.

[236] Melčová, V., Svoradová, K., Menčík, P., Kontárová, S., Rampichová, M., Hedvičáková, V., Sovková, V., Přikryl, R., & Vojtová, L. (2020). Fdm 3d printed composites for bone tissue engineering based on plasticized poly (3-hydroxybutyrate)/poly (d, l-lactide) blends. *Polymers*, *12*(12), 2806.

[237] Babilotte, J., Martin, B., Guduric, V., Bareille, R., Agniel, R., Roques, S., Héroguez, V., Dussauze, M., Gaudon, M., Le Nihouannen, D., & Catros, S. (2021). Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *118*, 111334.

[238] Jiao, Z., Luo, B., Xiang, S., Ma, H., Yu, Y., & Yang, W. (2019). 3D printing of HA/PCL composite tissue engineering scaffolds. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, *2*(4), 196-202.

[239] Schantz, J. T., Lim, T. C., Ning, C., Teoh, S. H., Tan, K. C., Wang, S. C., & Hutmacher, D. W. (2006). Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: technical case report. *Operative Neurosurgery*, *58*(1), ONS-E176.

[240] Silva, J. C., Carvalho, M. S., Udangawa, R. N., Moura, C. S., Cabral, J. M., L. da Silva, C., Ferreira, F. C., Vashishth, D., & Linhardt, R. J. (2020). Extracellular matrix decorated polycaprolactone scaffolds for improved mesenchymal stem/stromal cell osteogenesis towards a patient-tailored bone tissue engineering approach. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *108*(5), 2153-2166.

[241] Gryshkov, O., Mueller, M., Leal-Marin, S., Mutsenko, V., Suresh, S., Kapralova, V. M., & Glasmacher, B. (2019). Advances in the application of electrohydrodynamic fabrication for tissue engineering. *Journal of Physics: Conference Series, 1236*(1), 012024.

[242] Movahedi, M., Asefnejad, A., Rafienia, M., & Khorasani, M. T. (2020). Potential of novel electrospun core-shell structured polyurethane/starch (hyaluronic acid) nanofibers for skin tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation. *International journal of biological macromolecules*, *146*, 627-637.

[243] Gao, X., Han, S., Zhang, R., Liu, G., & Wu, J. (2019). Progress in electrospun composite nanofibers: composition, performance and applications for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, *7*(45), 7075-7089.

[244] Lin, W., Chen, M., Qu, T., Li, J., & Man, Y. (2020). Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *108*(4), 1311-1321.

[245] Norouzi, M. R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Itel, F., Schoeller, J., Fashandi, H., Borzi, A., Neels, A., Fortunato, G., & Rossi, R. M. (2022). Emulsion electrospinning of sodium alginate/poly (ε-caprolactone) core/shell nanofibers for biomedical applications. *Nanoscale Advances*, *4*(13), 2929-2941.

[246] Meamar, R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Norouzi, M. R., Siavash, M., Hamblin, M. R., & Fesharaki, M. (2021). Improved wound healing of diabetic foot ulcers using human placenta-derived mesenchymal stem cells in gelatin electrospun nanofibrous scaffolds plus a platelet-rich plasma gel: A randomized clinical trial. *International immunopharmacology*, *101*, 108282.

[247] Wang, S., Zhao, Y., Shen, M., & Shi, X. (2012). Electrospun hybrid nanofibers doped with nanoparticles or nanotubes for biomedical applications. *Therapeutic delivery*, *3*(10), 1155-1169.

[248] Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of electrostatics*, *35*(2-3), 151-160.

[249] Wang, X., Ding, B., Yu, J., & Wang, M. (2011). Engineering biomimetic superhydrophobic surfaces of electrospun nanomaterials. *Nano today*, *6*(5), 510-530.

[250] Reneker, D. H., Kataphinan, W., Theron, A., Zussman, E., & Yarin, A. L. (2002). Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. *Polymer*, *43*(25), 6785-6794.

[251] Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, *28*(3), 325-347.

[252] Bombin, A. D. J., Dunne, N. J., & McCarthy, H. O. (2020). Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing applications. *Materials Science and Engineering: C*, *114*, 110994.

[253] Baptista, A. C., Ferreira, I., & Borges, J. P. (2013). Electrospun fibers in composite materials for medical applications. *J. Compos. Biodegrad. Polym*, *1*, 56-65.

[254] Fu, W., Liu, Z., Feng, B., Hu, R., He, X., Wang, H., Yin, M., Huang, H., Zhang, H., & Wang, W. (2014). Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 2335-2344.

[255] Wang, S., Cao, X., Shen, M., Guo, R., Bányai, I., & Shi, X. (2012). Fabrication and morphology control of electrospun poly (γ-glutamic acid) nanofibers for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *89*, 254-264.

[256] Yu, D. G., Lu, P., Branford-White, C., Yang, J. H., & Wang, X. (2011). Polyacrylonitrile nanofibers prepared using coaxial electrospinning with LiCl solution as sheath fluid. *Nanotechnology*, *22*(43), 435301.

[257] Yu, D. G., Chatterton, N. P., Yang, J. H., Wang, X., & Liao, Y. Z. (2012). Coaxial Electrospinning with Triton X-100 Solutions as Sheath Fluids for Preparing PAN Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, *297*(5), 395-401.

[258] Zhang, Z., Hu, J., & Ma, P. X. (2012). Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Advanced drug delivery reviews*, *64*(12), 1129-1141.

[259] Li, Y., Lim, C. T., & Kotaki, M. (2015). Study on structural and mechanical properties of porous PLA nanofibers electrospun by channel-based electrospinning system. *Polymer*, *56*, 572-580.

[260] Yang, C., Yu, D. G., Pan, D., Liu, X. K., Wang, X., Bligh, S. A., & Williams, G. R. (2016). Electrospun pH-sensitive core–shell polymer nanocomposites fabricated using a tri-axial process. *Acta biomaterialia*, *35*, 77-86.

[261] Chen, H., Wang, N., Di, J., Zhao, Y., Song, Y., & Jiang, L. (2010). Nanowire-in-microtube structured core/shell fibers via multifluidic coaxial electrospinning. *Langmuir*, *26*(13), 11291-11296.

[262] Li, D., Wang, Y., & Xia, Y. (2003). Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano letters*, *3*(8), 1167-1171.

[263] Teo, W. E., Kotaki, M., Mo, X. M., & Ramakrishna, S. (2005). Porous tubular structures with controlled fibre orientation using a modified electrospinning method. *Nanotechnology*, *16*(6), 918.

[264] Theron, A., Zussman, E., & Yarin, A. L. (2001). Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, *12*(3), 384.

[265] Wang, X., Niu, H., Lin, T., & Wang, X. (2009). Needleless electrospinning of nanofibers with a conical wire coil. *Polymer Engineering & Science*, *49*(8), 1582-1586.

[266] Wang, X., Gittens, R. A., Song, R., Tannenbaum, R., Olivares-Navarrete, R., Schwartz, Z., Chen, H., & Boyan, B. D. (2012). Effects of structural properties of electrospun TiO2 nanofiber meshes on their osteogenic potential. *Acta Biomaterialia*, *8*(2), 878-885.

[267] Carnell, L. S., Siochi, E. J., Wincheski, R. A., Holloway, N. M., & Clark, R. L. (2009). Electric field effects on fiber alignment using an auxiliary electrode during electrospinning. *Scripta Materialia*, *60*(6), 359-361.

[268] Yang, D., Lu, B., Zhao, Y., & Jiang, X. (2007). Fabrication of aligned fibrous arrays by magnetic electrospinning. *Advanced materials*, *19*(21), 3702-3706.

[269] Agarwal, S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, *49*(26), 5603-5621.

[270] Jayakumar, R., Prabaharan, M., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology advances*, *28*(1), 142-150.

[271] Yoo, H. S., Kim, T. G., & Park, T. G. (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, *61*(12), 1033-1042.

[272] Holzwarth, J. M., & Ma, P. X. (2011). Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *32*(36), 9622-9629.

[273] Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*, *23*(1), 47-55.

[274] Khosravi, A., Ghasemi-Mobarakeh, L., Mollahosseini, H., Ajalloueian, F., Masoudi Rad, M., Norouzi, M. R., Jokandan, M. S., Khoddami, A., & Chronakis, I. S. (2018). Immobilization of silk fibroin on the surface of PCL nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *135*(37), 46684.

[275] Tierney, C. M., Haugh, M. G., Liedl, J., Mulcahy, F., Hayes, B., & O'Brien, F. J. (2009). The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, *2*(2), 202-209.

[276] Adamiak, K., & Sionkowska, A. (2020). Current methods of collagen cross-linking. *International Journal of Biological Macromolecules*, *161*, 550-560.

[277] Weadock, K. S., Miller, E. J., Bellincampi, L. D., Zawadsky, J. P., & Dunn, M. G. (1995). Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *Journal of biomedical materials research*, *29*(11), 1373-1379.

[278] Nong, L. M., Zhou, D., Zheng, D., Jiang, Y. Q., Xu, N. W., Zhao, G. Y., Wei, H., Zhou, S. Y., Han, H., & Han, L. (2019). The effect of different cross-linking conditions of EDC/NHS on type II collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell and Tissue Banking*, *20*, 557-568.

[279] Melo, P., Montalbano, G., Boggio, E., Gigliotti, C. L., Dianzani, C., Dianzani, U., Vitale-Brovarone, C., & Fiorilli, S. (2022). Electrospun Collagen Scaffold Bio-Functionalized with Recombinant ICOS-Fc: An Advanced Approach to Promote Bone Remodelling. *Polymers*, *14*(18), 3780.

[280] Dalgic, A. D., Atila, D., Karatas, A., Tezcaner, A., & Keskin, D. (2019). Diatom shell incorporated PHBV/PCL-pullulan co-electrospun scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *100*, 735-746.

[281] Toloue, E. B., Karbasi, S., Salehi, H., & Rafienia, M. (2019). Potential of an electrospun composite scaffold of poly (3-hydroxybutyrate)-chitosan/alumina nanowires in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, *99*, 1075-1091.

[282] Ranganathan, S., Balagangadharan, K., & Selvamurugan, N. (2019). Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, *133*, 354-364.

[283] Lin, W., Chen, M., Qu, T., Li, J., & Man, Y. (2020). Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *108*(4), 1311-1321.

[284] Xu, T., Miszuk, J. M., Zhao, Y., Sun, H., & Fong, H. (2015). Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering. *Advanced healthcare materials*, *4*(15), 2238-2246.

[285] Tomasina, C., Montalbano, G., Fiorilli, S., Quadros, P., Azevedo, A., Coelho, C., Vitale-Brovarone, C., Camarero-Espinosa, S., & Moroni, L. (2023). Incorporation of strontium-containing bioactive particles into PEOT/PBT electrospun scaffolds for bone tissue regeneration. *Biomaterials Advances*, *149*, 213406.

[286] Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., Taylor, J., & Nino, J. C. (2006). Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems. *Journal of the American Ceramic Society*, *89*(2), 395-407.

[287] Yoshimoto, H., Shin, Y. M., Terai, H., & Vacanti, J. P. (2003). A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *24*(12), 2077-2082.

[288] Chen, S., Carlson, M. A., Li, X., Siddique, A., Zhu, W., & Xie, J. (2021). Minimally invasive delivery of 3D shape recoverable constructs with ordered structures for tissue repair. *ACS biomaterials science & engineering*, *7*(6), 2204-2211.

[289] Farag, M. M. (2023). Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications. *Journal of Materials Science*, *58*(2), 527-558.

[290] Jang, J. W., Min, K. E., Kim, C., Shin, J., Lee, J., & Yi, S. (2023). Scaffold characteristics, fabrication methods, and biomaterials for the bone tissue engineering. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, *24*(3), 511-529.

[291] Basmanav, F. B., Kose, G. T., & Hasirci, V. (2008). Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *29*(31), 4195-4204.

[292] Wei, G., Jin, Q., Giannobile, W. V., & Ma, P. X. (2007). The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials*, *28*(12), 2087-2096.

[293] Johnson, C. T., & García, A. J. (2015). Scaffold-based anti-infection strategies in bone repair. *Annals of biomedical engineering*, *43*, 515-528.

[294] Mouriño, V., & Boccaccini, A. R. (2010). Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *Journal of the Royal Society Interface*, *7*(43), 209-227.

[295] Dang, M., Koh, A. J., Jin, X., McCauley, L. K., & Ma, P. X. (2017). Local pulsatile PTH delivery regenerates bone defects via enhanced bone remodeling in a cell-free scaffold. *Biomaterials*, *114*, 1-9.

[296] Virdi, A. S., Liu, M., Sena, K., Maletich, J., McNulty, M., Ke, H. Z., & Sumner, D. R. (2012). Sclerostin antibody increases bone volume and enhances implant fixation in a rat model. *JBJS*, *94*(18), 1670-1680.

[297] Zhang, X., Li, Y., Chen, Y. E., Chen, J., & Ma, P. X. (2016). Cell-free 3D scaffold with two-stage delivery of miRNA-26a to regenerate critical-sized bone defects. *Nature communications*, *7*(1), 10376.

[298] Dang, M., Saunders, L., Niu, X., Fan, Y., & Ma, P. X. (2018). Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone research*, *6*(1), 25.

[299] Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, *126*(4), 677-689.

[300] Garcia-Gonzalez, D., Moreno, M. A., Valencia, L., Arias, A., & Velasco, D. (2021). Influence of elastomeric matrix and particle volume fraction on the mechanical response of magneto-active polymers. *Composites Part B: Engineering*, *215*, 108796.

[301] Moreno-Mateos, M. A., Gonzalez-Rico, J., Nunez-Sardinha, E., Gomez-Cruz, C., Lopez-Donaire, M. L., Lucarini, S., Arias, A., Muñoz-Barrutia, A, Velasco, D., & Garcia-Gonzalez, D. (2022). Magneto-mechanical system to reproduce and quantify complex strain patterns in biological materials. *Applied Materials Today*, *27*, 101437.

[302] Prè, D., Ceccarelli, G., Visai, L., Benedetti, L., Imbriani, M., De Angelis, M. C., & Magenes, G. (2013). High-frequency vibration treatment of human bone marrow stromal cells increases differentiation toward bone tissue. *Bone marrow research*, *2013*.

[303] Huang, C., & Ogawa, R. (2012). Effect of hydrostatic pressure on bone regeneration using human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, *18*(19-20), 2106-2113.

[304] Baumgartner, W., Schneider, I., Hess, S. C., Stark, W. J., Märsmann, S., Brunelli, M., Calcagni, M., Cinelli, P., & Buschmann, J. (2018). Cyclic uniaxial compression of human stem cells seeded on a bone biomimetic nanocomposite decreases anti-osteogenic commitment evoked by shear stress. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, *83*, 84-93.

[305] Li, R., Liang, L., Dou, Y., Huang, Z., Mo, H., Wang, Y., & Yu, B. (2015). Mechanical strain regulates osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *BioMed research international*, *2015*.

[306] Dash, S. K., Sharma, V., Verma, R. S., & Das, S. K. (2020). Low intermittent flow promotes rat mesenchymal stem cell differentiation in logarithmic fluid shear device. *Biomicrofluidics*, *14*(5).

[307] Cashion, A. T., Caballero, M., Halevi, A., Pappa, A., Dennis, R. G., & van Aalst, J. A. (2014). Programmable mechanobioreactor for exploration of the effects of periodic vibratory stimulus on mesenchymal stem cell differentiation. *BioResearch open access*, *3*(1), 19-28.

[308] Tsimbouri, P. M., Childs, P. G., Pemberton, G. D., Yang, J., Jayawarna, V., Orapiriyakul, W., Burgess, K., González-García, C., Blackburn, G., Thomas, D., Vallejo-Giraldo, C., Biggs, M. J. P., Curtis, A. S. G., Salmerón-Sánchez, M., Reid, S., & Dalby, M. J. (2017). Stimulation of 3D osteogenesis by mesenchymal stem cells using a nanovibrational bioreactor. *Nature Biomedical Engineering*, *1*(9), 758-770.

[309] Creecy, C. M., O'Neill, C. F., Arulanandam, B. P., Sylvia, V. L., Navara, C. S., & Bizios, R. (2013). Mesenchymal stem cell osteodifferentiation in response to alternating electric current. *Tissue Engineering Part A*, *19*(3-4), 467-474.

[310] Murillo, G., Blanquer, A., Vargas-Estevez, C., Barrios, L., Ibáñez, E., Nogués, C., & Esteve, J. (2017). Electromechanical nanogenerator–cell interaction modulates cell activity. *Advanced Materials*, *29*(24), 1605048.

[311] Santos, L. J., Reis, R. L., & Gomes, M. E. (2015). Harnessing magnetic-mechano actuation in regenerative medicine and tissue engineering. *Trends in biotechnology*, *33*(8), 471-479.

[312] Mitragotri, S., & Lahann, J. (2009). Physical approaches to biomaterial design. *Nature materials*, *8*(1), 15-23.

[313] Li, L., Eyckmans, J., & Chen, C. S. (2017). Designer biomaterials for mechanobiology. *Nature materials*, *16*(12), 1164-1168.

[314] Li, Z., Gong, Y., Sun, S., Du, Y., Lü, D., Liu, X., & Long, M. (2013). Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, *34*(31), 7616-7625.

[315] Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K., & Lynch, S. E. (2003). Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *Journal of periodontology*, *74*(9), 1282-1292.

[316] Lieberman, J. R., Daluiski, A., & Einhorn, T. A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *JBJS*, *84*(6), 1032-1044.

[317] Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, *30*(10), 546-554.

[318] Chen, J. H., Liu, C., You, L., & Simmons, C. A. (2010). Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *Journal of biomechanics*, *43*(1), 108-118.

[319] Fritton, S. P., & Weinbaum, S. (2009). Fluid and solute transport in bone: flow-induced mechanotransduction. *Annual review of fluid mechanics*, *41*, 347-374.

[320] Dobner, S., Amadi, O. C., & Lee, R. T. (2012). Cardiovascular mechanotransduction. In *Muscle* (pp. 173-186). Academic Press.

[321] Yin, J., & Kuebler, W. M. (2010). Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. *Cell biochemistry and biophysics*, *56*, 1-18.

[322] Davis, M. J., Earley, S., Li, Y. S., & Chien, S. (2023). Vascular mechanotransduction. *Physiological reviews*, *103*(2), 1247-1421.

[323] Fettiplace, R., & Kim, K. X. (2014). The physiology of mechanoelectrical transduction channels in hearing. *Physiological reviews*, *94*(3), 951-986.

[324] Woo, S. H., Lukacs, V., De Nooij, J. C., Zaytseva, D., Criddle, C. R., Francisco, A., Jessell, T. M., Wilkinson, K. A., & Patapoutian, A. (2015). Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nature neuroscience*, *18*(12), 1756-1762.

[325] Ziolkowski, L. H., Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2023). Mechanotransduction events at the physiological site of touch detection. *Elife*, *12*, e84179.

[326] Schrenk-Siemens, K., Wende, H., Prato, V., Song, K., Rostock, C., Loewer, A., Utikal, J., Lewin, G. R., Lechner, S. G., & Siemens, J. (2015). PIEZO2 is required for

mechanotransduction in human stem cell–derived touch receptors. *Nature neuroscience*, *18*(1), 10-16.

[327] Fernandez-Sanchez, M. E., Brunet, T., Röper, J. C., & Farge, E. (2015). Mechanotransduction's impact on animal development, evolution, and tumorigenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, *31*, 373-397.

[328] Mascharak, S., Talbott, H. E., Januszyk, M., Griffin, M., Chen, K., Davitt, M. F., Demeter, J., Henn, D., Bonham, C. A., Foster, S. S., Mooney, N., Cheng, R., Jackson, P. K., Wan, D. C., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2022). Multi-omic analysis reveals divergent molecular events in scarring and regenerative wound healing. *Cell Stem Cell*, *29*(2), 315-327.

[329] Marinval, N., & Chew, S. Y. (2021). Mechanotransduction assays for neural regeneration strategies: A focus on glial cells. *APL bioengineering*, *5*(2).

[330] Long, Y., Niu, Y., Liang, K., & Du, Y. (2022). Mechanical communication in fibrosis progression. *Trends in Cell Biology*, *32*(1), 70-90.

[331] Zhu, P., Lu, H., Wang, M., Chen, K., Chen, Z., & Yang, L. (2023). Targeted mechanical forces enhance the effects of tumor immunotherapy by regulating immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Medicine*, *20*(1), 44.

[332] Choi, J. U. A., Kijas, A. W., Lauko, J., & Rowan, A. E. (2022). The mechanosensory role of osteocytes and implications for bone health and disease states. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 770143.

[333] Solidum, J. G. N., Jeong, Y., Heralde, F., & Park, D. (2023). Differential regulation of skeletal stem/progenitor cells in distinct skeletal compartments. *Frontiers in Physiology*, *14*, 1137063.

[334] Wang, L., You, X., Zhang, L., Zhang, C., & Zou, W. (2022). Mechanical regulation of bone remodeling. *Bone Research*, *10*(1), 16.

[335] Huang, C., & Ogawa, R. (2010). Mechanotransduction in bone repair and regeneration. *The FASEB Journal*, *24*(10), 3625-3632.

[336] Zayzafoon, M., Gathings, W. E., & McDonald, J. M. (2004). Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. *Endocrinology*, *145*(5), 2421-2432.

[337] Hu, L. F., Li, J. B., Qian, A. R., Wang, F., & Shang, P. (2015). Mineralization initiation of MC3T3-E1 preosteoblast is suppressed under simulated microgravity condition. *Cell Biology International*, *39*(4), 364-372.

[338] Ontiveros, C., & McCabe, L. R. (2003). Simulated microgravity suppresses osteoblast phenotype, Runx2 levels and AP-1 transactivation. *Journal of cellular biochemistry*, *88*(3), 427-437.

[339] Vico, L., & Hargens, A. (2018). Skeletal changes during and after spaceflight. *Nature Reviews Rheumatology*, *14*(4), 229-245.

[340] Nicogossian, A. (2003). Medicine and space exploration. *The Lancet*, *362*, s8-s9.

[341] Takata, S., & Yasui, N. (2001). Disuse osteoporosis. *Journal of Medical Investigation*, *48*(3/4), 147-156.

[342] Qin, L., Liu, W., Cao, H., & Xiao, G. (2020). Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone research*, *8*(1), 23.

[343] Klein-Nulend, J., Bakker, A. D., Bacabac, R. G., Vatsa, A., & Weinbaum, S. (2013). Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone*, *54*(2), 182-190.

[344] Bonewald, L. F. (2006). Mechanosensation and transduction in osteocytes. *BoneKEy osteovision*, *3*(10), 7.

[345] Tan, S. D., Bakker, A. D., Semeins, C. M., Kuijpers-Jagtman, A. M., & Klein-Nulend, J. (2008). Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications*, *369*(4), 1150-1154.

[346] Matsuzaka, T., Matsugaki, A., & Nakano, T. (2021). Control of osteoblast arrangement by osteocyte mechanoresponse through prostaglandin E2 signaling under oscillatory fluid flow stimuli. *Biomaterials*, *279*, 121203.

[347] Ma, C., Geng, B., Zhang, X., Li, R., Yang, X., & Xia, Y. (2020). Fluid shear stress suppresses osteoclast differentiation in RAW264. 7 cells through extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) signaling pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *26*, e918370-1.

[348] Li, P., Bian, X., Liu, C., Wang, S., Guo, M., Tao, Y., & Huo, B. (2018). STIM1 and TRPV4 regulate fluid flow-induced calcium oscillation at early and late stages of osteoclast differentiation. *Cell calcium*, *71*, 45-52.

[349] Yourek, G., McCormick, S. M., Mao, J. J., & Reilly, G. C. (2010). Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regenerative medicine*, *5*(5), 713-724.

[350] Stavenschi, E., Labour, M. N., & Hoey, D. A. (2017). Oscillatory fluid flow induces the osteogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells: The effect of shear stress magnitude, frequency, and duration. *Journal of biomechanics*, *55*, 99-106.

[351] Batra, N., Burra, S., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Xia, X., Weber, G. F., DeSimone, D., Bonewald, L. F., Lafer, E. M., Sprague, E., Schwartz, M. A., & Jiang, J. X. (2012).

Mechanical stress-activated integrin α5β1 induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(9), 3359-3364.

[352] Li, Y. J., Batra, N. N., You, L., Meier, S. C., Coe, I. A., Yellowley, C. E., & Jacobs, C. R. (2004). Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation. *Journal of Orthopaedic Research*, *22*(6), 1283-1289.

[353] Watanabe-Takano, H., Ochi, H., Chiba, A., Matsuo, A., Kanai, Y., Fukuhara, S., Ito, N., Sako, K., Miyazaki, T., Tainaka, K., Harada, I., Sato, S., Sawada, Y., Minamino, N., Takeda, S., Ueda, H. R., Yasoda, A., & Mochizuki, N. (2021). Mechanical load regulates bone growth via periosteal Osteocrin. *Cell reports*, *36*(2).

[354] Duncan, R. L., & Turner, C. H. (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified tissue international*, *57*, 344-358.

[355] Xiao, Z., & Quarles, L. D. (2015). Physiological mechanisms and therapeutic potential of bone mechanosensing. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *16*, 115-129.

[356] Campbell, I. D., & Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(3), a004994.

[357] Sun, Z., Guo, S. S., & Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *Journal of Cell Biology*, *215*(4), 445-456.

[358] Cheah, M., & Andrews, M. R. (2018). Integrin activation: implications for axon regeneration. *Cells*, *7*(3), 20.

[359] Kong, F., Li, Z., Parks, W. M., Dumbauld, D. W., García, A. J., Mould, A. P., Humphries, M. J., & Zhu, C. (2013). Cyclic mechanical reinforcement of integrin–ligand interactions. *Molecular cell*, *49*(6), 1060-1068.

[360] Chen, W., Lou, J., Evans, E. A., & Zhu, C. (2012). Observing force-regulated conformational changes and ligand dissociation from a single integrin on cells. *Journal of Cell Biology*, *199*(3), 497-512.

[361] Strohmeyer, N., Bharadwaj, M., Costell, M., Fässler, R., & Müller, D. J. (2017). Fibronectin-bound α5β1 integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second. *Nature Materials*, *16*(12), 1262-1270.

[362] Oria, R., Wiegand, T., Escribano, J., Elosegui-Artola, A., Uriarte, J. J., Moreno-Pulido, C., Platzman, I., Delcanale, P., Albertazzi, L., Navajas, D., Trepat, X., García-Aznar, J. M., Cavalcanti-Adam, E. A., & Roca-Cusachs, P. (2017). Force loading explains spatial sensing of ligands by cells. *Nature*, *552*(7684), 219-224.

[363] Geoghegan, I. P., Hoey, D. A., & McNamara, L. M. (2019). Estrogen deficiency impairs integrin αvβ3-mediated mechanosensation by osteocytes and alters osteoclastogenic paracrine signalling. *Scientific reports*, *9*(1), 4654.

[364] Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, *330*(6000), 55-60.

[365] Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015). Mechanically activated ion channels. *Neuron*, *87*(6), 1162-1179.

[366] Martinac, B., & Poole, K. (2018). Mechanically activated ion channels. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *97*, 104-107.

[367] Zhang, G., Li, X., Wu, L., & Qin, Y. X. (2021). Piezo1 channel activation in response to mechanobiological acoustic radiation force in osteoblastic cells. *Bone research*, *9*(1), 16.

[368] Song, J., Liu, L., Lv, L., Hu, S., Tariq, A., Wang, W., & Dang, X. (2020). Fluid shear stress induces Runx-2 expression via upregulation of PIEZO1 in MC3T3-E1 cells. *Cell biology international*, *44*(7), 1491-1502.

[369] Sun, W., Chi, S., Li, Y., Ling, S., Tan, Y., Xu, Y., Jiang, F., Li, J., Liu, C., Zhong, G., Cao, D., Jin, X., Zhao, D., Gao, X., Liu, Z., Xiao, B., & Li, Y. (2019). The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation. *elife*, *8*, e47454.

[370] Geng, J., Liu, W., Zhou, H., Zhang, T., Wang, L., Zhang, M., Li, Y., Shen, B., Li, X & Xiao, B. (2020). A plug-and-latch mechanism for gating the mechanosensitive Piezo channel. *Neuron*, *106*(3), 438-451.

[371] Syeda, R., Florendo, M. N., Cox, C. D., Kefauver, J. M., Santos, J. S., Martinac, B., & Patapoutian, A. (2016). Piezo1 channels are inherently mechanosensitive. *Cell reports*, *17*(7), 1739-1746.

[372] Geng, J., Zhao, Q., Zhang, T., & Xiao, B. (2017). In touch with the mechanosensitive piezo channels: structure, ion permeation, and mechanotransduction. *Current topics in membranes*, *79*, 159-195.

[373] Mirvis, M., Stearns, T., & James Nelson, W. (2018). Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal*, *475*(14), 2329-2353.

[374] Chinipardaz, Z., Liu, M., Graves, D. T., & Yang, S. (2022). Role of primary cilia in bone and cartilage. *Journal of Dental Research*, *101*(3), 253-260.

[375] Malone, A. M., Anderson, C. T., Tummala, P., Kwon, R. Y., Johnston, T. R., Stearns, T., & Jacobs, C. R. (2007). Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a

calcium-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(33), 13325-13330.

[376] Xiao, Z., Zhang, S., Mahlios, J., Zhou, G., Magenheimer, B. S., Guo, D., Dallas, S. L., Maser, R., Calvet, J. P., Bonewald, L., & Quarles, L. D. (2006). Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(41), 30884-30895.

[377] Hoey, D. A., Kelly, D. J., & Jacobs, C. R. (2011). A role for the primary cilium in paracrine signaling between mechanically stimulated osteocytes and mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *412*(1), 182-187.

[378] Moore, E. R., Zhu, Y. X., Ryu, H. S., & Jacobs, C. R. (2018). Periosteal progenitors contribute to load-induced bone formation in adult mice and require primary cilia to sense mechanical stimulation. *Stem cell research & therapy*, *9*, 1-15.

[379] Coughlin, T. R., Voisin, M., Schaffler, M. B., Niebur, G. L., & McNamara, L. M. (2015). Primary cilia exist in a small fraction of cells in trabecular bone and marrow. *Calcified tissue international*, *96*, 65-72.

[380] Hoey, D. A., Chen, J. C., & Jacobs, C. R. (2012). The primary cilium as a novel extracellular sensor in bone. *Frontiers in endocrinology*, *3*, 27213.

[381] Mollazadeh, S., Fazly Bazzaz, B. S., & Kerachian, M. A. (2015). Role of apoptosis in pathogenesis and treatment of bone-related diseases. *Journal of orthopaedic surgery and research*, *10*, 1-7.

[382] Batra, N., Kar, R., & Jiang, J. X. (2012). Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1818*(8), 1909-1918.

[383] Civitelli, R. (2008). Cell–cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics*, *473*(2), 188-192.

[384] Loiselle, A. E., Jiang, J. X., & Donahue, H. J. (2013). Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*, *54*(2), 205-212.

[385] Sato, T., Verma, S., Andrade, C. D. C., Omeara, M., Campbell, N., Wang, J. S., Cetinbas, M., Lang, A., Ausk, B. J., Brooks, D. J., Sadreyev, R. I., Kronenberg, H. M., Lagares, D., Uda, Y., Pajevic, P. D., Bouxsein, M. L., Gross, T. S., & Wein, M. N. (2020). A FAK/HDAC5 signaling axis controls osteocyte mechanotransduction. *Nature communications*, *11*(1), 3282.

[386] Liu, L., Zong, C., Li, B., Shen, D., Tang, Z., Chen, J., Zheng, Q., Tong, X., Gao, C., & Wang, J. (2014). The interaction between β1 integrins and ERK1/2 in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under fluid shear stress modelled by

a perfusion system. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *8*(2), 85-96.

[387] Hamamura, K., Swarnkar, G., Tanjung, N., Cho, E., Li, J., Na, S., & Yokota, H. (2012). RhoA-mediated signaling in mechanotransduction of osteoblasts. *Connective Tissue Research*, *53*(5), 398-406.

[388] Lu, S., & Wang, Y. (2014). Single-cell imaging of mechanotransduction in endothelial cells. *Progress in molecular biology and translational science*, *126*, 25-51.

[389] Humphries, J. D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M. J., & Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of cell biology*, *179*(5), 1043-1057.

[390] Bertrand, A. A., Malapati, S. H., Yamaguchi, D. T., & Lee, J. C. (2020). The intersection of mechanotransduction and regenerative osteogenic materials. *Advanced healthcare materials*, *9*(20), 2000709.

[391] Burridge, K., & Wittchen, E. S. (2013). The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *Journal of Cell Biology*, *200*(1), 9-19.

[392] Uzer, G., Bas, G., Sen, B., Xie, Z., Birks, S., Olcum, M., McGrath, C., Styner, M., & Rubin, J. (2018). Sun-mediated mechanical LINC between nucleus and cytoskeleton regulates βcatenin nuclear access. *Journal of biomechanics*, *74*, 32-40.

[393] Zhou, T., Gao, B., Fan, Y., Liu, Y., Feng, S., Cong, Q., Zhang, X., Zhou, Y., Yadav, P. S., Lin, J., Wu, N., Zhao, L., Huang, D., Zhou, S., Su, P., & Yang, Y. (2020). Piezo1/2 mediate mechanotransduction essential for bone formation through concerted activation of NFAT-YAP1-ß-catenin. *Elife*, *9*, e52779.

[394] Zhang, X., Schwarz, E. M., Young, D. A., Puzas, J. E., Rosier, R. N., & O'Keefe, R. J. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *The Journal of clinical investigation*, *109*(11), 1405-1415.

[395] Arnsdorf, E. J., Tummala, P., & Jacobs, C. R. (2009). Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related β-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PloS one*, *4*(4), e5388.

[396] Kim, D. I., KC, B., & Roux, K. J. (2015). Making the LINC: SUN and KASH protein interactions. *Biological Chemistry*, *396*(4), 295-310.

[397] Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., & Forte, G. (2018). Cellular mechanotransduction: from tension to function. *Frontiers in physiology*, *9*, 378185.

[398] Kirby, T. J., & Lammerding, J. (2018). Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nature cell biology*, *20*(4), 373-381.

[399] Liashkovich, I., Meyring, A., Kramer, A., & Shahin, V. (2011). Exceptional structural and mechanical flexibility of the nuclear pore complex. *Journal of cellular physiology*, *226*(3), 675-682.

[400] Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A. E., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A. J., Oria, R., Kechagia, J. Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A. L., Shanahan, C. M., Trepat, X., Navajas, D., Garcia-Manyes, S., & Roca-Cusachs, P. (2017). Force triggers YAP nuclear entry by regulating transport across nuclear pores. *Cell*, *171*(6), 1397-1410.

[401] Kanno, T., Takahashi, T., Tsujisawa, T., Ariyoshi, W., & Nishihara, T. (2007). Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*, *101*(5), 1266-1277.

[402] Li, Y., Ge, C., & Franceschi, R. T. (2017). MAP Kinase-dependent RUNX2 phosphorylation is necessary for epigenetic modification of chromatin during osteoblast differentiation. *Journal of cellular physiology*, *232*(9), 2427-2435.

[403] Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrugghe, B., Nakashima, K., & Takayanagi, H. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature medicine*, *11*(8), 880-885.

[404] Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry*, *99*(5), 1233-1239.

[405] Marie, P. J. (2013). Targeting integrins to promote bone formation and repair. *Nature Reviews Endocrinology*, *9*(5), 288-295.

[406] Mulvaney, P. (2015). Nanoscience vs Nanotechnology— Defining the Field. *ACS nano*, *9*(3), 2215-2217.

[407] Mansoori, G. A., & Soelaiman, T. F. (2005). *Nanotechnology--An introduction for the standards community*. ASTM International.

[408] Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Res. J. Recent Sci*, *2277*, 2502.

[409] Damodharan, J. (2021). Nanomaterials in medicine–An overview. *Materials Today: Proceedings*, *37*, 383-385.

[410] Sim, S., & Wong, N. K. (2021). Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery. *Biomedical reports*, *14*(5), 1-9.

[411] Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical society reviews*, *35*(7), 583-592.

[412] Geoffrion, L. D., & Guisbiers, G. (2020). Quantum confinement: size on the grill!. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, *140*, 109320.

[413] Lines, M. G. (2008). Nanomaterials for practical functional uses. *Journal of Alloys and Compounds*, *449*(1-2), 242-245.

[414] Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, *2*(4), MR17-MR71.

[415] Gajanan, K., & Tijare, S. N. (2018). Applications of nanomaterials. *Materials Today: Proceedings*, *5*(1), 1093-1096.

[416] Bratovcic, A. (2019). Different applications of nanomaterials and their impact on the environment. *SSRG International Journal of Material Science and Engineering*, *5*(1), 1-7.

[417] Soares, S., Sousa, J., Pais, A., & Vitorino, C. (2018). Nanomedicine: principles, properties, and regulatory issues. *Frontiers in chemistry*, *6*, 356901.

[418] Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 262.

[419] Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, *65*(1), 36-48.

[420] Svenson, S., & Tomalia, D. A. (2012). Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced drug delivery reviews*, *64*, 102-115.

[421] Oh, K. T., Yin, H., Lee, E. S., & Bae, Y. H. (2007). Polymeric nanovehicles for anticancer drugs with triggering release mechanisms. *Journal of Materials Chemistry*, *17*(38), 3987-4001.

[422] Mulder, W. J., Strijkers, G. J., Van Tilborg, G. A., Cormode, D. P., Fayad, Z. A., & Nicolay, K. (2009). Nanoparticulate assemblies of amphiphiles and diagnostically active materials for multimodality imaging. *Accounts of chemical research*, *42*(7), 904-914.

[423] Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., & Kadam, V. (2010). Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *6*(6), 714-729.

[424] Millstone, J. E., Hurst, S. J., Métraux, G. S., Cutler, J. I., & Mirkin, C. A. (2009). Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *small*, *5*(6), 646-664.

[425] González, B., Ruiz-Hernández, E., Feito, M. J., de Laorden, C. L., Arcos, D., Ramírez-Santillán, C., Matesanz, C., Portolés, M. T., & Vallet-Regí, M. (2011). Covalently bonded dendrimer-maghemite nanosystems: Nonviral vectors for in vitro gene magnetofection. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(12), 4598-4604.

[426] Chavali, M. S., & Nikolova, M. P. (2019). Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. *SN applied sciences*, *1*(6), 607.

[427] Prato, M., Kostarelos, K., & Bianco, A. (2008). Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Accounts of chemical research*, *41*(1), 60-68.

[428] Cabañas, M. V., Lozano, D., Torres-Pardo, A., Sobrino, C., González-Calbet, J., Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2018). Features of aminopropyl modified mesoporous silica nanoparticles. Implications on the active targeting capability. *Materials Chemistry and Physics*, *220*, 260-269.

[429] Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2012). Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, *41*(7), 2590-2605.

[430] Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2020). Metal oxide nanoparticles as biomedical materials. *Biomimetics*, *5*(2), 27.

[431] Del Sol-Fernández, S., Martínez-Vicente, P., Gomollón-Zueco, P., Castro-Hinojosa, C., Gutiérrez, L., Fratila, R. M., & Moros, M. (2022). Magnetogenetics: remote activation of cellular functions triggered by magnetic switches. *Nanoscale*, *14*(6), 2091-2118.

[432] Hughes, S., El Haj, A. J., & Dobson, J. (2005). Magnetic micro-and nanoparticle mediated activation of mechanosensitive ion channels. *Medical engineering & physics*, *27*(9), 754-762.

[433] Kim, J. W., Jeong, H. K., Southard, K. M., Jun, Y. W., & Cheon, J. (2018). Magnetic nanotweezers for interrogating biological processes in space and time. *Accounts of chemical research*, *51*(4), 839-849.

[434] Patil, R. M., Thorat, N. D., Shete, P. B., Bedge, P. A., Gavde, S., Joshi, M. G., Tofail, S. A. M., & Bohara, R. A. (2018). Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and biophysics reports*, *13*, 63-72.

[435] Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, *36*(13), R167.

[436] Wahajuddin, N., & Arora, S. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 3445-3471.

[437] Xiao, Y., & Du, J. (2020). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, *8*(3), 354-367.

[438] Dulińska-Litewka, J., Łazarczyk, A., Hałubiec, P., Szafrański, O., Karnas, K., & Karewicz, A. (2019). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles—Current and prospective medical applications. *Materials*, *12*(4), 617.

[439] Lin, M. M., Kim, D. K., El Haj, A. J., & Dobson, J. (2008). Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications. *IEEE transactions on Nanobioscience*, *7*(4), 298-305.

[440] Vergés, M. A., Costo, R., Roca, A. G., Marco, J. F., Goya, G. F., Serna, C. J., & Morales, M. (2008). Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *41*(13), 134003.

[441] Perigo, E. A., Hemery, G., Sandre, O., Ortega, D., Garaio, E., Plazaola, F., & Teran, F. J. (2015). Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Applied Physics Reviews*, *2*(4).

[442] Palanisamy, S., & Wang, Y. M. (2019). Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer. *Dalton transactions*, *48*(26), 9490-9515.

[443] Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B., & Petri-Fink, A. (2012). Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical reviews*, *112*(4), 2323-2338.

[444] Kolhatkar, A. G., Jamison, A. C., Litvinov, D., Willson, R. C., & Lee, T. R. (2013). Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, *14*(8), 15977-16009.

[445] Kodama, R. H. (1999). Magnetic nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, *200*(1-3), 359-372.

[446] Dave, S. R., & Gao, X. (2009). Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *1*(6), 583-609.

[447] Sawicki, M., Stefanowicz, W., & Ney, A. (2011). Sensitive SQUID magnetometry for studying nanomagnetism. *Semiconductor Science and Technology*, *26*(6), 064006.

[448] Kirupakar, B. R., Vishwanath, B. A., & Sree, M. P. (2016). Vibrating sample magnetometer and its application in characterisation of magnetic property of the anti cancer drug magnetic microspheres. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 227-233.

[449] Nelson, N. R., Port, J. D., & Pandey, M. K. (2020). Use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) via multiple imaging modalities and modifications to reduce cytotoxicity: an educational review. *Journal of Nanotheranostics*, *1*(1), 105-135.

[450] Santhosh, P. B., & Ulrih, N. P. (2013). Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics. *Cancer letters*, *336*(1), 8-17.

[451] Markides, H., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2012). Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of nanomaterials*, *2012*, 13-13.

[452] Kruis, F. E., Fissan, H., & Peled, A. (1998). Synthesis of nanoparticles in the gas phase for electronic, optical and magnetic applications—a review. *Journal of aerosol science*, *29*(5-6), 511-535.

[453] Tseng, A. A., Chen, K., Chen, C. D., & Ma, K. J. (2003). Electron beam lithography in nanoscale fabrication: recent development. *IEEE Transactions on electronics packaging manufacturing*, *26*(2), 141-149.

[454] Amendola, V., Riello, P., & Meneghetti, M. (2011). Magnetic nanoparticles of iron carbide, iron oxide, iron@ iron oxide, and metal iron synthesized by laser ablation in organic solvents. *The journal of physical chemistry C*, *115*(12), 5140-5146.

[455] Veintemillas-Verdaguer, S., Morales, M. P., & Serna, C. J. (1998). Continuous production of γ-Fe2O3 ultrafine powders by laser pyrolysis. *Materials Letters*, *35*(3-4), 227-231.

[456] Can, M. M., Ozcan, S., Ceylan, A., & Firat, T. (2010). Effect of milling time on the synthesis of magnetite nanoparticles by wet milling. *Materials Science and Engineering: B*, *172*(1), 72-75.

[457] Deshpande, K., Mukasyan, A., & Varma, A. (2004). Direct synthesis of iron oxide nanopowders by the combustion approach: reaction mechanism and properties. *Chemistry of materials*, *16*(24), 4896-4904.

[458] Li, D., Teoh, W. Y., Selomulya, C., Woodward, R. C., Munroe, P., & Amal, R. (2007). Insight into microstructural and magnetic properties of flame-made γ-Fe 2 O 3 nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, *17*(46), 4876-4884.

[459] Ahn, T., Kim, J. H., Yang, H. M., Lee, J. W., & Kim, J. D. (2012). Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. *The journal of physical chemistry C*, *116*(10), 6069-6076.

[460] Hyeon, T., Lee, S. S., Park, J., Chung, Y., & Na, H. B. (2001). Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(51), 12798-12801.

[461] Hufschmid, R., Arami, H., Ferguson, R. M., Gonzales, M., Teeman, E., Brush, L. N., Browning, N. D., & Krishnan, K. M. (2015). Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition. *Nanoscale*, *7*(25), 11142-11154.

[462] Santra, S., Tapec, R., Theodoropoulou, N., Dobson, J., Hebard, A., & Tan, W. (2001). Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants. *Langmuir*, *17*(10), 2900-2906.

[463] Ge, S., Shi, X., Sun, K., Li, C., Uher, C., Baker Jr, J. R., Banaszak Holl, M. M., & Orr, B. G. (2009). Facile hydrothermal synthesis of iron oxide nanoparticles with tunable magnetic properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, *113*(31), 13593-13599.

[464] Jacinto, M. J., Silva, V. C., Valladão, D. M. S., & Souto, R. S. (2021). Biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: a review. *Biotechnology Letters*, *43*(1), 1-12.

[465] Samrot, A. V., Sahithya, C. S., Selvarani, J., Purayil, S. K., & Ponnaiah, P. (2021). A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, *4*, 100042.

[466] Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and technology of advanced materials*, *16*(2), 023501.

[467] Fokina, V., Wilke, M., Dulle, M., Ehlert, S., & Förster, S. (2022). Size control of iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition methods. *The Journal of Physical Chemistry C*, *126*(50), 21356-21367.

[468] Salas, G., Casado, C., Teran, F. J., Miranda, R., Serna, C. J., & Morales, M. P. (2012). Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, *22*(39), 21065-21075.

[469] Guardia, P., Labarta, A., & Batlle, X. (2011). Tuning the size, the shape, and the magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, *115*(2), 390-396.

[470] Ho, C. H., Tsai, C. P., Chung, C. C., Tsai, C. Y., Chen, F. R., Lin, H. J., & Lai, C. H. (2011). Shape-controlled growth and shape-dependent cation site occupancy of monodisperse Fe3O4 nanoparticles. *Chemistry of Materials*, *23*(7), 1753-1760.

[471] Sun, S., & Zeng, H. (2002). Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(28), 8204-8205.

[472] Woo, K., Hong, J., Choi, S., Lee, H. W., Ahn, J. P., Kim, C. S., & Lee, S. W. (2004). Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Chemistry of materials*, *16*(14), 2814-2818.

[473] Wang, Y., Zhu, Z., Xu, F., & Wei, X. (2012). One-pot reaction to synthesize superparamagnetic iron oxide nanoparticles by adding phenol as reducing agent and stabilizer. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*, 1-7.

[474] Bronstein, L. M., Huang, X., Retrum, J., Schmucker, A., Pink, M., Stein, B. D., & Dragnea, B. (2007). Influence of iron oleate complex structure on iron oxide nanoparticle formation. *Chemistry of materials*, *19*(15), 3624-3632.

[475] Mourdikoudis, S., Menelaou, M., Fiuza-Maneiro, N., Zheng, G., Wei, S., Pérez-Juste, J., Polavarapu, L., & Sofer, Z. (2022). Oleic acid/oleylamine ligand pair: a versatile combination in the synthesis of colloidal nanoparticles. *Nanoscale horizons*, *7*(9), 941-1015.

[476] Kovalenko, M. V., Bodnarchuk, M. I., Lechner, R. T., Hesser, G., Schäffler, F., & Heiss, W. (2007). Fatty acid salts as stabilizers in size-and shape-controlled nanocrystal synthesis: the case of inverse spinel iron oxide. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(20), 6352-6353.

[477] Demortiere, A., Panissod, P., Pichon, B. P., Pourroy, G., Guillon, D., Donnio, B., & Bégin-Colin, S. (2011). Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals. *Nanoscale*, *3*(1), 225-232.

[478] Park, J., An, K., Hwang, Y., Park, J. G., Noh, H. J., Kim, J. Y., Park, J. H., Hwang, N. M., & Hyeon, T. (2004). Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature materials*, *3*(12), 891-895.

[479] Underberg, M., Prenting, M. M., Sieber, M., Schimek, S., Paschereit, C. O., Hülser, T., Endres, T., Schulz, C., Wiggers, H., & Schnurre, S. M. (2023). A hydrogen-based burner concept for pilot-scale spray-flame synthesis of nanoparticles: Investigation of flames and iron oxide product materials. *Applications in Energy and Combustion Science*, *15*, 100165.

[480] Li, S., Ren, Y., Biswas, P., & Stephen, D. T. (2016). Flame aerosol synthesis of nanostructured materials and functional devices: Processing, modeling, and diagnostics. *Progress in Energy and Combustion Science*, *55*, 1-59.

[481] Strobel, R., & Pratsinis, S. E. (2007). Flame aerosol synthesis of smart nanostructured materials. *Journal of Materials Chemistry*, *17*(45), 4743-4756.

[482] Teoh, W. Y., Amal, R., & Mädler, L. (2010). Flame spray pyrolysis: An enabling technology for nanoparticles design and fabrication. *Nanoscale*, *2*(8), 1324-1347.

[483] Tischendorf, R., Simmler, M., Weinberger, C., Bieber, M., Reddemann, M., Fröde, F., Lindner, J., Pitsch, H., Kneer, R., Tiemann, M., Nirschl, H., & Schmid, H. J. (2021). Examination of the evolution of iron oxide nanoparticles in flame spray pyrolysis by tailored in situ particle sampling techniques. *Journal of aerosol science*, *154*, 105722.

[484] Strobel, R., & Pratsinis, S. E. (2011). Effect of solvent composition on oxide morphology during flame spray pyrolysis of metal nitrates. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *13*(20), 9246-9252.

[485] Kumfer, B. M., Shinoda, K., Jeyadevan, B., & Kennedy, I. M. (2010). Gas-phase flame synthesis and properties of magnetic iron oxide nanoparticles with reduced oxidation state. *Journal of aerosol science*, *41*(3), 257-265.

[486] Grimm, S., Schultz, M., Barth, S., & Muller, R. (1997). Flame pyrolysis–a preparation route for ultrafine pure γ-Fe2O3 powders and the control of their particle size and properties. *Journal of materials science*, *32*(4), 1083-1092.

[487] Li, D., Teoh, W. Y., Selomulya, C., Woodward, R. C., Amal, R., & Rosche, B. (2006). Flame-sprayed superparamagnetic bare and silica-coated maghemite nanoparticles: synthesis, characterization, and protein adsorption− desorption. *Chemistry of Materials*, *18*(26), 6403-6413.

[488] Strobel, R., & Pratsinis, S. E. (2009). Direct synthesis of maghemite, magnetite and wustite nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Advanced Powder Technology*, *20*(2), 190-194.

[489] Estévez, M., Cicuéndez, M., Crespo, J., Serrano-López, J., Colilla, M., Fernández-Acevedo, C., Oroz-Mateo, T., Rada-Leza, A., González, B., Izquierdo-Barba, I., & Vallet-Regí, M. (2023). Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: In vitro biological evaluation for biomedical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, *650*, 560-572.

[490] Boyer, C., Whittaker, M. R., Bulmus, V., Liu, J., & Davis, T. P. (2010). The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Materials*, *2*(1), 23-30.

[491] Veiseh, O., Gunn, J. W., & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*, *62*(3), 284-304.

[492] Guisasola, E., Baeza, A., Talelli, M., Arcos, D., Moros, M., de la Fuente, J. M., & Vallet-Regí, M. (2015). Magnetic-responsive release controlled by hot spot effect. *Langmuir*, *31*(46), 12777-12782.

[493] Álvarez, E., Estévez, M., Gallo-Cordova, A., González, B., Castillo, R. R., Morales, M. D. P., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., & Vallet-Regí, M. (2022). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles decorated mesoporous silica nanosystem for combined antibiofilm therapy. *Pharmaceutics*, *14*(1), 163.

[494] Zhan, F., & Zhang, C. Y. (2011). Bifunctional nanoparticles with superparamagnetic and luminescence properties. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(13), 4765-4767.

[495] Behrens, S. (2011). Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions. *Nanoscale*, *3*(3), 877-892.

[496] Zhao, N., & Gao, M. (2009). Magnetic janus particles prepared by a flame synthetic approach: synthesis, characterizations and properties. *Adv. Mater*, *21*(2), 184-187.

[497] Yu, H., Chen, M., Rice, P. M., Wang, S. X., White, R. L., & Sun, S. (2005). Dumbbell-like bifunctional Au− Fe3O4 nanoparticles. *Nano letters*, *5*(2), 379-382.

[498] Benayas, E., Espinosa, A., Portolés, M. T., Vila-del Sol, V., Morales, M. P., & Serrano, M. C. (2023). Cellular and molecular processes are differently influenced in primary neural cells by slight changes in the physicochemical properties of multicore magnetic nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *15*(14), 17726-17741.

[499] Mejías, R., Pérez-Yagüe, S., Gutiérrez, L., Cabrera, L. I., Spada, R., Acedo, P., Serna, C. J., Lázaro, F. J., Villanueva, A., Morales, M. P., & Barber, D. F. (2011). Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, *32*(11), 2938-2952.

[500] Shen, M., Cai, H., Wang, X., Cao, X., Li, K., Wang, S. H., Guo, R., Zheng, L., Zhang, G., & Shi, X. (2012). Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, *23*(10), 105601.

[501] Martínez-Ramírez, J., Toldos-Torres, M., Benayas, E., Villar-Gómez, N., Fernández-Méndez, L., Espinosa, F. M., García, R., Veintemillas-Verdaguer, S., Morales, M. P., & Serrano, M. C. (2024). Hybrid hydrogels support neural cell culture development under magnetic actuation at high frequency. *Acta Biomaterialia*, *176*, 156-172.

[502] Cole, A. J., David, A. E., Wang, J., Galbán, C. J., & Yang, V. C. (2011). Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, *32*(26), 6291-6301.

[503] Wu, D., Zhao, J., Zhang, L., Wu, Q., & Yang, Y. (2010). Lanthanum adsorption using iron oxide loaded calcium alginate beads. *Hydrometallurgy*, *101*(1-2), 76-83.

[504] Bhattacharya, D., Chakraborty, S. P., Pramanik, A., Baksi, A., Roy, S., Maiti, T. K., Ghosh, S. K., & Pramanik, P. (2011). Detection of total count of Staphylococcus aureus using anti-toxin antibody labelled gold magnetite nanocomposites: a novel tool for capture, detection and bacterial separation. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(43), 17273-17282.

[505] Zhi, D., Yang, T., Yang, J., Fu, S., & Zhang, S. (2020). Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy. *Acta biomaterialia*, *102*, 13-34.

[506] Wang, K., Chen, H., Zhang, X., Tong, Y., Song, S., Tsiakaras, P., & Wang, Y. (2020). Iron oxide@ graphitic carbon core-shell nanoparticles embedded in ordered mesoporous N-doped carbon matrix as an efficient cathode catalyst for PEMFC. *Applied Catalysis B: Environmental*, *264*, 118468.

[507] Asab, G., Zereffa, E. A., & Abdo Seghne, T. (2020). Synthesis of silica-coated Fe 3 O 4 nanoparticles by microemulsion method: Characterization and evaluation of antimicrobial activity. *International journal of biomaterials*, *2020*.

[508] Xu, Z., Hou, Y., & Sun, S. (2007). Magnetic core/shell Fe3O4/Au and Fe3O4/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(28), 8698-8699.

[509] Li, S. K., Huang, F. Z., Wang, Y., Shen, Y. H., Qiu, L. G., Xie, A. J., & Xu, S. J. (2011). Magnetic Fe 3 O 4@ C@ Cu 2 O composites with bean-like core/shell nanostructures: Synthesis, properties and application in recyclable photocatalytic degradation of dye pollutants. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(20), 7459-7466.

[510] Lu, A. H., Salabas, E. E., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte chemie international edition*, *46*(8), 1222-1244.

[511] Wang, Q., Ma, Y., Liu, L., Yao, S., Wu, W., Wang, Z., Lv, P., Zheng, J., Yu, K., Wei, W., & Ostrikov, K. (2020). Plasma enabled Fe2O3/Fe3O4 nano-aggregates anchored on nitrogen-doped graphene as anode for sodium-ion batteries. *Nanomaterials*, *10*(4), 782.

[512] Choi, H. C., Kundaria, S., Wang, D., Javey, A., Wang, Q., Rolandi, M., & Dai, H. (2003). Efficient formation of iron nanoparticle catalysts on silicon oxide by hydroxylamine for carbon nanotube synthesis and electronics. *Nano Letters*, *3*(2), 157-161.

[513] Ajinkya, N., Yu, X., Kaithal, P., Luo, H., Somani, P., & Ramakrishna, S. (2020). Magnetic iron oxide nanoparticle (IONP) synthesis to applications: present and future. *Materials*, *13*(20), 4644.

[514] Dasari, A., Xue, J., & Deb, S. (2022). Magnetic nanoparticles in bone tissue engineering. *Nanomaterials*, *12*(5), 757.

[515] Xiao, H. T., Wang, L., & Yu, B. (2015). Superparamagnetic iron oxide promotes osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(1), 698.

[516] Wang, Q., Chen, B., Cao, M., Sun, J., Wu, H., Zhao, P., Xing, J., Yang, Y., Zhang, X., Ji, M., & Gu, N. (2016). Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials*, *86*, 11-20.

[517] Hu, S., Zhou, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Zhang, F., Gu, N., Ma, J., Reynolds, M. A., Xia, Y., & Xu, H. H. K. (2018). Enhanced bone regeneration and visual monitoring via superparamagnetic iron oxide nanoparticle scaffold in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *12*(4), e2085-e2098.

[518] Jia, Y., Zhang, P., Sun, Y., Kang, Q., Xu, J., Zhang, C., & Chai, Y. (2019). Regeneration of large bone defects using mesoporous silica coated magnetic nanoparticles during distraction osteogenesis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *21*, 102040.

[519] Yang, J., Wu, J., Guo, Z., Zhang, G., & Zhang, H. (2022). Iron Oxide Nanoparticles Combined with Static Magnetic Fields in Bone Remodeling. *Cells*, *11*(20), 3298.

[520] Yang, J., Feng, Y., Li, Q., & Zeng, Y. (2023). Evidence of the static magnetic field effects on bone-related diseases and bone cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *177*, 168-180.

[521] Petecchia, L., Sbrana, F., Utzeri, R., Vercellino, M., Usai, C., Visai, L., Vassalli, M., & Gavazzo, P. (2015). Electro-magnetic field promotes osteogenic differentiation of BM-hMSCs through a selective action on Ca2+-related mechanisms. *Scientific reports*, *5*(1), 13856.

[522] Chen, G., Zhuo, Y., Tao, B., Liu, Q., Shang, W., Li, Y., Wang, Y., Li, Y., Zhang, L., Fang, Y., Zhang, X., Fang, Z., & Yu, Y. (2020). Moderate SMFs attenuate bone loss in mice by promoting directional osteogenic differentiation of BMSCs. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*, 1-14.

[523] Li, Z., Xue, L., Wang, P., Ren, X., Zhang, Y., Wang, C., & Sun, J. (2023). Biological scaffolds assembled with magnetic nanoparticles for bone tissue engineering: a review. *Materials*, *16*(4), 1429.

[524] Papachroni, K. K., Karatzas, D. N., Papavassiliou, K. A., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2009). Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in molecular medicine*, *15*(5), 208-216.

[525] Tomás, A. R., Gonçalves, A. I., Paz, E., Freitas, P., Domingues, R. M., & Gomes, M. E. (2019). Magneto-mechanical actuation of magnetic responsive fibrous scaffolds boosts tenogenesis of human adipose stem cells. *Nanoscale*, *11*(39), 18255-18271.

[526] Cedillo-Servin, G., Dahri, O., Meneses, J., van Duijn, J., Moon, H., Sage, F., Silva, J., Pereira, A., Magalhães, F. D., Malda, J., Geijsen, N., Pinto, A. M., & Castilho, M. (2023). 3D Printed Magneto-Active Microfiber Scaffolds for Remote Stimulation and Guided Organization of 3D In Vitro Skeletal Muscle Models. *Small*, 2307178.

[527] Yun, H. M., Ahn, S. J., Park, K. R., Kim, M. J., Kim, J. J., Jin, G. Z., Kim, H. W., & Kim, E. C. (2016). Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. *Biomaterials*, *85*, 88-98.

[528] Hao, L., Li, L., Wang, P., Wang, Z., Shi, X., Guo, M., & Zhang, P. (2019). Synergistic osteogenesis promoted by magnetically actuated nano-mechanical stimuli. *Nanoscale*, *11*(48), 23423-23437.

[529] Henstock, J. R., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2018). Magnetic ion channel activation of TREK1 in human mesenchymal stem cells using nanoparticles promotes osteogenesis in surrounding cells. *Journal of tissue engineering*, *9*, 2041731418808695.

[530] Markides, H., McLaren, J. S., Telling, N. D., Alom, N., Al-Mutheffer, E. A. A., Oreffo, R. O., Zannettino, A., Scammell, B. E., White, L. J., & El Haj, A. J. (2018). Translation of remote control regenerative technologies for bone repair. *NPJ Regenerative medicine*, *3*(1), 9.

[531] Sniadecki, N. J. (2010). Minireview: a tiny touch: activation of cell signaling pathways with magnetic nanoparticles. *Endocrinology*, *151*(2), 451-457.

[532] Xia, Y., Chen, H., Zhao, Y., Zhang, F., Li, X., Wang, L., Weir, M. D., Ma, J., Reynolds, M. A., Gu, N., & Xu, H. H. (2019). Novel magnetic calcium phosphate-stem cell construct with magnetic field enhances osteogenic differentiation and bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *98*, 30-41.

[533] Jiang, P., Zhang, Y., Zhu, C., Zhang, W., Mao, Z., & Gao, C. (2016). Fe3O4/BSA particles induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells under static magnetic field. *Acta Biomaterialia*, *46*, 141-150.

[534] Yeo, E. F., Markides, H., Schade, A. T., Studd, A. J., Oliver, J. M., Waters, S. L., & El Haj, A. J. (2021). Experimental and mathematical modelling of magnetically labelled mesenchymal stromal cell delivery. *Journal of the Royal Society Interface*, *18*(175), 20200558.

[535] Mertens, M. E., Hermann, A., Bühren, A., Olde-Damink, L., Möckel, D., Gremse, F., Ehling, J., Kiessling, F., & Lammers, T. (2014). Iron oxide-labeled collagen scaffolds for non-invasive MR imaging in tissue engineering. *Advanced functional materials*, *24*(6), 754-762.

[536] El Haj, A. J., Glossop, J. R., Sura, H. S., Lees, M. R., Hu, B., Wolbank, S., van Griensven, M., Redl, H., & Dobson, J. (2015). An in vitro model of mesenchymal stem cell targeting using magnetic particle labelling. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *9*(6), 724-733.

[537] Mahmoud, E. E., Kamei, G., Harada, Y., Shimizu, R., Kamei, N., Adachi, N., Misk, N. A., & Ochi, M. (2016). Cell magnetic targeting system for repair of severe chronic osteochondral defect in a rabbit model. *Cell Transplantation*, *25*(6), 1073-1083.

[538] Paltanea, G., Manescu, V., Antoniac, I., Antoniac, A., Nemoianu, I. V., Robu, A., & Dura, H. (2023). A review of biomimetic and biodegradable magnetic scaffolds for bone tissue engineering and oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5), 4312.

[539] Henstock, J. R., Rotherham, M., Rashidi, H., Shakesheff, K. M., & El Haj, A. J. (2014). Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy. *Stem cells translational medicine*, *3*(11), 1363-1374.

[540] Hajiali, H., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2023). Remote Activation of Mechanotransduction via Integrin Alpha-5 via Aptamer-Conjugated Magnetic Nanoparticles Promotes Osteogenesis. *Pharmaceutics*, *16*(1), 21.

[541] Li, S., Wei, C., & Lv, Y. (2020). Preparation and application of magnetic responsive materials in bone tissue engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *15*(5), 428-440.

[542] Wang, Q., Chen, B., Ma, F., Lin, S., Cao, M., Li, Y., & Gu, N. (2017). Magnetic iron oxide nanoparticles accelerate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via modulation of long noncoding RNA INZEB2. *Nano Research*, *10*, 626-642.

[543] Xia, Y., Sun, J., Zhao, L., Zhang, F., Liang, X. J., Guo, Y., Weir, M. D., Reynolds, M. A., Gu, N., & Xu, H. H. (2018). Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*, *183*, 151-170.

2. Objetivos / Objectives

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido el diseño y desarrollo de sistemas nanoestructurados basados en nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) que permitan la mecanotransducción celular por control remoto para el tratamiento de defectos óseos producidos por fracturas osteoporóticas. Este objetivo se enmarca en las líneas de investigación del proyecto GIOTTO (*Active aGeIng and Osteoporosis: The next challenge for smarT nanobiOmaterials and 3D technologies*), financiado por la Unión Europea dentro del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 y desarrollado por un consorcio formado por 14 organizaciones de 9 países europeos.

El objetivo general de la presente tesis se subdivide a su vez en los siguientes objetivos concretos:

1. Síntesis de SPIONs por descomposición térmica (TD) y funcionalización con un péptido RGD para dirigirlas a las integrinas celulares, caracterización de las mismas, así como la evaluación de los mecanismos de endocitosis, la citocompatibilidad y el potencial osteogénico de las nanopartículas en hBM-MSCs aplicando un campo magnético externo. Este objetivo se desarrolla en el apartado 3.1. de la presente memoria.
2. Incorporación de SPIONs-TD en diferentes andamios tridimensionales para la regeneración ósea.
    2.1. Combinación de soluciones de colágeno de tipo I y dispersiones acuosas de SPIONs-TD, así como la evaluación de la procesabilidad de la formulación híbrida resultante mediante electrohilado para producir andamios fibrosos, nanoestructurados, magnéticos y biocompatibles. Este objetivo se desarrolla en el apartado 3.2. de la presente memoria.
    2.2. Incorporación de SPIONs-TD en la superficie de andamios poliméricos tridimensionales mediante impresión por inyección de tinta de goteo a demanda, caracterización de los andamios producidos y evaluación del potencial osteogénico *in vitro* a través de la mecanotransducción. Este objetivo se desarrolla en el apartado 3.3. de la presente memoria.
3. Producción a gran escala de SPIONs mediante pirolisis por pulverización en llama, optimización, caracterización y recubrimiento con DMSA de las nanopartículas para mejorar su estabilidad coloidal en medios acuosos, así como la validación *in vitro* de las mismas en términos de hemocompatibilidad con células de sangre periférica y citocompatibilidad con hBM-MSCs. Este objetivo se desarrolla en el apartado 3.4. de la presente memoria.

Objectives

The overall objective of this doctoral thesis has been the design and development of nanostructured systems based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) that allow remote-controlled cell mechanotransduction for the treatment of bone defects caused by osteoporotic fractures. This objective is part of the research lines of the GIOTTO project (*Active aGeIng and Osteoporosis: The next challenge for smarT nanobiOmaterials and 3D technologies*), funded by the European Union within the Horizon 2020 research and innovation program and developed by a consortium of 14 organizations from 9 European countries.

The general objective of this thesis is further subdivided into the following specific objectives:

1. Synthesis of SPIONs by thermal decomposition (TD) and functionalization with an RGD peptide to target cellular integrins, their characterization, as well as evaluation of the mechanisms of endocytosis, cytocompatibility and osteogenic potential of the nanoparticles in hBM-MSCs by applying an external magnetic field. This objective is developed in section 3.1 of the present report.
2. Incorporation of SPIONs-TD in different three-dimensional scaffolds for bone regeneration.
    2.1. Combination of type I collagen solutions and aqueous dispersions of SPIONs-TD, as well as the evaluation of the processability of the resulting hybrid formulation by electrospinning to produce fibrous, nanostructured, magnetic and biocompatible scaffolds. This objective is developed in section 3.2. of this report.
    2.2. Incorporation of SPIONs-TD on the surface of three-dimensional polymeric scaffolds by drop-on-demand inkjet printing, characterization of the scaffolds produced and evaluation of the osteogenic potential in vitro through mechanotransduction. This objective is developed in section 3.3. of this report.
3. Large-scale production of SPIONs by flame spray pyrolysis, optimization, characterization and DMSA coating of the nanoparticles to improve their colloidal stability in aqueous media, as well as their *in vitro* validation in terms of hemocompatibility with peripheral blood cells and cytocompatibility with hBM-MSCs. This objective is developed in section 3.4. of this report.

3. Resultados y discusión

3.1. SPIONs sintetizadas por descomposición térmica para su uso en regeneración ósea

3.1.1. Introducción y resumen

La osteoporosis es una enfermedad esquelética crónica asociada al envejecimiento poblacional. Esta enfermedad provoca una disminución de la masa ósea, en consecuencia, aumenta la fragilidad del tejido óseo y el riesgo de sufrir fracturas, que es la complicación más importante de la osteoporosis [1,2]. Este hecho exige el desarrollo de nuevos enfoques biomédicos para la regeneración ósea.

En relación con esto, las SPIONs han atraído gran atención en múltiples aplicaciones biomédicas gracias a sus propiedades magnéticas únicas [3,4], compatibilidad biológica [5] y alta estabilidad. Una de estas aplicaciones es la ingeniería del tejido óseo. Se ha demostrado que las SPIONs por sí solas, incluso sin un campo magnético, son capaces de mejorar la eficacia de la reparación tisular [6], promover la diferenciación osteogénica de MSCs humanas [7], y mejorar la regeneración ósea *in vivo* [8]. Los mecanismos que desencadenan estos procesos están aún por determinar, aunque varios estudios *in vitro* indican que las nanopartículas de óxido de hierro aceleran la diferenciación osteogénica a través de las vías de señalización Akt-GSK-3β-β-catenina [9] y MAPK [7].

Por otra parte, los estímulos físicos como las tensiones de tracción y compresión, las tensiones de cizallamiento de fluidos y el calor, pueden mejorar significativamente la regeneración ósea y la curación de fracturas [10-14]. Además, los estímulos magnéticos procedentes de campos magnéticos estáticos (SMF) y electromagnéticos (EMF) también pueden mejorar sustancialmente la reparación y regeneración ósea [15,16]. En este sentido, las nanopartículas magnéticas (MNPs) utilizadas en combinación con un campo magnético tienen gran potencial en la ingeniería del tejido óseo [17], ya que pueden proporcionar estímulos mecánicos dinámicos que favorecen la formación de hueso [18]. En los últimos años, un número cada vez mayor de estudios ha descubierto que una combinación de SMF y SPIONs es más eficaz que las SPIONs solas para promover la diferenciación de los osteoblastos [19]. Este efecto sinérgico se atribuye principalmente a una estimulación magneto-mecánica. La estimulación mecánica desempeña un papel clave en la regulación de la remodelación ósea [20], donde múltiples fuerzas mecánicas estimulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos y las hMSCs [21].

La idea general que subyace a la estimulación magneto-mecánica es que un actuador magnético expuesto a un campo magnético inducirá una carga mecánica que activa vías intracelulares. Por lo tanto, hay tres componentes principales para la activación remota de funciones celulares basada en materiales magnéticos: (i) el campo magnético (que ejerce una fuerza específica), (ii) el actuador magnético (por ejemplo, MNPs) y (iii) el objetivo que se activa a nivel celular [10]. En la activación magneto-mecánica, las principales posibilidades propuestas hasta ahora para generar un estímulo

mecánico son el movimiento de tracción, las interacciones dipolares y la torsión [22]. Que se dé un movimiento u otro depende de las diferentes configuraciones espaciales utilizadas en los aplicadores de campos magnéticos de corriente continua. Variando la configuración se puede obtener un gradiente de campo magnético, un campo magnético estático de corriente continua o un campo rotativo de corriente continua. Así mismo, los aplicadores de campos magnéticos pueden ser imanes permanentes o electroimanes [10].

Cuando los actuadores magnéticos se colocan en un gradiente de campo magnético, estos se moverán hacia la fuente del campo generando un movimiento de tracción [23]. Si las partículas están unidas a un receptor celular, su movimiento generará una fuerza de tracción en la membrana celular, lo que da lugar a la modulación de una serie de señales bioquímicas en el interior celular (mecanotransducción) [24,25]. La intensidad de dicha fuerza dependerá del momento magnético de la partícula y del gradiente de campo magnético. Se ha demostrado que fuerzas del orden de piconewtons (pN) son capaces de inducir cambios en la señalización celular. Por ejemplo, se ha calculado que tanto las MNPs de magnetita de 10-15 nm como las MNPs de base férrica de 250 nm ejercen fuerzas de entre 0,2 y 2 pN por partícula, dependiendo de la densidad de flujo magnético y del gradiente de campo aplicados [26]. En este tipo de enfoques, la velocidad y la magnitud de la fuerza aplicada también son importantes, ya que la frecuencia de los movimientos de tracción se ha relacionado con diferentes respuestas de las células [27]. Para conseguir este tipo de movimiento por parte de las partículas, generalmente se utilizan imanes potentes (compuestos de Nd, Fe y B y a menudo denominados imanes de neodimio). Los imanes de NdFeB incluidos en biorreactores de fuerza magnética oscilantes verticales (**Figura 3.1.1.**) se han utilizado ampliamente en experimentos de estimulación magneto-mecánica para aplicaciones de diferenciación y regeneración ósea [26,28].

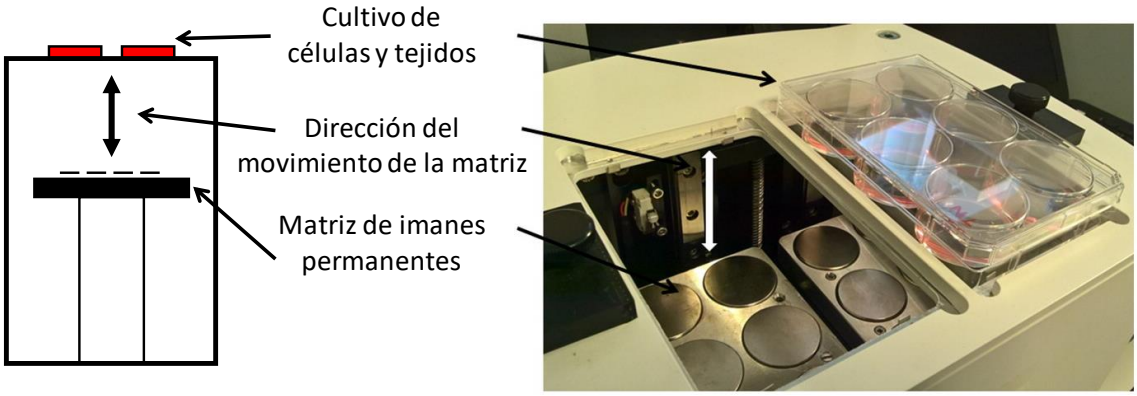


Figura 3.1.1. Representación esquemática y fotografía de un biorreactor magnético (MICA Biosystems) consistente en matrices de imanes permanentes situados bajo las muestras. Adaptada de la referencia [29].

Además de poseer las características fisicoquímicas necesarias para la estimulación magneto-mecánica, las SPIONs deben ser coloidalmente estables para su uso en aplicaciones en dispersión y fácilmente funcionalizables para poder dirigirlas a dianas celulares específicas [10]. En este sentido, el recubrimiento de SPIONs con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) conduce a la obtención de formulaciones coloidales acuosas altamente estables [30,31]. Las SPIONs recubiertas de DMSA presentan grupos carboxilo en la superficie que pueden aprovecharse para anclar fármacos, anticuerpos, péptidos o moléculas que dirijan a las SPIONs a los receptores celulares específicos [31-33].

De entre las diferentes proteínas transmembrana, las integrinas son un grupo de glicoproteínas implicadas principalmente en la unión de las células con la matriz extracelular. Las adhesiones mediadas por integrinas son intrínsecamente mecanosensibles y un gran número de datos implican a las integrinas en la detección de fuerzas mecánicas [34]. El dominio de unión Arg-Gly-Asp (RGD) se expresa de forma prominente en la mayoría de los receptores de integrina. Esto permite que las proteínas o los péptidos que contienen el motivo RGD se unan a las integrinas en una interfaz entre las subunidades α y β [35,36]. Las nanopartículas magnéticas pueden funcionalizarse fácilmente con péptidos RGD para permitir su unión a los receptores de integrina y posibilitar la estimulación magnética directa. En un estudio, las SPIONs funcionalizadas con RGD unidas a sustratos de vidrio promovieron la adhesión de las MSCs y aumentaron la expresión de Runx2 y ALP cuando se expusieron a campos magnéticos oscilantes [37].

En este trabajo hemos comprobado la eficacia de SPIONs obtenidas por el método de descomposición térmica, con un tamaño medio de 13 nm, cuando se exponen a la aplicación de un campo magnético externo para la mecanotransducción en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hBM-MSCs). Las SPIONs se funcionalizaron con un péptido RGD como ligando para dirigirse a los receptores de integrina de la membrana celular y se utilizaron en estado coloidal. A continuación, se llevó a cabo una caracterización bioanalítica exhaustiva y comparativa de los SPIONs sin funcionalizar frente a las funcionalizadas en términos de biocompatibilidad, vías de captación celular y efecto mecanotransductor, demostrando la diferenciación osteogénica de las hBM-MSCs. Una conclusión clave derivada de esta investigación es que cuando el estímulo magnético se aplica en los primeros 30 min del ensayo *in vitro*, es decir, cuando las nanopartículas entran en contacto con la superficie de la membrana celular para iniciar las vías endocíticas, se observa un efecto de mecanotransducción satisfactorio. Así, bajo la aplicación de un campo magnético, se produjo un aumento significativo de la expresión génica de *Runx2* y de *ALP*, así como de la actividad enzimática ALP, cuando las células se expusieron a SPIONs funcionalizadas con RGD, lo que demostró una diferenciación osteogénica. Estos hallazgos abren nuevas expectativas para el uso de la mecanotrasducción activada a distancia mediante

nanoformulaciones coloidales magnéticas dirigidas para la diferenciación osteogénica mediante terapia celular sin fármacos utilizando técnicas mínimamente invasivas en casos de pérdida ósea.

En la **Figura 3.1.2.** se representa de forma esquemática el resumen gráfico de este trabajo, mostrando las SPIONs funcionalizadas con el péptido RGD, la adición de las SPIONs a las células, la aplicación del campo magnético externo y el efecto osteogénico generado en las hBM-MSCs.

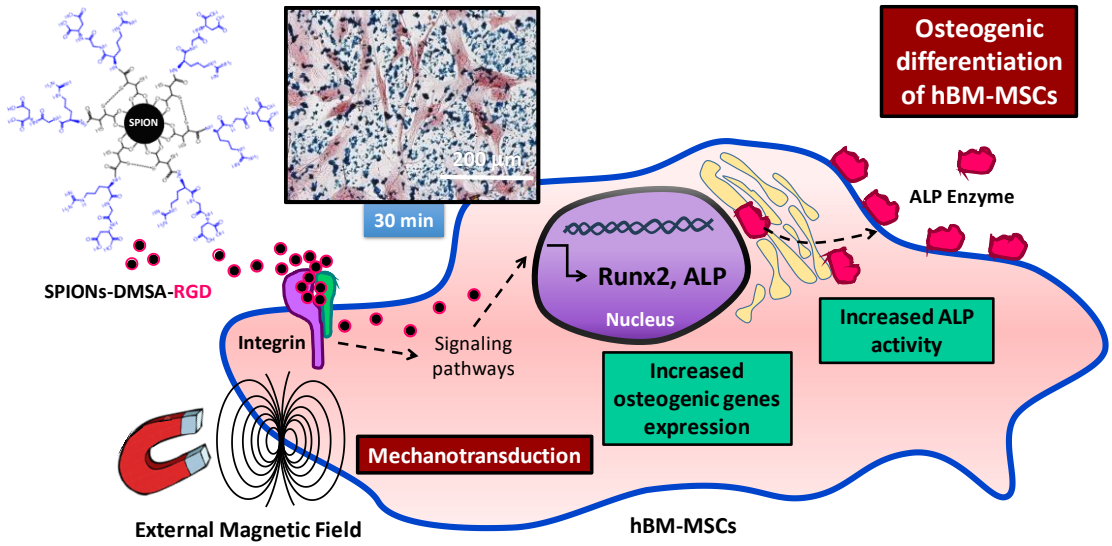


Figura 3.1.2. Esquema del efecto osteogénico generado por las SPIONs-DMSA-RGD bajo la aplicación del campo magnético externo. Reproducido de la referencia [38].

Referencias bibliográficas

[1] Salari, N., Ghasemi, H., Mohammadi, L., Behzadi, M. H., Rabieenia, E., Shohaimi, S., & Mohammadi, M. (2021). The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Journal of orthopaedic surgery and research*, *16*, 1-20.

[2] Kemmak, A. R., Rezapour, A., Jahangiri, R., Nikjoo, S., Farabi, H., & Soleimanpour, S. (2020). Economic burden of osteoporosis in the world: A systematic review. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, *34*, 154.

[3] Andreu, I., Natividad, E., Solozabal, L., & Roubeau, O. (2015). Nano-objects for addressing the control of nanoparticle arrangement and performance in magnetic hyperthermia. *ACS nano*, *9*(2), 1408-1419.

[4] Malekzadeh, A. M., Ramazani, A., Rezaei, S. J. T., & Niknejad, H. (2017). Design and construction of multifunctional hyperbranched polymers coated magnetite

nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Journal of colloid and interface science*, *490*, 64-73.

[5] Nguyen, D., Pham, B. T., Huynh, V., Kim, B. J., Pham, N. T., Bickley, S. A., Jones, S. K., Serelis, A., Davey, T., Such, C., & Hawkett, B. S. (2016). Monodispersed polymer encapsulated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cell labeling. *Polymer*, *106*, 238-248.

[6] Xiong, F., Wang, H., Feng, Y., Li, Y., Hua, X., Pang, X., Zhang, S., Song, L., Zhang, Y., & Gu, N. (2015). Cardioprotective activity of iron oxide nanoparticles. *Scientific Reports*, *5*(1), 8579.

[7] Wang, Q., Chen, B., Cao, M., Sun, J., Wu, H., Zhao, P., Xing, J., Yang, Y., Zhang, X., Ji, M., & Gu, N. (2016). Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials*, *86*, 11-20.

[8] Hu, S., Zhou, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Zhang, F., Gu, N., Ma, J., Reynolds, M. A., Xia, Y., & Xu, H. H. (2018). Enhanced bone regeneration and visual monitoring via superparamagnetic iron oxide nanoparticle scaffold in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *12*(4), e2085-e2098.

[9] Yu, P., Zheng, L., Wang, P., Chai, S., Zhang, Y., Shi, T., Zhang, L., Peng, R., Huang, C., Guo, B., & Jiang, Q. (2020). Development of a novel polysaccharide-based iron oxide nanoparticle to prevent iron accumulation-related osteoporosis by scavenging reactive oxygen species. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 1634-1645.

[10] Del Sol-Fernández, S., Martínez-Vicente, P., Gomollón-Zueco, P., Castro-Hinojosa, C., Gutiérrez, L., Fratila, R. M., & Moros, M. (2022). Magnetogenetics: remote activation of cellular functions triggered by magnetic switches. *Nanoscale*, *14*(6), 2091-2118.

[11] Dasari, A., Xue, J., & Deb, S. (2022). Magnetic nanoparticles in bone tissue engineering. *Nanomaterials*, *12*(5), 757.

[12] Li, Z., Xue, L., Wang, P., Ren, X., Zhang, Y., Wang, C., & Sun, J. (2023). Biological scaffolds assembled with magnetic nanoparticles for bone tissue engineering: a review. *Materials*, *16*(4), 1429.

[13] Xu, H. Y., & Gu, N. (2014). Magnetic responsive scaffolds and magnetic fields in bone repair and regeneration. *Frontiers of Materials Science*, *8*, 20-31.

[14] Chung, E., Sampson, A. C., & Rylander, M. N. (2014). Influence of heating and cyclic tension on the induction of heat shock proteins and bone-related proteins by MC3T3-E1 cells. *BioMed research international*, *2014*.

[15] Quittan, M., Schuhfried, O., Wiesinger, G. F., & Fialka-Moser, V. (2000). Clinical effectiveness of magnetic field therapy--a review of the literature. *Acta Medica Austriaca*, *27*(3), 61-68.

[16] Gujjalapudi, M., Anam, C., Mamidi, P., Chiluka, R., Kumar, A. G., & Bibinagar, R. (2016). Effect of magnetic field on bone healing around endosseous implants–An in-vivo study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *10*(10), ZF01.

[17] Xia, Y., Sun, J., Zhao, L., Zhang, F., Liang, X. J., Guo, Y., Weir, M. D., Reynolds, M. A., Gu, N., & Xu, H. H. (2018). Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*, *183*, 151-170.

[18] Henstock, J. R., Rotherham, M., Rashidi, H., Shakesheff, K. M., & El Haj, A. J. (2014). Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy. *Stem cells translational medicine*, *3*(11), 1363-1374.

[19] Marycz, K., Sobierajska, P., Roecken, M., Kornicka-Garbowska, K., Kępska, M., Idczak, R., Nedelec, J. M., & Wiglusz, R. J. (2020). Iron oxides nanoparticles (IOs) exposed to magnetic field promote expression of osteogenic markers in osteoblasts through integrin alpha-3 (INTa-3) activation, inhibits osteoclasts activity and exerts anti-inflammatory action. *Journal of nanobiotechnology*, *18*, 1-24.

[20] Wang, L., You, X., Zhang, L., Zhang, C., & Zou, W. (2022). Mechanical regulation of bone remodeling. *Bone Research*, *10*(1), 16.

[21] Papachroni, K. K., Karatzas, D. N., Papavassiliou, K. A., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2009). Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in molecular medicine*, *15*(5), 208-216.

[22] Kim, J. W., Jeong, H. K., Southard, K. M., Jun, Y. W., & Cheon, J. (2018). Magnetic nanotweezers for interrogating biological processes in space and time. *Accounts of chemical research*, *51*(4), 839-849.

[23] Tanase, M., Biais, N., & Sheetz, M. (2007). Magnetic tweezers in cell biology. *Methods in cell biology*, *83*, 473-493.

[24] Dobson, J. (2008). Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, *3*(3), 139-143.

[25] Yuan, Z., Memarzadeh, K., Stephen, A. S., Allaker, R. P., Brown, R. A., & Huang, J. (2018). Development of a 3D collagen model for the in vitro evaluation of magnetic-assisted osteogenesis. *Scientific reports*, *8*(1), 16270.

[26] Rotherham, M., Nahar, T., Broomhall, T. J., Telling, N. D., & El Haj, A. J. (2022). Remote magnetic actuation of cell signalling for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, *24*, 100410.

[27] Kilinc, D., & Lee, G. U. (2014). Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. *Integrative Biology*, *6*(1), 27-34.

[28] Hu, B., El Haj, A. J., & Dobson, J. (2013). Receptor-targeted, magneto-mechanical stimulation of osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*, *14*(9), 19276-19293.

[29] Rotherham, M., Henstock, J. R., Qutachi, O., & El Haj, A. J. (2018). Remote regulation of magnetic particle targeted Wnt signaling for bone tissue engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *14*(1), 173-184.

[30] Gogoi, M., Deb, P., Vasan, G., Keil, P., Kostka, A., & Erbe, A. (2012). Direct monophasic replacement of fatty acid by DMSA on SPION surface. *Applied surface science*, *258*(24), 9685-9691.

[31] Ruiz, A., Morais, P. C., Bentes de Azevedo, R., Lacava, Z. G., Villanueva, A., & del Puerto Morales, M. (2014). Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. *Journal of nanoparticle research*, *16*, 1-20.

[32] Palma, S. I., Marciello, M., Carvalho, A., Veintemillas-Verdaguer, S., del Puerto Morales, M., & Roque, A. C. (2015). Effects of phase transfer ligands on monodisperse iron oxide magnetic nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, *437*, 147-155.

[33] Miguel-Sancho, N., Bomatí-Miguel, O., Colom, G., Salvador, J. P., Marco, M. P., & Santamaría, J. (2011). Development of stable, water-dispersible, and biofunctionalizable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of materials*, *23*(11), 2795-2802.

[34] Katsumi, A., Orr, A. W., Tzima, E., & Schwartz, M. A. (2004). Integrins in mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12001-12004.

[35] Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*, *12*(1), 697-715.

[36] Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*, *119*(19), 3901-3903.

[37] Kang, H., Wong, D. S. H., Yan, X., Jung, H. J., Kim, S., Lin, S., Wei, K., Li, G., Dravid, V. P., & Bian, L. (2017). Remote control of multimodal nanoscale ligand oscillations regulates stem cell adhesion and differentiation. *Acs Nano*, *11*(10), 9636-9649.

[38] Estévez, M., Cicuéndez, M., Colilla, M., Vallet-Regí, M., González, B., & Izquierdo-Barba, I. (2024). Magnetic colloidal nanoformulations to remotely trigger mechanotransduction for osteogenic differentiation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *664*, 454-468.

Journal of Colloid and Interface Science 664 (2024) 454–468

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid And Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Regular Article

Magnetic colloidal nanoformulations to remotely trigger mechanotransduction for osteogenic differentiation

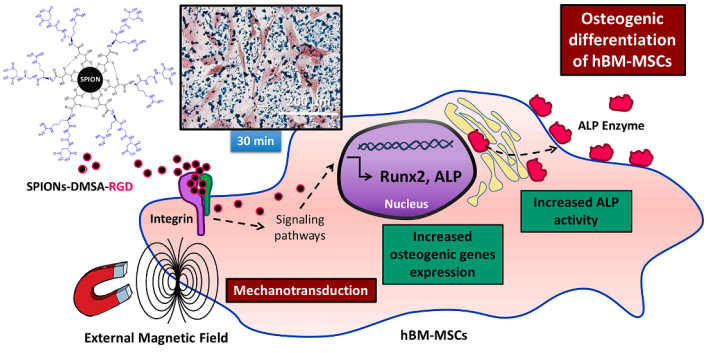
Manuel Estévez [a,1], Mónica Cicuéndez [b,1], Montserrat Colilla [a,c], María Vallet-Regí [a,c], Blanca González [a,c,*], Isabel Izquierdo-Barba [a,c,*]

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
[b] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
[c] Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain

HIGHLIGHTS

- Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) by thermal decomposition method.
- Integrin-targeted SPIONs for mechanotransduction stimulus in osteogenic differentiation.
- Remotely activated mechanotransduction via Arg-Gly-Asp (RGD) functionalized SPIONs.
- Magnetic mechanotransduction in human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) for osteogenic differentiation.
- Endocytic mechanisms of SPIONs in hBM-MSCs.
- Up-regulation of osteogenic markers after magnetic activation of mechanotransduction in hBM-MSCs.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
Thermal decomposition
RGD peptide
Osteogenic differentiation
Human bone marrow mesenchymal stem cells
Endocytic pathways
Mechanotransduction

ABSTRACT

Nowadays, diseases associated with an ageing population, such as osteoporosis, require the development of new biomedical approaches to bone regeneration. In this regard, mechanotransduction has emerged as a discipline within the field of bone tissue engineering. Herein, we have tested the efficacy of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), obtained by the thermal decomposition method, with an average size of 13 nm, when exposed to the application of an external magnetic field for mechanotransduction in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs). The SPIONs were functionalized with an Arg-Gly-Asp (RGD) peptide as ligand to target integrin receptors on cell membrane and used in colloidal state. Then, a comprehensive and comparative bioanalytical characterization of non-targeted versus targeted SPIONs was performed in terms of biocompatibility, cell uptake pathways and mechanotransduction effect, demonstrating the osteogenic

* Corresponding authors at: Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain.
E-mail addresses: blancaortiz@ucm.es (B. González), ibarba@ucm.es (I. Izquierdo-Barba).
[1] Both authors contributed equally to the manuscript.

https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.03.043
Received 11 December 2023; Received in revised form 5 March 2024; Accepted 6 March 2024
Available online 8 March 2024
0021-9797/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

differentiation of hBM-MSCs. A key conclusion derived from this research is that when the magnetic stimulus is applied in the first 30 min of the *in vitro* assay, *i.e.*, when the nanoparticles come into contact with the cell membrane surface to initiate endocytic pathways, a successful mechanotransduction effect is observed. Thus, under the application of a magnetic field, there was a significant increase in runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) and alkaline phosphatase (*ALP*) gene expression as well as ALP activity, when cells were exposed to RGD-functionalized SPIONs, demonstrating osteogenic differentiation. These findings open new expectations for the use of remotely activated mechanotransduction using targeted magnetic colloidal nanoformulations for osteogenic differentiation by drug-free cell therapy using minimally invasive techniques in cases of bone loss.

1. Introduction

Osteoporosis is a common chronic disease in the population and increases with aging, affecting one in three women and one in five men over the age of 50 worldwide [1]. This disease causes a decrease in bone density, which increases fragility and the possibility of suffering fractures such as hip, vertebral and wrist fractures, among the most frequent [2,3].

Mechanotransduction has emerged as a discipline within the field of bone tissue engineering [4]. The role of biomechanical stimuli in normal bone homeostasis and repair is understood to facilitate osteogenesis, providing an effective means of controlling cellular behaviour and obtaining highly satisfactory therapeutic outcomes [5]. This mechanical stimulation can activate specific cell signaling pathways through mechanotransduction process, whereby cells convert physical force into biochemical signals [6,7]. In this regard, the mechanical stimulation of mesenchymal stem cells by external magnetic fields has shown a marked improvement in the tissue formation in regenerative therapies [8–10]. Furthermore, the combination of magnetic nanomaterials and remote magnetic mechanoactivation of signaling pathways constitutes a very powerful and underexplored tool in bone tissue engineering that could harness new biomedical approaches in bone regeneration.

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) exhibit a special magnetic property called superparamagnetism [11]. Due to their size, which ranges from a few nanometres to a couple of tens of nanometres, these nanoparticles are single-domain particles. They have the capability to generate an intrinsic magnetic field in the presence of an external magnetic field (MF) and this magnetic response persists only as long as the external MF is applied [12]. In terms of biomedical applications this property allows for real time non-invasive follow-up treatments. In addition, these nanosystems can be magnetically guided and focused to the desired location, which is an advantage for clinical purposes [13–16]. Therefore, SPIONs have been widely studied for multiple biomedical applications such as magnetic resonance imaging (MRI) [17], hyperthermia therapy [18], targeted drug delivery [15] and recently bone tissue engineering [19–21]. Furthermore, there has been remarkable breakthrough in the current research on osteogenesis mediated by iron oxide nanoparticles [22] and porous hollow iron oxide nanostructures [23]. The reasons are that SPIONs have excellent biocompatibility, chemical stability, low production cost, ease of surface functionalization, easy elimination via metabolization and renal excretion [24,25]. Different formulations of SPIONs have been approved for clinical use as MRI contrast agent (Lumiren® (ferumoxsil), Abdoscan® (ferristene), Feridex® (ferumoxide), Resovist® (ferucarbotran), and Combidex® (ferumoxtran-10)) and currently in the treatment of anaemia (Feraheme® (ferumoxytol)) [26,27].

In addition, SPIONs can be internalized by cells and thus can be exploited for magnetically assisted cell-based strategies for diagnostics and therapeutics [28]. SPIONs under the action of an external MF can cause the stimulation and activation of intracellular pathways that enable osteogenesis. Therefore, SPIONs-based approaches have been used in mechanotransduction processes to stimulate cell differentiation and improve bone tissue regeneration therapies [29–32]. Although iron oxide nanoparticles are probably the most widely used to induce mechanotransduction processes, other nanoparticles [33–35] and biomaterials [36,37] have also been proposed for this aim.

Activation of mechanotransduction pathways through magnetic actuation can be accomplished by providing magnetic particles with targeting ligands to bind mechanosensitive cellular receptors [38,39]. Thus, the combination of the application of external MF with magnetic particles targeting the potassium ion channel (TREK-1) or mechanosensitive proteins such as integrins enhances proteoglycan and collagen synthesis and extracellular matrix production, thereby increasing the expression of type-1 and type-2 collagen *in vitro* and *in vivo* [39]. This approach provide a biomechanical stimulus by specifically targeting mechanosensitive cell membrane receptors thus promoting bone augmentation [40–45].

Indeed, previous studies showed that direct mechanical stimulation of integrin receptors with magnetic microbeads leads to a variety of cellular responses in human osteoblasts [46,47], with direct evidence for the role of integrin signaling in osteoblast mechanotransduction pathways. Initial research work generally focused on stimulation at short times after addition of magnetic microparticles to cell culture, *i.e.*, within 1 to 2 h of binding of the particles to integrin receptors on the cell surface due to the relatively rapid internalization of magnetic particles by osteoblasts. However, 4.5 μm RGD-coated magnetic particles mechanically stimulate cells at longer periods of time, *i.e.*, after internalization of the particles by human osteoblast [48]. Furthermore, for long-term stimulation studies and *in vivo* experiments, efforts were directed toward the preparation of three-dimensional constructs consisting of hBM-MSCs labelled with magnetic particles [39].

Another strategy for long-term stimulation has been the incorporation of SPIONs into scaffolds, which can be achieved using a variety of manufacturing techniques, such as electrospinning [49], three-dimensional printing and freeze-drying, to integrate the SPIONs within the scaffold matrix. In this case, the SPIONs are retained in the matrix but there is also a notable improvement in cell proliferation and osteogenic differentiation regardless of the type of scaffold when an external MF is applied [50,51]. Since in this situation cells are not expected to internalize SPIONs, the effects can be attributed to the superparamagnetic property of each SPION that behaves as a single magnetic domain within the scaffold and to the combined effect of all the nanoparticles under the external magnetic field, generating a magnetic microenvironment that promote cell differentiation [52].

In this research, we have tested the effectiveness of remotely activated mechanotransduction in hBM-MSCs for osteogenic differentiation using SPIONs of approximately 13 nm obtained by the thermal decomposition method. SPIONs were functionalized with an Arg-Gly-Asp (RGD) peptide as ligand to target integrin receptors on cell membrane and used in colloidal state. Then, a comprehensive *in vitro* bioanalytical characterization was performed comparing non-targeted and targeted SPIONs in terms of biocompatibility, cell uptake pathways and mechanotransduction effect on hBM-MSCs. The key point of the research lies in demonstrating that successful osteogenic differentiation is achieved when the magnetic stimulus is applied in the first 30 min of the assay, that is when the colloidal nanoparticles come into contact with the cell membrane surface to initiate the endocytic pathways. After an in-depth characterisation of the internalisation mechanisms, the relationship between RGD targeting and the SPIONs internalisation process and its influence on the osteogenic response is also determined. Hence, our

biomagnetic strategy based on RGD-functionalized SPIONs of *ca.* 13 nm triggers the osteogenic differentiation of hBM-MSCs, supporting the potential of this magnetic colloidal nanoformulation in bone tissue regeneration.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Sodium oleate 82 %, $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ 97 %, oleic acid 90 %, octadecene 90 %, dimercaptosuccinic acid 98 % (DMSA), dimethyl sulfoxide 99.9 % (DMSO), 12 kDa cellulose membrane, Arg-Gly-Asp (RGD) peptide ≥ 97 %, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) ≥98 %, *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) ≥ 98 % and $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ ≥99.9 % were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol 99.5 %, hexane 95 % and toluene 99.5 % were purchased from PanReac (Barcelona, Spain). All other chemicals (neutral red, KOH, NaOH, HNO_3 65 %, HCl 37 %, etc.) were of the highest quality commercially available and used as received. Milli-Q water (resistivity 18.2 MΩ cm at 25 °C) was used in all experiments.

Reagents for *in vitro* cell assays were as follows: phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and trypsin/EDTA 0.25 % were purchased from Lonza and Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA. Mesenchymal stem cell basal medium (MSCBM), mesenchymal cell growth supplement (MCGS), L-glutamine and gentamicin sulphate-amphotericin (GA-1000) were purchased from Lonza, Bioscience (Switzerland). Propidium iodide 1.0 mg/mL solution in water was purchased from life technologies molecular probes (Thermo Fisher Scientific). 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was purchased from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). RNAse was purchased by molecular biology (Thermo Scientific GeneJET).

2.2. Characterization

The analytical methods used to characterize the synthesized nanoparticles were as follows: powder X-ray diffraction (XRD), inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), electrophoretic mobility measurements to calculate the values of zeta-potential (ζ-potential), dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), magnetometry, Fourier transformed infrared (FTIR) and chemical microanalysis. The equipment and conditions used are described in the Supporting Information.

2.3. Functionalization of SPIONs-DMSA with RGD peptide

The covalent attachment of RGD peptide to the DMSA coated SPIONs was performed following the procedure reported by Herranz *et al* [53]. In brief, 25 mg of EDC·HCl and 30 mg of sulfo-NHS were added to 10 mL of aqueous colloidal suspension of SPIONs-DMSA at a concentration of [Fe] = 1 mg/mL. The mixture was stirred at room temperature for 2 h and then washed twice by centrifugation at 12,000 rpm and 4 °C for 20 min to remove possible excess activating agent. The nanoparticle pellet containing SPIONs-DMSA with activated carboxylic acids was diluted in a HEPES buffer at pH 8 to 15 mL. Then, 2 mg of the RGD peptide were added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, in order to remove possible excess unbound RGD peptide, the sample was purified by centrifugation (twice) and suspended in Milli-Q water. The iron content of the obtained suspension was determined by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) resulting in [Fe] = 1.005 mg/mL or $[Fe_3O_4]$ = 1.39 mg/mL.

2.4. In vitro cell assays

Human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) (Lonza, donor 38157, passage 5) were cultured in mesenchymal stem cell growth medium (MSCBM supplemented with MCGS, GA-1000 and L-glutamine). The cells were washed with PBS and then trypsinized with 3 mL of trypsin/EDTA 0.25 %. Cells were then centrifuged at 1,000 rpm for 5 min. The resulting pellet was suspended in 1 mL of culture medium, the number of cells was measured, and the appropriate cell density for each different assay was seeded on the corresponding culture plate (as specified in the following sections). The cells were incubated at 37 °C in 5 % CO_2 for 24 h to allow cell adhesion. SPIONs (25 and 50 μg/mL of Fe_3O_4) were then added and kept in contact with the cells for different times, depending on the assay performed. Cells were then washed with PBS 1×, collected with 0.25 % trypsin/EDTA and processed for flow cytometry analysis. Controls were cells grown at the same cell density but in the absence of SPIONs.

2.4.1. Biocompatibility tests

Cell viability. 1×10^5 cells/well were seeded in a 24-well plate, SPIONs were kept in contact with the cells for 24 h. Cell viability was measured by adding 0.005 % (wt/vol) propidium iodide (PI) in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to the samples to stain the DNA of dead cells. PI exclusion indicates plasma membrane integrity and cell viability since cells with plasma membrane damage incorporate the probe and the PI intercalates with their DNA. PI fluorescence was excited at 488 nm, and the emitted fluorescence was registered with a 585/42 filter in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer.

Intracellular reactive oxygen species (ROS) content. 1×10^5 cells/well were seeded in a 24-well plate, after 24 h of exposure to SPIONs, hBM-MSCs were incubated with 10 μM of H_2DCFDA for 45 min at 37 °C. The non-fluorescent H_2DCFDA is converted into 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF) after hydrolysis by cellular esterases and oxidation by ROS. When DCF is excited at 488 nm emission wavelengths, green fluorescence is emitted that can be detected at 525 nm. DCF fluorescence was measured in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm.

Cell-cycle analysis. 6×10^4 cells/well were seeded in a 24-well plate, the contact time with SPIONs was 24 h. Cells in 0.5 mL of PBS were mixed with 4.5 mL of ethanol 70 % and maintained at 4 °C overnight. The cell suspensions were then centrifuged for 10 min at 1500 rpm and resuspended in 0.5 mL of RNAse solution containing 0.1 % Triton X-100, 20 μg/mL of IP and 0.2 mg/mL of RNAse (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 30 min of incubation at 37 °C, PI fluorescence was detected in a FACScan Becton Dickinson flow cytometer with a 585/42 filter, exciting the sample at 488 nm. The CellQuest Program from Becton Dickinson was used to calculate the percentage of cells in each cycle phase: G0/G1 (growth), S (DNA synthesis) and G2/M (growth and mitosis).

2.4.2. Evaluation of SPIONs uptake by hBM-MSCs through flow cytometry and light, fluorescence confocal and transmission electron microscopy

Intracellular uptake. Light scattering at 90° dispersion angle is called side-scatter light (SSC) and reflects the intracellular complexity. SSC intensity is proportional to the complexity of intracellular structures such as the cellular cytoplasm, mitochondria, and pinocytic vesicles, among other. Thus, the intracellular uptake of SPIONs by hBM-MSCs after 24 h was evaluated by flow cytometry analyzing the SSC intensity, as recently published [54]. Data acquisition and analysis conditions were established using the CellQuest Program of Becton Dickinson, and these conditions were maintained in all the experiments. For statistical significance, at least 10,000 cells were analyzed and the experiment was performed in triplicate. A FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer was used (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). In this experiment, hBM-MSCs were seeded in 24-well plates at a density of 1×10^5 cells/well.

Endocytic mechanisms. hBM-MSCs were seeded on 6-well culture plates at a density of 1×10^5 cells/well. After 48 h, different endocytosis inhibitors were added separately to the culture medium and the cells

were maintained for 2 h under standard cell culture conditions. The inhibitors used in these assays were 2.5 μM colchicine (Alexis-Enzo), 23 μM wortmannin (Biomol-Enzo), 1 mM amiloride (Alexis-Enzo), 20 μM cytochalasin B (MP Biomedicals), 4 μM cytochalasin D (MP Biomedicals), 3.7 μM genistein (Alexis-Enzo) and 30 μM chlorpromazine (Alexis-Enzo). The dose of each inhibitor was chosen taking into account the previous studies carried out by different research groups [55]. After 2 h of treatment with these inhibitors, the culture medium was removed and fresh medium with 50 μg/mL SPIONs was added to the cultures, which were maintained for 2 h under a 5 % CO_2 atmosphere and 37 °C. Intracellular uptake of SPIONs was evaluated by flow cytometry analyzing the SSC intensity as described above. Two control types were carried out in parallel: (a) control, which corresponds to cells without inhibitors and without SPIONs and (b) SPIONs control, which corresponds to cells without inhibitors but with SPIONs. Furthermore, a cell viability test was carried out to confirm the absence of cell death attributed to inhibitors.

Prussian blue staining. hBM-MSCs were seeded on 6-well culture plates at a density of 1×10^5 cells/well. Cells, preincubated with 50 μg/mL SPIONs for 30 min and 24 h were visualized by Prussian blue staining for iron detection. For this microscopic technique, cells were washed with PBS 1×, fixed with 4 % paraformaldehyde at 4 °C for 30 min, stained with 1:1 1 M HCl and 10 % $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ in water at RT for 15 min, washed with distilled water and counterstained with 0.1 % neutral red for 2 min. Finally, the samples were washed with distilled water and allowed to air dry. Fluorescence microscopy was used to visualize this phenomenon on a EVOS microscope (Invitrogen).

Fluorescence confocal microscopy. For confocal microscopy, cells were washed twice with PBS and fixed with 4 % (w/v) paraformaldehyde in PBS with 1 % (w/v) sucrose at 37 °C for 20 min. Then, cells were permeabilised with 0.5 % Triton X-100 at 4 °C for 5 min. The samples were then incubated at 37 °C for 20 min with Phalloidin-Atto 565 (1:40 dilution), which stains actin filaments (red) and cell nuclei (blue) were stained with DAPI for 5 min. Confocal microscopy was analysed with an OLYMPUS FV1200 laser confocal microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan).

Transmission electron microscopy (TEM) was carried out to determine the localization of the SPIONs at different times in a JEOL 1400 microscope with an EDS detector accomplished. For these experiments, the samples were stained, dehydrated and embedded in a resin following a protocol described in the supporting information.

2.4.3. Evaluation of hBM-MSCs osteogenic differentiation after mechanotransduction

To perform osteogenic differentiation experiments via magnetic stimulation, 3×10^4 cells/well were seeded in a 6-well plate and cultured in osteogenic differentiation medium (n = 3). After 24 h of culture, 30 μg/mL SPIONs were added. 30 min later, a magnetic stimulus was applied for 1 h with 1 Hz frequency (250 mT of magnetic induction) in a MICA Biosystems technology bioreactor (https://www.micabiosystems.co.uk/). The bioreactor was placed inside the cell incubator to provide cells with CO_2 and temperature conditions usual for cellular experiments or control cells no subjected to magnetic stimulation. After magnetic stimulation, cells were maintained in culture for 24 h for gene expression analysis and 4 days for evaluation of alkaline phosphatase (ALP) enzymatic activity.

Gene expression by PCR. Total cellular RNA was isolated using a standard procedure (Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and cDNA synthesis was performed using a high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). The expression levels of *Runx2* and *ALP* were determined by qRT-PCR using the Taqman probes Hs01047973_m1 and Hs01029144_m1 (FAM™ dye-labeled TaqMan® MGB probes, Applied Biosystems). For quantification of gene expression, the target gene values were normalized to the expression of the endogenous reference *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Hs02786624_g1). The comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the relative expression. For quantification of gene expression, the target gene value was normalized to the expression of the endogenous reference. The amount of target, normalized to the endogenous reference and relative to the control is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification, RQ). ($\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{endogenous reference}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{study condition}} - \Delta Ct_{\text{control}}$).

ALP enzymatic activity. ALP activity was used as a key marker to assess osteogenic differentiation. Cells were lysed by three consecutive freeze/thaw cycles. The lysates were incubated with a 10 mM p-nitrophenyl phosphate (pNPP) solution and then the reactions were stopped by adding 2 M NaOH. Cellular ALP activities were measured spectrophotometrically by measuring the increase in absorbance at 405 nm that accompanies p-nitrophenol production and normalized by cellular protein content, which was determined using a total protein kit.

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as means ± standard deviations of a representative of three experiments carried out in triplicate. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 22. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA). Scheffé test was used for post-hoc evaluations of differences among groups. In all the statistical evaluations, $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Among the different strategies to prepare monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) [12,17], the synthetic methodology used in this work has been the thermal decomposition of iron precursors combined with ligand-assisted control over the growth of nanoparticle core after nucleation [56]. This approach involves a separation between nucleation and growth phase, while population size is set by the precursor/surfactant ratio, leading to a precise control of the size distribution of the nanoparticles [57].

In this work SPIONs were synthesized by a two-step procedure to obtain a stable nanoparticle colloidal suspension in aqueous media (see Figure S1 in Supporting Information). First, thermal decomposition of an iron (III) oleate complex as an iron-containing precursor was assisted by ligand with a surfactant such as oleic acid. Oleic acid-stabilized SPIONs (SPIONs-OA) were obtained as a stable colloidal suspension in toluene and characterized by TEM, DLS, XRD, and magnetic behavior (see Figure S2 and Supporting Information).

TEM images revealed the presence of nanocrystals with a relatively uniform quasi-spherical faceted morphology and the statistical treatment of nanoparticle sizes from several TEM images revealed a narrow size distribution of particle diameter centered at 11.6 ± 3.2 nm, assuming a log-normal distribution to make the fit in the histogram. This value is in good agreement with results obtained by DLS of SPIONs-OA in toluene, being a monomodal and narrow size distribution in the range 6–30 nm with the maximum at 13.2 ± 0.8 nm. The XRD pattern revealed that the nanoparticles consisted of magnetite (Fe_3O_4), the lattice parameter being 8.4 Å. The crystalline size (D_{XRD}) calculated from Scherrer's equation [58] was 6.7 nm. This value, together with the nanoparticle size estimated by the TEM study, would indicate that each particle is a single crystal, in agreement with HRTEM studies of monodisperse nanocrystals obtained through thermal decomposition reported elsewhere [56,57,59]. The magnetization curves exhibited loops with coercive fields close to zero and saturation magnetization values of 93 emu/g_{Fe}, demonstrating the superparamagnetic behavior of the synthetized SPIONs-OA.

Oleic acid prevents the aggregation of the SPIONs in organic solvents, but due to the hydrophobic nature of the obtained SPIONs-OA a ligand interchange is necessary to obtain a stable suspension of SPIONs

in water that can be used for biological purposes. Therefore, in the second synthetic step, the nanoparticles suspended in the organic solvent were transferred to water via a ligand exchange method [49,60,61]. The SPIONs-OA were processed by exchanging the hydrophobic oleic acid with a hydrophilic ligand such as dimercaptosuccinic acid (DMSA), which bears carboxylic groups that present affinity towards the iron oxide surface and may be adsorbed on the surface of magnetite nanoparticles through coordinating via the carboxylate groups [62] and an aqueous stable suspension of SPIONs-DMSA was obtained.

3.2. Functionalization of SPIONs-DMSA with RGD peptide

Transmembrane receptors connect extracellular events with intracellular responses, being vital in signaling processes. Among them, integrins are a highly diversified class of key adhesion receptors of extracellular matrix proteins and control diverse biological functions, such as cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, and survival. These cell surface receptors respond to environmental cues (outside-in signaling) and at the same time, transduce internal signals (e.g. mechanical stress) to the matrix (inside-out signaling), being bidirectional signaling machines [63]. Integrins are heterodimers composed of an α- and a β-subunit that recognize binding partners through the minimal Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide sequence motif [64]. Therefore, this specific RGD-integrin interaction has allowed for the design of integrin-targeted therapeutic strategies based on biomaterials and nanomaterials [65–67]. Furthermore, integrins constitute the main cell-adhesion transmembrane receptors acting as an extracellular matrix (ECM)-cytoskeletal linkers and transducers the mechanical signals in a cascade of biochemical signals that can be used for different therapies, as reviewed elsewhere [68]. In this sense, SPIONs conjugated with the RGD sequence target cell surface receptors and generate mechanical forces under the control of a MF when tethered to the RGD-binding sites of mechanosensitive integrins in cell surface, which can further trigger specific signaling pathways for cell differentiation [39,40]. In this research work, the RGD peptide was covalently linked to the SPIONs via amide bonds (Fig. 1). For this purpose, the carboxylic acid groups present in the DMSA coating of the SPIONs were activated through EDC/sulfoNHS chemistry [53] and reacted with the primary amine of the RGD sequence. Successful functionalization of the SPIONs with the RGD peptide was confirmed by elemental chemical analysis, FTIR spectroscopy, and ζ-potential and DLS measurements.

Elemental chemical analysis (Table 1) showed an expected increase in the percentage of carbon and nitrogen attributed to the organic matter gaining after RGD attachment. The decrease in the percentage of sulphur in sample SPIONs-DMSA-RGD compared to SPIONs-DMSA is due to the increase in organic matter coming from the RGD, which does not contain sulphur in its composition. Although it cannot be ruled out that some DMSA may be lost during the washes to remove excess carbodiimides in the RGD functionalization step.

The FTIR spectrum of SPIONs-DMSA (Fig. 2.A) shows a broad band in range between 3000 and 3500 cm^{-1}, attributed to the overlap of the O—H stretching bands of the H-bonded water molecules (H—O—H), surface FeO–H groups and carboxylic acid (COO–H) groups. The bands at 560 and 450 cm^{-1} are attributed to the vibration modes of magnetite [69]. The fruitful DMSA coating was confirmed by the appearance of broad bands at 1575 and 1362 cm^{-1}, corresponding to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of coordinated carboxylate ($–COO^-$) groups of DMSA, respectively. One of our most recent publications regarding DMSA coating of SPIONs synthetized by flame spray pyrolysis (FSP) [54] revealed that the large split between these two $—COO^-$ bands ($\Delta\nu$ = 213 cm^{-1}) is consistent with the prevalence of a monodentate interaction between the carboxylate of DMSA and the iron atom. Finally, broad vibration bands *ca.* 1028 cm^{-1} would correspond to S—CH bond rocking vibrations of the DMSA, whereas the absence of signals of thiol groups (S—H) from DMSA, which should appear in the 2500–2600 cm^{-1} region, would point to the partial oxidation of the thiol groups into disulfide (S—S) during the ligand exchange process, as previously reported [54].

FTIR confirmed the successful covalent grafting of RGD to the surface of the nanoparticles, through the formation of an amide bond between the $—NH_2$ group in the peptide structure and the —COOH groups of the DMSA coating on SPIONs (Fig. 2.A). Therefore, FTIR spectrum of SPIONs-DMSA-RGD sample exhibits characteristic absorption bands

Table 1
Elemental composition from chemical analyses (atomic percentages) of DMSA-coated and RGD-functionalized SPIONs.

Sample	%C	%N	%S
SPIONs-DMSA	2.53 ± 0.13	0.17 ± 0.01	2.23 ± 0.11
SPIONs-DMSA-RGD	3.10 ± 0.15	0.48 ± 0.02	0.70 ± 0.03

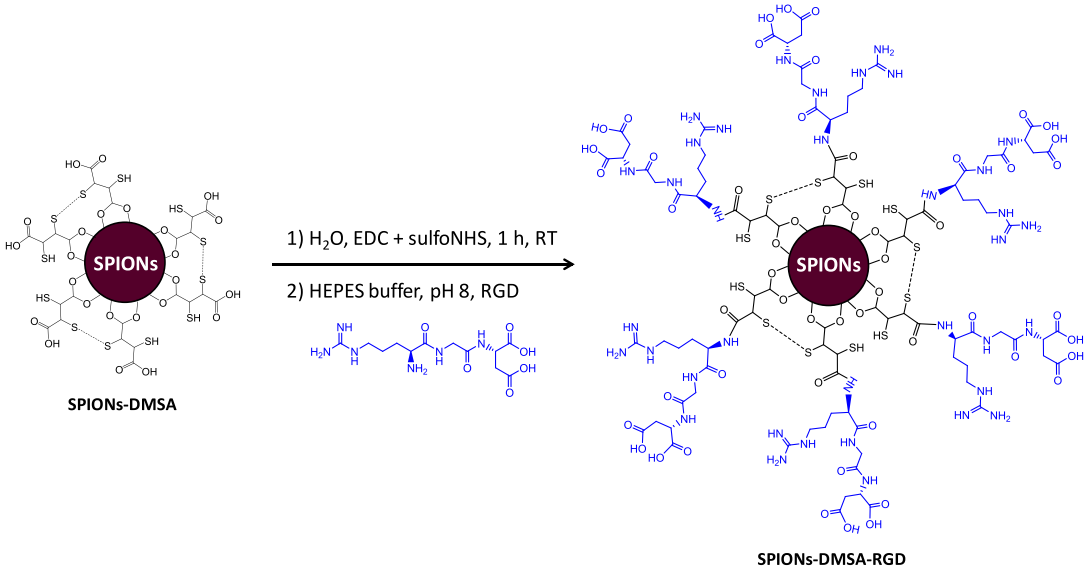


Fig. 1. Scheme of synthesis of the functionalization of SPIONs with RGD peptide. Carboxylic acid activation of SPIONs-DMSA via carbodiimide chemistry and subsequent anchoring of RGD peptide via amide bonds.

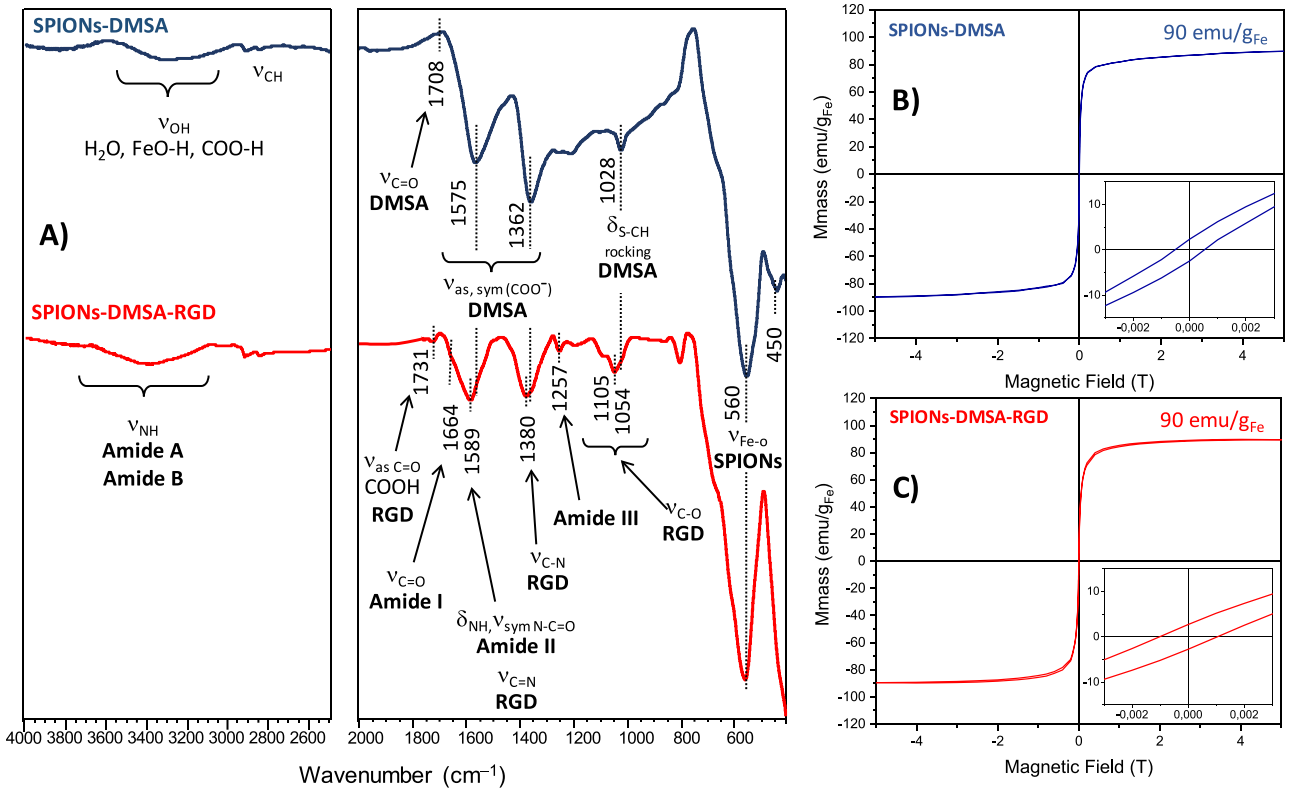


Fig. 2. A) FTIR spectra of DMSA-coated (SPIONs-DMSA) and RGD functionalized (SPIONs-DMSA-RGD) nanoparticles. B) and C) Magnetization curves of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD samples, respectively normalized to the mass of iron. The magnification of the magnetization curves near the origin are shown as insets on each graph.

which were assigned as follows: *(i)* 3600–3000 cm^{-1} was assigned to O—H stretching vibrations of water and to the superimposed N—H stretching vibrations of amide A (~3300 cm^{-1}) and B (~3070 cm^{-1}) [70]; *(ii)* 1731 cm^{-1} corresponded to asymmetric C═O stretching vibration of the carboxylic acid groups of RGD; *(iii)* 1664, 1589 and 1257 cm^{-1} were respectively assigned to amide I (mainly related to the C═O stretching), amide II (from the N—H bending and the C—N stretching vibrations; this band might overlap C═N stretching of the Arg residue of RGD) [71], and amide III [72]; *(iv)* 1380 cm^{-1} was ascribed to the C—N stretching vibration originating from RGD; *(v)* 1105 and 1054 cm^{-1} were attributed to the C—O and C–OH stretching vibrations of RGD.

The magnetization curves of DMSA-coated and RGD-functionalized SPIONs are very similar in shape and coercivity to those exhibited by the oleic acid coated nanoparticles, indicating that the superparamagnetic properties are unaffected after ligand exchange and subsequent functionalization (see Figures S1E, Fig. 2B and C). The saturation magnetization values at 5 T normalized to Fe content calculated for all SPIONs are consistent, being 93 emu/g_{Fe} for the as-synthetized SPIONs-OA and 90 emu/g_{Fe} for both SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD.

Once the success of the DMSA coating and the functionalization of RGD was confirmed, and after verifying that neither the ligand exchange nor the subsequent functionalization affected the superparamagnetic properties of the different SPIONs, they were analyzed by TEM and DLS (Fig. 3). There are no significant differences in either the morphology or size of SPIONs-OA, SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD, as evident in the TEM images at the highest magnification. This finding evidences that the nanoparticles preserved their size and morphology after being coated with DMSA and functionalized with RGD, and that no cross-linking between particles occurred during the RGD-grafting process. However, the TEM images at the lowest magnification reveal clustering of nanoparticles for SPIONs-DMSA, this effect being more pronounced in the case of SPIONs-DMSA-RGD (Fig. 3 and Figure S3). Although the SPIONs dispersed well in solution, the observed nanoparticle clustering was ascribed to the surface tension and magnetism of the droplet on the carbon-coated TEM grids as it dried during the sample preparation for imaging [73].

DLS measurements of the resulting nanoparticles (SPIONs-OA in toluene; SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD in water) showed monomodal size distributions (Fig. 3). The size of the synthesized SPIONs-OA (13.2 ± 0.8 nm) experienced a notable increase after the DMSA ligand exchange that produced SPIONs-DMSA (31.8 ± 2.0 nm), with this effect being more pronounced after RGD functionalization, SPIONs-DMSA-RGD (94.2 ± 6.4 nm). Whereas the average diameters by DLS and TEM slightly differ in SPIONs-OA, (Figure S2), the ones measured by DLS are larger than those observed in TEM for DMSA-coated and RGD-functionalized SPIONs. This finding is in good agreement with the fact that the particle assembly consists of associated water, solvated ions and counterions with the DMSA coating (SPIONs-DMSA) and the RGD peptide (SPIONs-DMSA-RGD). Furthermore, ζ-potential values measured in water were similar (*ca.* − 27 mV) for both nanoparticles (Figure S5), indicating the presence of the carboxylate groups at the surface of the nanoparticles which would be experiencing their acid-base equilibrium in the aqueous medium (–COOH + H_2O ⇌ $–COO^-$ + H_3O^+). For this reason, the colloidal stability in water of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD, which is preserved even for more than one year, (Table 2, Figure S4A) can be attributed to the electrostatic repulsion among $–COO^-$ groups, besides the steric stabilization promoted by the DMSA or RGD moieties on the surface of the nanoparticles.

A comparative study of the evolution over time of the D_H of both types of SPIONs was performed in a complete culture medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (DMEM + 10 % FBS) at 37 °C. The aim of this study was to

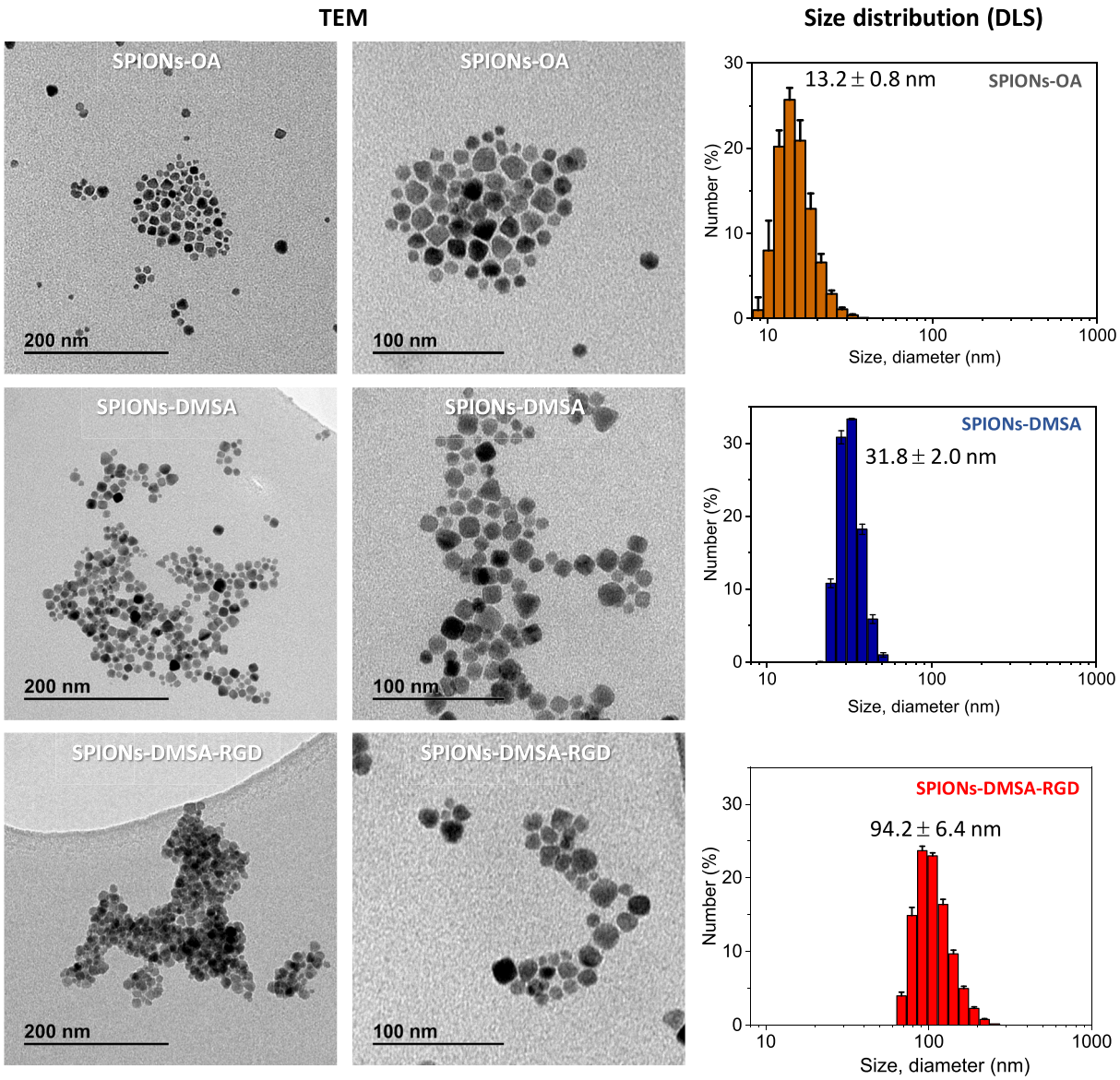


Fig. 3. TEM images (left) and size distributions obtained by dynamic light scattering (right) of as-synthetized SPIONs-OA, ligand exchanged with DMSA (SPIONs-DMSA) and functionalized with the RGD peptide (SPIONs-DMSA-RGD) nanoparticles. Nanoparticle size distributions are measured by DLS in toluene for SPIONs-OA and in water media for SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD.

Table 2
Hydrodynamic diameter (D_H) and ζ-potential of the different SPIONs in water and after incubation in complete culture medium (DMEM + 10 % FBS) at 37 °C during different times. The results displayed in this table derive from the graphs shown in Figures S4 and S5.

	Water		DMEM + 10 % FBS			
Sample	D_H (nm) > 1 year	ζ-potencial (mV)	D_H (nm) 30 min	D_H (nm) 6 h	D_H (nm) 24 h	ζ-potencial [a] (mV)
SPIONs-DMSA	31.8 ± 2.0	−26.9 ± 1.2	43.8 ± 1.0	50.8 ± 1.0	49.3 ± 7.1	−23.8 ± 1.1
SPIONs-DMSA-RGD	94.2 ± 6.4	−26.5 ± 0.6	102.1 ± 7.2	240.1 ± 45.3	—	−17.2 ± 1.9

[a] ζ-potential was measured in water after incubation in complete cell culture medium 37 °C during 24 h. Before measurements, the colloidal suspensions were centrifuged, washed with water, and finally resuspended in water and sonicated during 5 min.

evaluate the colloidal stability of these nanoparticles in a standard cell culture medium before *in vitro* studies with hBM-MSCs (Table 2, Figure S4B). The results revealed that SPIONs-DMSA nanoparticles maintained almost constant the hydrodynamic diameter (D_H ~ 44—50 nm) during the tested incubation times (30 min, 6 h and 24 h) in the culture medium. This finding would demonstrate that during the testing time, there is no significant binding of the proteins present in the culture medium on the surface of the DMSA-coated nanoparticles. The almost negligible increase in the ζ-potential value after 24 h of incubation would corroborate this fact.

On the contrary, SPIONs-DMSA-RGD nanoparticles showed a completely different behavior. After 30 min of incubation, the size of these RGD-functionalized nanoparticles exhibited a bimodal size distribution, with a most intense peak centered at 102.1 ± 7.2, which is not significantly different from the D_H measured in water. This finding would indicate that 30 min is not enough time to allow the proteins present in the culture medium to bind to the surface of SPIONs-DMSA-RGD nanoparticles. However, there is another low intensity peak in the range 300–1700 nm (Figure S4), indicating a certain degree of

aggregation. However, the hydrodynamic distribution in numbers showed that the aggregated population represented only a minority of the whole sample of suspended particles (12.0 %). The scenario is completely different after 6 h of assay, where in addition to obtain a bimodal size distribution, the principal peak is shifted towards a larger size, with a main distribution centered at 240.1 ± 45.3 nm, which is more than twice the D_H measured after 30 min of incubation time. The formation of a protein corona around the RGD-grafted nanoparticles would explain this observation. Finally, after 24 h of incubation, flocculation and sedimentation of large aggregates of nanoparticles were clearly observed in the Eppendorf (Figure S4B). The significant increase in the ζ-potential value after 24 h of incubation (−17.2 ± 1.9 mV) compared to that in water (−26.5 ± 0.6 mV) could point to the formation of a protein corona rich in bovine serum albumin (BSA), as described elsewhere [74]. Finally, it is important to indicate that our SPIONs-DMSA-RGD preserve the capability of recognition of targeted receptors in a complex biological environment during the first hours of *in vitro* assay, and that RGD-mediated cell internalisation capacity would be preserved even if some protein binding could not be ruled out, *vide infra*.

3.3. *In vitro cellular response of hBM-MSCs to SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD*

The *in vitro* biocompatibility of both magnetic nanocolloids has been studied in terms of cell viability, intracellular ROS content and cell cycle progression (Fig. 4A, 4B and 4C). The choice of the concentrations of the SPIONs tested in the biocompatibility assays (25 and 50 μg/mL of Fe_3O_4) was based on previously published MC3T3-E1 cell viability results [49] and on preliminary cell viability results of hBM-MSCs in contact with SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD at five different doses (Figure S6). In all cases cell viability proved to be adequate for a wide range of concentrations (from 1 to 100 μg/mL of Fe_3O_4), for this reason two concentrations within this range were chosen to perform the *in vitro* biocompatibility study. High cell viability values (>98 %, Fig. 4A) were observed in all conditions tested with respect to the control. In general, it is known that nanoparticles enter the intracellular environment and interact with the proteins, organelles, and even DNA, inducing an overproduction of ROS [75]. Therefore, many studies propose oxidative stress as a key mechanism involved in the toxicity of these nanosystems [76]. This overproduction of ROS limits the functionality of the cell, causing adverse effects such as lipid peroxidation of the membrane, denaturation of proteins, the formation of apoptotic bodies and damage to genetic material, among others [77]. In this study, no significant differences were observed in the intracellular ROS content expressed as percentage of ROS-positive cells (Fig. 4B) when hBM-MSCs were cultured with both nanomaterials at the studied concentrations compared to the control. Furthermore, fluorescence intensity results showed a significant decrease of intracellular ROS content of hBM-MSCs exposed to both concentrations compared to the control (Figure S7). These results highlight the absence of oxidative stress, which means that the intracellular presence of SPIONs maintains a controllable range of ROS production, by the cell's own internal regulatory mechanism [43,75,78]. These results agree with those recently published by our research group for SPIONs synthesized by FSP [54], as well as with other authors [22,79]. Such mechanisms induce an up-regulation of the cell's antioxidant defense, which indicates the biosafety of these SPIONs. In addition, a study of the progression of the different phases of the cell cycle was carried out (Fig. 4C). The cell cycle in eukaryote cells includes four successive phases leading to cell growth where the DNA replication

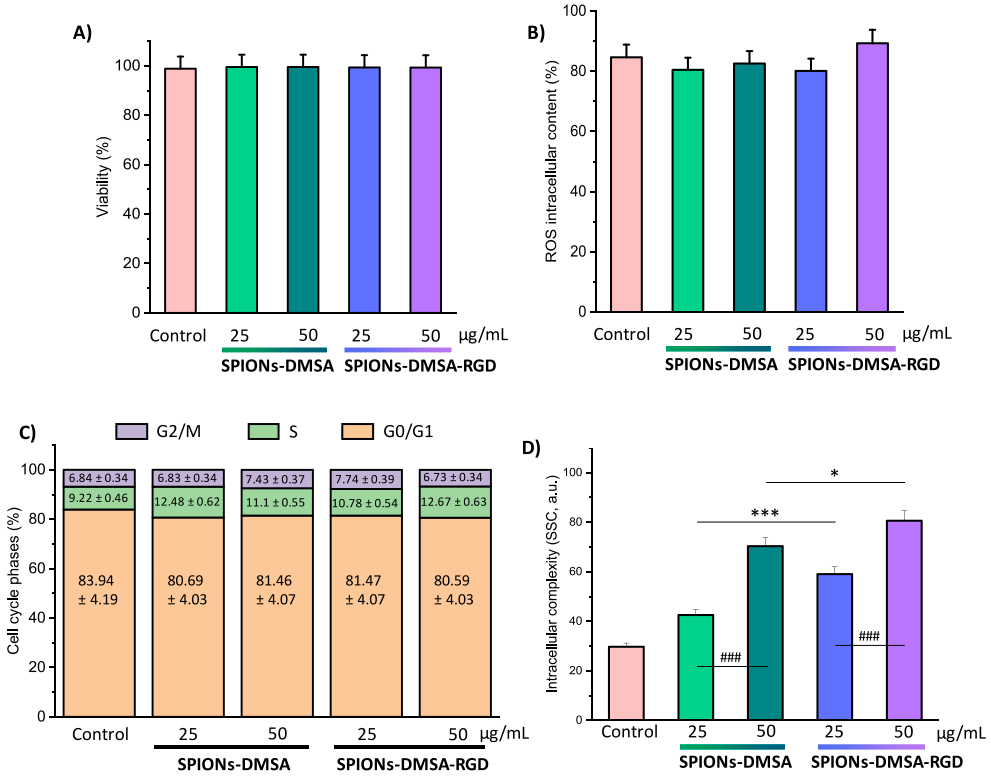


Fig. 4. *In vitro* biocompatibility of hBM-MSCs and intracellular uptake of SPIONs assessed by flow cytometry after 24 h of exposure to 25 μg/mL and 50 μg/mL of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD. A) Percentage of viability determined by PI exclusion; B) Percentage of ROS intracellular content; C) Cell cycle phases progression, defined as G_0/G_1 phase (Quiescence/Gap 1), S phase (Synthesis) and G_2/M phase (Gap 2 and Mitosis); D) Intracellular uptake assessed through intracellular complexity, side-angle spread (SSC), where the bars represent the geometric mean of the SSC data as mean ± SD. Controls refers to hBM-MSCs without SPIONs. Statistical significance for intracellular uptake: *$p < 0.05$ and ***$p < 0.005$ (SPIONs-DMSA *vs* SPIONs-DMSA-RGD at the same dose tested); $^{###}p < 0.005$ (25 μg/mL *vs* 50 μg/mL for both SPIONs).

phase (synthesis (S)) is known as the most important stage [80]. The results highlight that there is a slight increase in S phase in cells exposed to both nanosystems and at the concentrations studied compared to the S-phase shown by hBM-MSCs cultured in the absence of nanoparticles. However, although there is a slight increase in the S phase, the G_0/G_1 and G_2/M phases do not show any change with respect to control cells. All these results demonstrate the biocompatibility of both nanosystems, demonstrating their possible use in biomedical applications in accordance with the results obtained for this nanoparticle synthesis methodology by other authors.

Once the *in vitro* biocompatibility of these nanosystems was studied, studies were carried out on their internalization. Generally, intracellular uptake of nanomaterials, including SPIONs, can occur after just 1–4 h of incubation. However, like other authors, we have observed that the greatest uptake by mammalian cells typically occurs with prolonged incubation times of around 24 h [54,81]. Based on these results, the uptake of SPIONs by hBM-MSCs (Fig. 4D and 6) was time- and concentration-dependent within the tested range, assuming that the maximum uptake by a single cell was completed within 24 h. These results agree with those of Wang *et al* [82] where no significant differences were observed in the uptake of magnetic nanoparticles between 24 and 48 h of incubation, being structurally stable in MSCs at this time. Thus, in the present study, the intracellular uptake of both SPIONs types was analysed after 24 h incubation, ensuring maximum incorporation. The results show that both SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD are incorporated by hBM-MSCs within the first 24 h of incubation as a significant increase in SSC value was observed compared to control cells. Moreover, the intracellular complexity of hBM-MSCs is significantly increased when cells are cultured with SPIONs-DMSA-RGD for both concentrations (25 and 50 μg/mL) compared to the non-functionalized SPIONs-DMSA sample. Note that the intracellular incorporation of both types of SPIONs is dose dependent, with the SSC intensities for 50 μg/mL being significantly higher than those for 25 μg/mL in both samples (see Fig. 4D). Furthermore, together with the biocompatibility results (see Fig. 4A, 4B and 4C), the results indicate that the intracellular presence of these nanoparticles after 24 h does not cause cell cytotoxicity or induce cell death.

The endocytic entry pathway is a critical step in the functionality of many therapeutic nanomedicines [83]. Therefore, a specific study of endocytic inhibitors has been carried out in order to determine the endocytosis mechanism of both nanosystems (Fig. 5A). The results suggest notable differences between both nanomaterials. For the case of SPIONs-DMSA, there is only one mechanism involved, observing that treatment with colchicine produced a significant decrease in SSC value compared to the control, and suggesting entry through pathways dependent on microtubules polymerization. However, for SPIONs-DMSA-RGD four mechanisms are involved. The significant decrease in the colchicine sample is maintained, while three more mechanisms are involved as chlorpromazine, indicating that the intracellular uptake is mediated by clathrin-dependent processes; and cytochalasins B and D, which inhibit macropinocytosis by actin polymerization blockage avoiding microfilaments action. It is important to note that in all conditions studied for specific inhibitors of endocytosis, the hBM-MSCs viability is high (Fig. 5B), indicating that none of the inhibitors used exerted cytotoxicity under the experimental conditions tested, thus making it possible to validate the experiment.

Therefore, it can be concluded that the differences observed in the endocytosis specific mechanisms implicated in the intracellular uptake both SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD could be due to the fact that the surface receptors are capable of detecting the presence or not of RGD peptide. The higher internalization rate observed in SPIONs-DMSA-RGD could be due to the different endocytosis mechanisms involved. While for SPIONs-DMSA there is only one mechanism involved, in the case of SPIONs-DMSA-RGD there are four, thus having more entry routes and therefore greater uptake. Regarding the RGD-functionalized sample, the mechanisms involved could be related to the specific targeting to integrins and to their greater or lesser aggregation in the physiological environment. In this sense, clathrin-dependent endocytosis could be

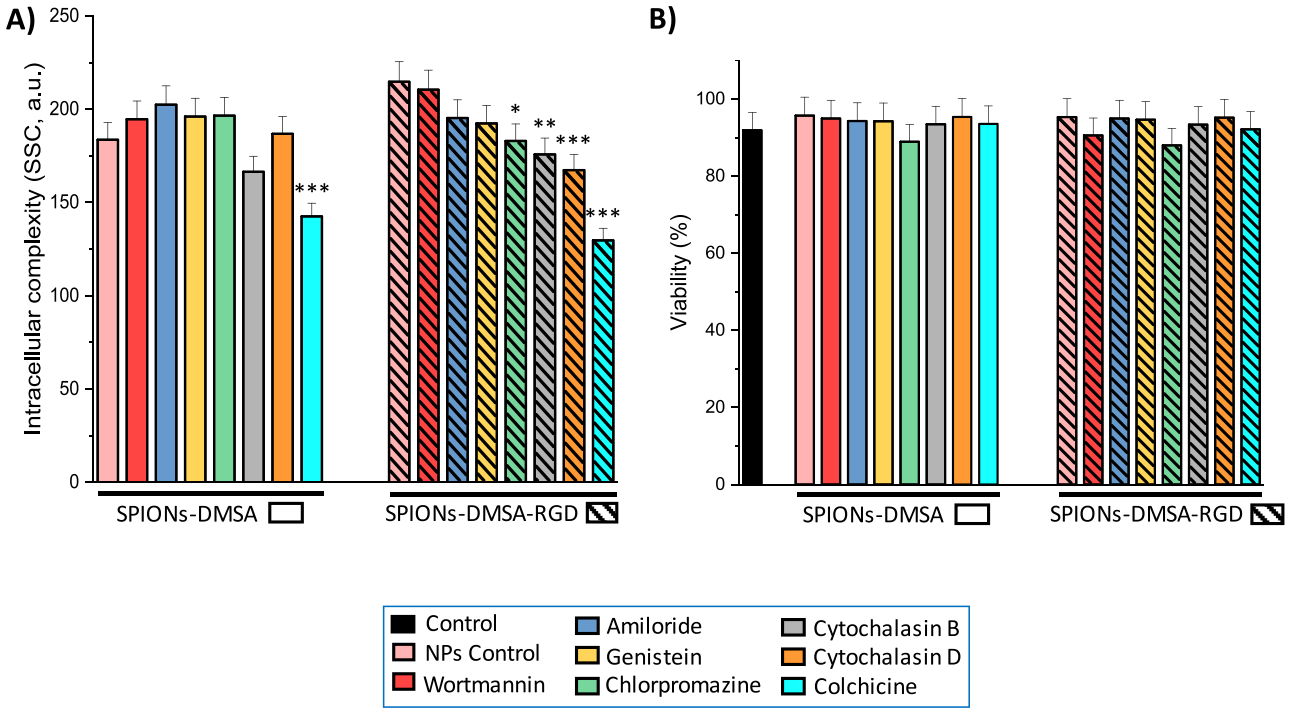


Fig. 5. Endocytosis mechanisms involved in the intracellular uptake of SPIONs by hBM-MSCs (A) together with cell viability (B) assessed by flow cytometry after 2 h of exposure to 50 μg/mL of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD. Intracellular uptake has been assessed through intracellular complexity, where the bars represent the geometric mean of the SSC data as mean ± SD. Cell viability was assessed by propidium iodide exclusion assay. Statistical significance for endocytosis mechanisms: *$p < 0.05$ *vs* hBM-MSCs cultured in presence of SPIONs.

directly related to external functionalization with RGD [84]. The macropinocytosis process detected could be related to the larger hydrodynamic size of SPIONs-DMSA-RGD compared to that of SPIONs-DMSA, as observed by DLS both in water and in culture medium (DMEM + 10 % FBS) (Table 2 and Figure S4). In this case the results show that the SPIONs-DMSA sample with a D_H of *ca.* 32 nm in water is almost preserved between 43 and 50 nm in complete culture medium over time, as it has been discussed above. However, there is a remarkable evolution in the D_H of SPIONs-DMSA-RGD ranging from 94 nm in water to *ca.* 250 nm in complete culture medium, which could confirm the activation of macropinocytosis mechanism as it has been reported previously [83]. At this point, based on the biocompatibility results (Fig. 4A–C), it is important to highlight that intracellular internalisation does not generally affect biocompatibility, having the optimal cell machinery for carrying other biological functionalities such as gene expression, enzymatic activities, transcriptional regulation and other mitochondrial activities.

Before the differentiation assays, an optical microscopy study was carried out by Prussian blue staining to determine the cellular localization of both the SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD at two different culture times tested (Fig. 6). The results obtained show that after 30 min of incubation, both the SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD are mostly found on the cell surface of hBM-MSCs, indicating that both types of SPIONs are interacting with the cellular plasma membrane in this moment. It is noteworthy that, while SPIONs-DMSA are observed as punctual or diffuse blue spots, SPIONs-DMSA-RGD appear as much larger blue spots. This observation correlates with the results derived from the colloidal stability studies in cell culture medium discussed above, (Table 2 and Figure S4) which revealed that after 30 min of incubation time the small-sized SPIONs-DMSA were well dispersed, whereas the SPIONs-DMSA-RGD not only exhibited a larger hydrodynamic size, but also suffered from some degree of aggregation. However, as clearly seen in the figure, after 24 h both SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD are already inside the cell, indicating that the nanoparticles have been internalized by these cells. Furthermore, it can be observed that at 24 h SPIONs are in the cytoplasm, located in the perinuclear zone without entering the nucleus. Note that there is a higher intensity of Prussian blue staining in the case of RGD-functionalized SPIONs according to intracellular uptake measured by flow cytometry (Fig. 4D). Considering the results observed with Prussian blue staining, the

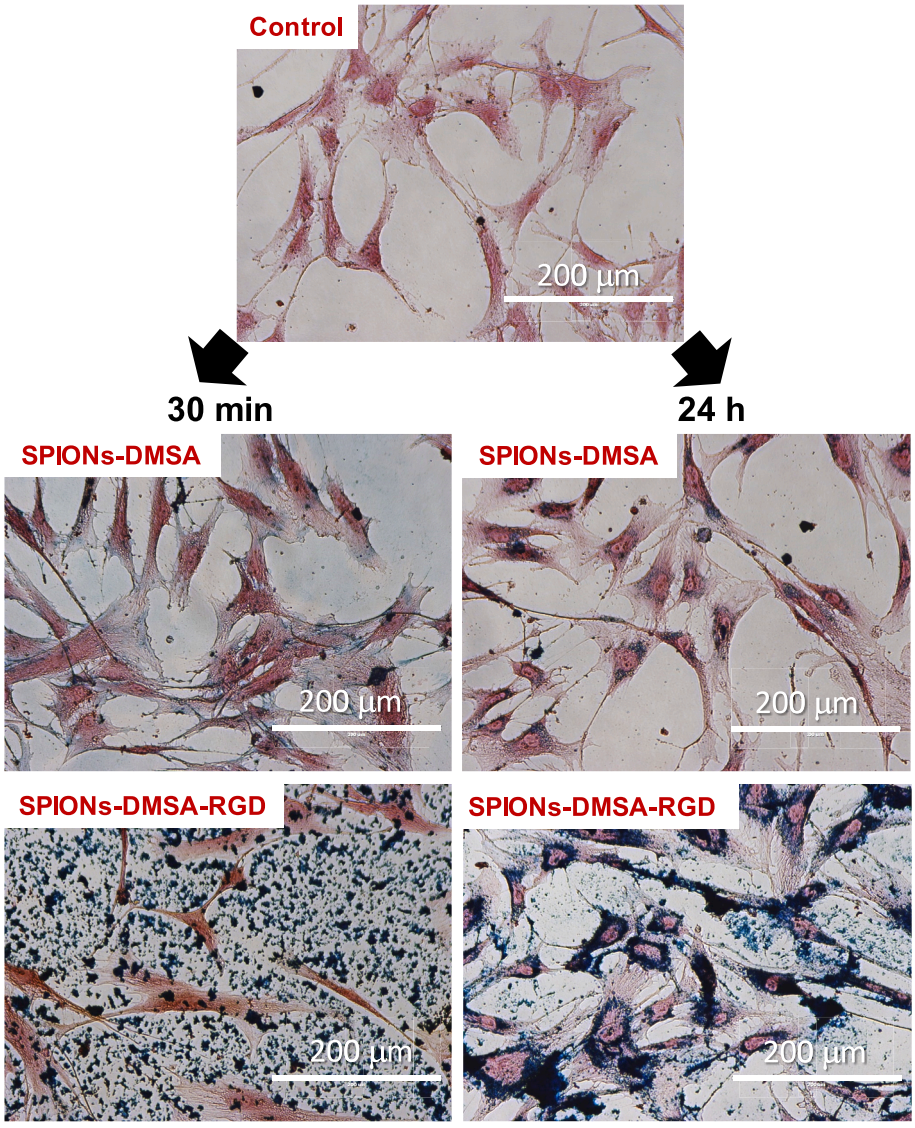


Fig. 6. Nano-biointeraction and cellular uptake in presence of 50 µg/mL of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD by hBM-MSCs after 30 min (left) and 24 h (right) of incubation, respectively. Prussian Blue staining for iron detection have been used to identify the SPIONs and neutral red for cell detection. The images have been taken in a florescence microscopy EVOS. Control refers to hBM-MSCs cultured in the absence of SPIONs. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

intracellular uptake of both the SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD by hBM-MSCs after 24 h of incubation, and taking into account the obtained results of flow cytometry analyzing the SSC intensity at different concentrations (25 and 50 μg/mL) (Fig. 4D), we can ensure that despite this maximum internalisation, the cell retains its viability intact. Furthermore, based on these results, the *in vitro* differentiation assays were carried out after 30 min of exposure with SPIONs, ensuring that the nanoparticles were in contact with the cell membrane.

Nano-biointeraction and cellular uptake in presence of 50 μg/mL of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD by hBM-MSCs after 30 min (left) and 24 h (right) of incubation, respectively. Prussian Blue staining for iron detection have been used to identify the SPIONs and neutral red for cell detection. The images have been taken in a florescence microscopy EVOS. Control refers to hBM-MSCs cultured in the absence of SPIONs. In addition, a detailed confocal microscopy study using 60X magnification confirms the results previously obtained from the Prussian blue scan. After 30 min of incubation with SPIONs, both nanoparticles are preferentially found on the cell surface (indicated in the image with arrows), while after 24 h we observed their complete cell internalization (Figure S8). Finally, biological TEM studies were carried out to further corroborate the results derived from Prussian blue scan and confocal microscopy studies. To this aim, hBM-MSCs were incubated with SPIONs-DMSA-RGD at 50 μg/mL for 30 min and 24, respectively. After fixation and inclusion in the resin, cells were sectioned and visualized by

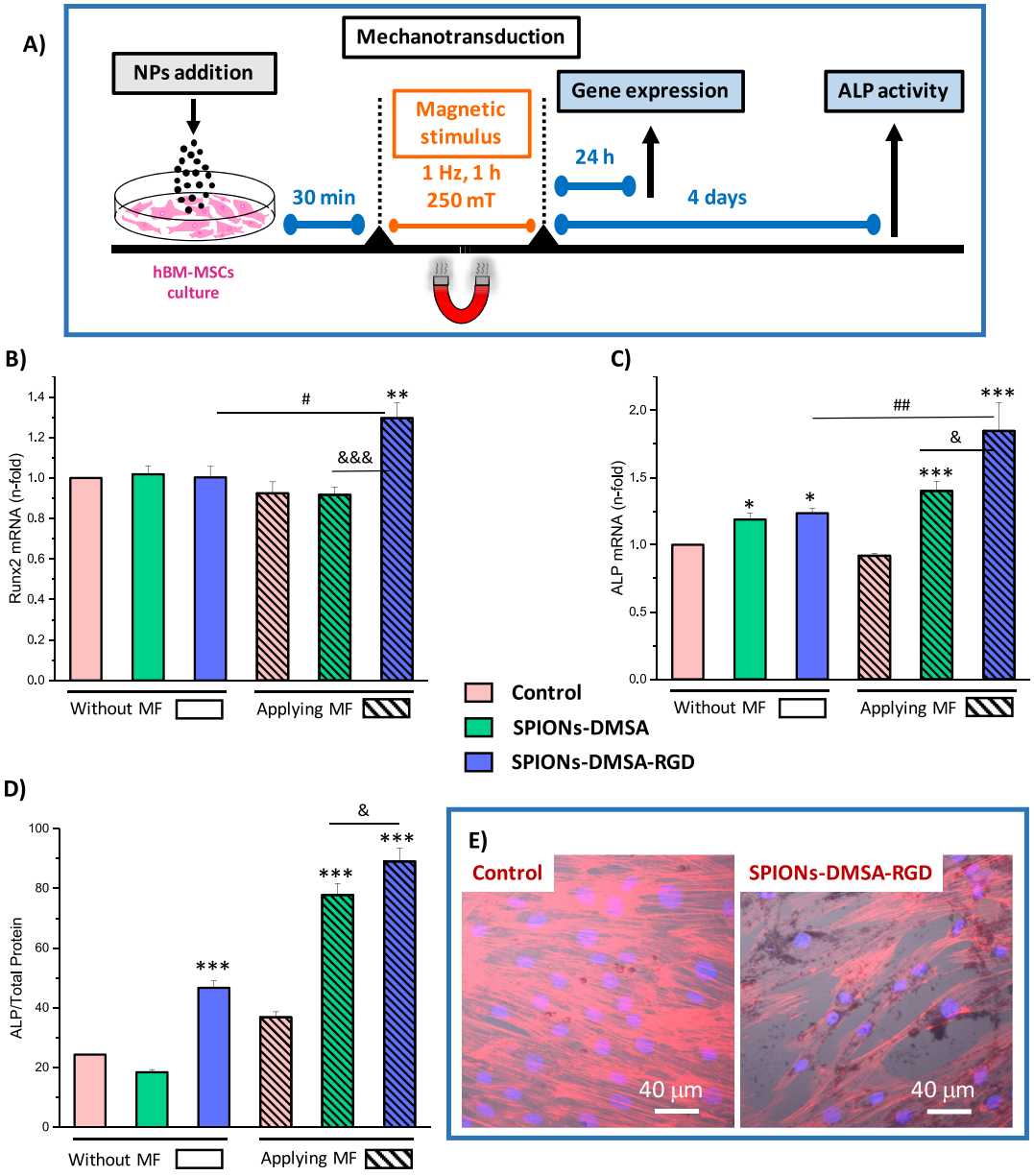


Fig. 7. A) Representative scheme of the experimental process used to evaluate osteogenic differentiation. The hBM-MSCs were first exposed to 30 μg/mL of SPIONs and after 30 min of incubation a magnetic field of 1 Hz and 250 mT was applied for 1 h. This experiment was carried out in a MICA Biosystems bioreactor. B) *Runx2* and C) *ALP* gene expression *in vitro* measured by qRT-PCR 24 h after treatment. D) ALP activity of hBM-MSCs 4 days after treatment. Controls refer to hBM-MSCs without SPIONs both in the presence and absence of MF. The application of the MF is represented by oblique stripes in the columns of the graphs. E) Morphological evaluation by confocal microscopy of hBM-MSCs after 24 h of culture with 30 μg/mL of SPIONs-DMSA-RGD. Cells were stained with DAPI (blue) for visualization of cell nuclei and with rhodamine-phalloidin (red) for visualization of cytoplasmic F-actin filaments. SPIONs-DMSA-RGD nanoparticles appear as black deposits (transmission) inside the cells. Statistical significance: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.005$ (*vs* control); $^{\#}p < 0.05$ and $^{\#\#}p < 0.01$ SPIONs-DMSA-RGD without *vs* with MF; $^{\&}p < 0.05$ and $^{\&\&\&}p < 0.005$ SPIONs-DMSA *vs* SPIONs-DMSA-RGD applying MF. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

TEM (Figure S9). After 30 min of incubation, accumulation of nanoparticles in the cell membrane can be clearly observed, appearing as scattered black dots (indicated in the image with arrows), whereas after 24 h complete internalization was distinguishable, evidenced by the intense accumulation of nanoparticles in vesicles within the cytoplasm.

Fig. 7A shows a scheme illustrating the methodology used in the *in vitro* differentiation assay. In this sense, after 30 min of incubation with the nanoparticles, an external MF was applied for 1 h. Then, to determine the effect of this magnetic stimulus on *in vitro* differentiation, early osteogenic markers such as Runx2 and ALP were analyzed [85–87]. Specifically, *Runx2* and *ALP* gene expression and ALP enzyme activity were assessed after 24 h and 4 days, respectively. *Runx2* (Fig. 7B) and *ALP* (Fig. 7C) gene expression was analyzed by qRT-PCR in hBM-MSCs 24 h after exposure to 30 μg/mL SPIONs and application of the external magnetic field. Notable increase in both *Runx2* and *ALP* gene expression have been observed when cells were exposed to SPIONs-DMSA-RGD and the MF. Furthermore, under magnetic field application, there was a significant increase in *Runx2* and *ALP* gene expression when cells were exposed to RGD-functionalized SPIONs compared to those exposed to non-functionalized SPIONs (SPIONs-DMSA). For *ALP* gene expression, both the presence of the RGD-functionalized (SPIONs-DMSA-RGD) and non-functionalized nanoparticles (SPIONs-DMSA) lead to a significant increase, which confirms that both nanoparticles types do not block the expression of this early marker of osteogenic differentiation in human bone marrow derived mesenchymal stem cells. Furthermore, this increase in S phase could be related to the increase in the ALP gene expression of hBM-MSCs exposed to the SPIONs without MF (Fig. 4C), indicating the intrinsic effect of SPIONs in agreement with the literature [88]. hBM-MSCs are primarily derived from bone marrow and a specifically key group of cells in bone tissue engineering, which can differentiate into different cells under certain conditions [89]. Their differentiation can be enhanced by combining a MF with SPIONs. In this sense, it has been demonstrated that SPIONs mechanically stimulated by the effect of a MF act on the cells to generate internal biochemical signals, influencing proliferation, differentiation and selective expression of proteins that enhance bone regeneration [30–32,90].

To check whether mechanotransduction process, which led to an increase in gene expression, is reflected in a transcriptional process, the enzymatic activity of the ALP protein was evaluated after 4 days (Fig. 7D). In general, a notable increase in ALP enzymatic activity is observed when cells are subjected to the MF [91]. Further, this increase is more pronounced in the presence of both SPIONs and even more so when the cells are exposed to SPIONs-DMSA-RGD nanoparticles, showing significant differences between both types of nanomaterials types (SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD, respectively). Specifically, for the SPIONs-DMSA-RGD after MF application this increase is threefold compared to ALP basal of the control cells, indicating an increase in cell differentiation. These results are in agreement with the gene expression analyzed in sections B and C of Fig. 7, where both *Runx2* and *ALP* gene expression were also significantly increased, inducing differentiation towards the osteogenic phenotype. Cell morphology is one of the strongest indicators of cell health, which is very important for understanding cell functionality. Diverse authors have shown that the presence of SPIONs, inside cell could cause damage to the cytoskeletal structure (F-actin filaments) affecting important cellular processes. In this study, the hBM-MSCs morphology after SPIONs-DMSA-RGD (Fig. 7E) nanoparticles uptake as well as their intracellular localization was evaluated after 24 h by confocal microscopy, since these filaments are crucial components in keeping cellular and structural morphology. The results regarding staining of the F-actin filaments revealed correct cytoskeletal assembly in spreading hBM-MSCs. Finally, the confocal images also show that these SPIONs-DMSA-RGD are preferentially located in the perinuclear zone, clearly outside of the nucleus and without signs of nuclear shrinkage (pyknosis).

The specific RGD-targeting through membrane integrins triggers key pathways for downstream signal transduction, including cell differentiation [92,93] which could justify the results obtained. On the other hand, these studies revealed that hBM-MSCs maintain their morphological structure in presence of SPIONs into the cytoskeleton (Fig. 7E), and slight increase the S-phase of cell cycle (Fig. 4C), which could also be related to this increase in cell differentiation and ALP production, according to other authors [94–96]. Finally, our mechanotransduction strategy is based on the functionalization of SPIONs with integrin ligands. The importance of applying the MF when the SPIONs are in the cell membrane is translated into this study design on short time scales, for which we have performed a microscopic observation by staining with Prussian blue of the SPIONs at different times to ensure this stage of the SPIONs in the cell membrane. Further studies carried out at different exposure times and doses will be the subject of future work in order to optimise these promising nanotherapies. These magnetic colloidal nanoformulations could be applied by intraosseous or intra-articular injection to stimulate bone regeneration through mechanotransduction in a controlled, localised and remote manner without increasing the patient's hospital stay, which represents a great clinical advantage.

4. Conclusions

On the basis of the previously reported mechanical stimulation effect provided by magnetic microbeads [38], in this research, we tested the effectiveness of remotely activated mechanotransduction in hBM-MSCs for osteogenic differentiation using superparamagnetic iron oxide nanocolloids obtained by the thermal decomposition method. The SPIONs of *ca.* 13 nm were coated with DMSA by ligand exchange (providing SPIONs-DMSA), and then functionalized with an Arg-Gly-Asp (RGD) peptide as ligand to target integrin receptors on cell membrane (providing SPIONs-DMSA-RGD) and used in the colloidal state. A comparative bioanalytical characterization of both magnetic nanocolloids was performed, demonstrating the ability of targeted SPIONs to promote the osteogenic differentiation of hBM-MSCs upon application of an external magnetic field. Both nanocolloids were biocompatible with a high degree of viability, adequate cell cycle and low production of ROS in hBM-MSCs. In relation to internalisation, SPIONs-DMSA-RGD displayed a higher degree of cellular uptake due to receptor-mediated endocytosis in conjunction with other mechanisms, highlighting macropinocytosis. This fact shows that the endocytic mechanism not only depends on the target integrin receptor but also on the evolution of the hydrodynamic size over time, as demonstrated by the stability study carried out in culture medium [83]. Mechanotransduction studies using an external magnetic field of 250 mT and 1 Hz frequency after 30 min of incubation in cell culture showed a significant increase in the expression of osteogenic genes Runx2 and ALP, as well as in ALP activity, which was more pronounced in the case of SPIONs-DMSA-RGD due to the targeting to integrins via RGD-peptide [32,38,39]. The current research study envisions that the local administration of nanoformulations together with the application of an external magnetic field is a promising alternative towards the design of a new drug-free, localized, controlled, remote and minimally invasive nanotherapy for bone tissue regeneration.

CRediT authorship contribution statement

Manuel Estévez: Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Mónica Cicuéndez:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Montserrat Colilla:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis. **María Vallet-Regí:** Resources, Supervision, Researcher responsible, Project administration, Funding acquisition. **Blanca González:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Isabel**

Izquierdo-Barba: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement No 814410 (GIOTTO) and ERC-2015-AdG (VERDI) Proposal No. 694160. This study was also supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) PID2020-117091RB-I00 grant. We thank the Materials for Medicine and Biotechnology Group (María del Puerto Morales, Alvaro Gallo-Cordova) for advice and assistance in the characterization in the analysis services of the ICMM-CSIC for the characterization of the magnetic properties. We are grateful to Prof. María del Puerto Morales (ICMM/CSIC) for her support and valuable scientific discussions on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, as well as for her collaborative vision of science progress. We also thank the ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (UCM) and Unidad de Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia from CAI de Técnicas Biológicas (UCM).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.03.043.

References

[1] https://www.osteoporosis.foundation/ (Last access, 5th of March, 2024).
[2] N. Salari, H. Ghasemi, L. Mohammadi, M.H. Behzadi, E. Rabieenia, S. Shohaimi, M. Mohammadi, The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis, J. Orthop. Surg. Res. 16 (1) (2021) 609, https://doi.org/10.1186/s13018-021-02772-0.
[3] F. Migliorini, G. La Padula, E. Torsiello, F. Spiezia, F. Oliva, N. Maffulli, Strategies for large bone defect reconstruction after trauma, infections or tumour excision: a comprehensive review of the literature, Eur. J. Med. Res. 26 (1) (2021) 118, https://doi.org/10.1186/s40001-021-00593-9.
[4] E.F. Morgan, R.E. Gleason, L.N. Hayward, P.L. Leong, K.T. Palomares, Mechanotransduction and fracture repair, J. Bone Joint Surg. American 90 (Suppl 1) (2008) 25–30, https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01164.
[5] C.C. DuFort, M.J. Paszek, V.M. Weaver, Balancing forces: architectural control of mechanotransduction, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12 (5) (2011) 308–319, https://doi.org/10.1038/nrm3112.
[6] X. Di, X. Gao, L. Peng, J. Ai, X. Jin, S. Qi, H. Li, K. Wang, D. Luo, Cellular mechanotransduction in health and diseases: from molecular mechanism to therapeutic targets, Signal Transduct. Target. Ther. 8 (1) (2023) 282, https://doi.org/10.1038/s41392-023-01501-9.
[7] P.H. Puech, P. Bongrand, Mechanotransduction as a major driver of cell behaviour: mechanisms, and relevance to cell organization and future research, Open Biol. 11 (11) (2021) 210256, https://doi.org/10.1098/rsob.210256.
[8] M. Zhang, F. Xu, J. Cao, Q. Dou, J. Wang, J. Wang, L. Yang, W. Chen, Research advances of nanomaterials for the acceleration of fracture healing, Bioact. Mater. 31 (2023) 368–394, https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.08.016.
[9] A.K. Gaharwar, I. Singh, A. Khademhosseini, Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration, Nat. Rev. Mater. 5 (2020) 686–705, https://doi.org/10.1038/s41578-020-0209-x.
[10] H. Xia, X. Li, W. Gao, X. Fu, R.H. Fang, L. Zhang, K. Zhang, Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells, Nat. Rev. Mater. 3 (2018) 174–193, https://doi.org/10.1038/s41578-018-0027-6.
[11] M. Vallet-Regí, E. Ruiz-Hernández, Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine, Adv. Mater. 23 (44) (2011) 5177–5218, https://doi.org/10.1002/adma.201101586.
[12] A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 46 (8) (2007) 1222–1244, https://doi.org/10.1002/anie.200602866.
[13] S. Del Sol-Fernández, P. Martínez-Vicente, P. Gomollón-Zueco, C. Castro-Hinojosa, L. Gutiérrez, R.M. Fratila, M. Moros, Magnetogenetics: remote activation of cellular functions triggered by magnetic switches, Nanoscale 14 (6) (2022) 2091–2118, https://doi.org/10.1039/d1nr06303k.
[14] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, Chem. Rev. 108 (6) (2008) 2064–2110, https://doi.org/10.1021/cr068445e.
[15] M. Suciu, C.M. Ionescu, A. Ciorita, S.C. Tripon, D. Nica, H. Al-Salami, L. Barbu-Tudoran, Applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in drug and therapeutic delivery, and biotechnological advancements, Beilstein J. Nanotechnol. 11 (2020) 1092–1109, https://doi.org/10.3762/bjnano.11.94.
[16] M.G. Montiel Schneider, M.J. Martín, J. Otarola, E. Vakarelska, V. Simeonov, V. Lassalle, M. Nedyalkova, Biomedical applications of iron oxide nanoparticles: current insights Progress and perspectives, Pharmaceutics 14 (1) (2022) 204, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010204.
[17] N.A. Frey, S. Peng, K. Cheng, S. Sun, Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage, Chem. Soc. Rev. 38 (9) (2009) 2532–2542, https://doi.org/10.1039/b815548h.
[18] C. Pucci, A. Degl'Innocenti, G.M.B.G. Ciofani, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: recent advancements, molecular effects, and future directions in the omics era, Biomater. Sci. 10 (2022) 2103–2121, https://doi.org/10.1039/D1BM01963E.
[19] A.M. Dias, A. Hussain, A.S. Marcos, A.C. Roque, A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides, Biotechnol. Adv. 29 (1) (2011) 142–155, https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.003.
[20] J.J. Connell, P.S. Patrick, Y. Yu, M.F. Lythgoe, T.L. Kalber, Advanced cell therapies: targeting, tracking and actuation of cells with magnetic particles, Regen. Med. 10 (6) (2015) 757–772, https://doi.org/10.2217/rme.15.36.
[21] G.L. Koons, M. Diba, A.G. Mikos, Materials design for bone-tissue engineering, Nat. Rev. Mater. 5 (2020) 584–603, https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2.
[22] L. Zheng, Z. Zhuang, Y. Li, T. Shi, K. Fu, W. Yan, L. Zhang, P. Wang, L. Li, Q. Jiang, Bone targeting antioxidative nano-iron oxide for treating postmenopausal osteoporosis, Bioact. Mater. 14 (2021) 250–261, https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.012.
[23] K. Zhang, J. Dong, J. Lu, L. Li, H. Liang, J. Jin, P. Wang, X. Sun, Q. Jiang, Icaritin-incorporated porous hollow iron oxide nanostructures for promoting fracture repair, ACS Appl. Nano Mater. 5 (5) (2022) 6597–6608, https://doi.org/10.1021/acsanm.2c00660.
[24] H. Markides, M. Rotherham, A.J. El Haj, Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine, J. Nanomater. 2012 (2012) 1–11, https://doi.org/10.1155/2012/614094.
[25] N. Singh, G.J. Jenkins, R. Asadi, S.H. Doak, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), Nano Rev. 1 (2010), https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358.
[26] Y. Huang, J.C. Hsu, H. Koo, D.P. Cormode, Repurposing ferumoxytol: diagnostic and therapeutic applications of an FDA-approved nanoparticle, Theranostics 12 (2) (2022) 796–816, https://doi.org/10.7150/thno.67375.
[27] D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam, K.J. Thurecht, S.R. Corrie, Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date, Pharm. Res. 33 (10) (2016) 2373–2387, https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5.
[28] A.I. Gonçalves, M.S. Miranda, M.T. Rodrigues, R.L. Reis, M.E. Gomes, Magnetic responsive cell-based strategies for diagnostics and therapeutics, Biomed. Mater. 13 (5) (2018) 054001, https://doi.org/10.1088/1748-605X/aac78b.
[29] Y. Jia, P. Zhang, Y. Sun, Q. Kang, J. Xu, C. Zhang, Y. Chai, Regeneration of large bone defects using mesoporous silica coated magnetic nanoparticles during distraction osteogenesis, Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 21 (2019) 102040, https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102040.
[30] H. Meng, T.T. Chowdhury, N. Gavara, The mechanical interplay between differentiating mesenchymal stem cells and gelatin-based substrates measured by atomic force microscopy, Front. Cell Dev. Biol. 9 (2021) 697525, https://doi.org/10.3389/fcell.2021.697525.
[31] J. Lima, A.I. Gonçalves, M.T. Rodrigues, R.L. Reis, M.E. Gomes, The effect of magnetic stimulation on the osteogenic and chondrogenic differentiation of human stem cells derived from the adipose tissue (hASCs), J. Magn. Magn. Mater. 393 (2015) 526–536, https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.05.087.
[32] H. Hajiali, M. Rotherham, A.J. El Haj, Remote activation of mechanotransduction via integrin Alpha-5 via aptamer-conjugated magnetic nanoparticles promotes osteogenesis, Pharmaceutics 16 (1) (2023) 21, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010021.
[33] A.R. Abdel Fattah, A. Ranga, Nanoparticles as versatile tools for mechanotransduction in tissues and organoids, Front. Bioeng. Biotechnol. 8 (2020) 240, https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00240.
[34] H. Guo, X. Peng, X. Dong, J. Li, C. Cheng, Q. Wei, Promoting stem cell mechanosensing and osteogenesis by hybrid soft fibers, ACS Appl. Mater. Interfaces 15 (41) (2023) 47880–47892, https://doi.org/10.1021/acsami.3c07999.
[35] R.K. Singh, A.G. Kurian, V. Sagar, I. Park, J.-H. Park, H. Lee, J.-H. Lee, H.-W. Kim, Coordinated biophysical stimulation of MSCs via electromagnetized au-nanofiber matrix regulates cytoskeletal-to-nuclear mechanoresponses and lineage specification, Adv. Funct. Mater. 33 (2023) 2304821, https://doi.org/10.1002/adfm.202304821.

[36] A.A. Bertrand, S.H. Malapati, D.T. Yamaguchi, J.C. Lee, The intersection of mechanotransduction and regenerative osteogenic materials, Adv. Healthc. Mater. 9 (20) (2020) e2000709, https://doi.org/10.1002/adhm.202000709.
[37] W. Xie, X. Wei, H. Kang, H. Jiang, Z. Chu, Y. Lin, Y. Hou, Q. Wei, Static and dynamic: evolving biomaterial mechanical properties to control cellular mechanotransduction, Adv. Sci. 10 (9) (2023) e220459, https://doi.org/10.1002/advs.202204594.
[38] J. Henstock, A. El Haj, Controlled mechanotransduction in therapeutic MSCs: can remotely controlled magnetic nanoparticles regenerate bones? Regen. Med. 10 (4) (2015) 377–380, https://doi.org/10.2217/rme.15.23.
[39] J.M. Kanczler, H.S. Sura, J. Magnay, D. Green, R.O. Oreffo, J.P. Dobson, A.J. El Haj, Controlled differentiation of human bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle technology, Tissue Eng. A 16 (10) (2010) 3241–3250, https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0638.
[40] J.R. Henstock, M. Rotherham, H. Rashidi, K.M. Shakesheff, A.J. El Haj, Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy, Stem Cells Transl. Med. 3 (11) (2014) 1363–1374, https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0017.
[41] M. Rotherham, A.J. El Haj, Remote activation of the wnt/β-catenin signalling pathway using functionalised magnetic particles, PLoS One 10 (3) (2015) e012176, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121761.
[42] M. Rotherham, J.R. Henstock, O. Qutachi, A.J. El Haj, Remote regulation of magnetic particle targeted wnt signaling for bone tissue engineering, Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 14 (1) (2018) 173–184, https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.008.
[43] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J.Y. Zhang, N. Zhang, T. Gu, J. Wang, D. Feng, S. Yang, X. Y. Perrett, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, Nat. Nanotechnol. 2 (2007) 577–583, https://doi.org/10.1038/nnano.2007.260.
[44] J.R. Henstock, M. Rotherham, A.J. El Haj, Magnetic ion channel activation of TREK1 in human mesenchymal stem cells using nanoparticles promotes osteogenesis in surrounding cells, J. Tissue Eng. 9 (2018), https://doi.org/10.1177/2041731418808695 (2041731418808695).
[45] H. Markides, J.S. McLaren, N.D. Telling, N. Alom, E.A. Al-Mutheffer, R.O.C. Oreffo, A.B.E. Zannettino, L.J. Scammell, A.J. White, El Haj. translation of remote control regenerative technologies for bone repair. npj, Regen Med. 3 (2018) 9, https://doi.org/10.1038/s41536-018-0048-1.
[46] H. Pommerenke, E. Schreiber, F. Dürr, B. Nebe, C. Hahnel, W. Möller, J. Rychly, Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response, Eur. J. Cell Biol. 70 (2) (1996) 157–164.
[47] S. Bierbaum, H. Notbohm, Tyrosine phosphorylation of 40 kDa proteins in osteoblastic cells after mechanical stimulation of beta1-integrins, Eur. J. Cell Biol. 77 (1) (1998) 60–67, https://doi.org/10.1016/s0171-9335(98)80102-7.
[48] S. Hughes, J. Dobson, A.J. El Haj, Magnetic targeting of mechanosensors in bone cells for tissue engineering applications, J. Biomech. 40 (Suppl 1) (2007) S96–S104, https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.03.002.
[49] M. Estévez, G. Montalbano, A. Gallo-Cordova, J.G. Ovejero, I. Izquierdo-Barba, B. González, C. Tomasina, L. Moroni, M. Vallet-Regí, C. Vitale-Brovarone, S. Fiorilli, Incorporation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles into collagen formulation for 3D electrospun scaffolds, Nanomaterials 12 (2) (2022) 181, https://doi.org/10.3390/nano12020181.
[50] Z. Li, L. Xue, P. Wang, X. Ren, Y. Zhang, C. Wang, J. Sun, Biological scaffolds assembled with magnetic nanoparticles for bone tissue engineering: a review, Materials 16 (4) (2023) 1429, https://doi.org/10.3390/ma16041429.
[51] Y. Xia, J. Sun, L. Zhao, F. Zhang, X.J. Liang, Y. Guo, M.D. Weir, M.A. Reynolds, N. Gu, H.H.K. Xu, Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration, Biomaterials 183 (2018) 151–170, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.040.
[52] E.C. Kim, R. Leesungbok, S.W. Lee, H.W. Lee, S.H. Park, S.J. Mah, S.J. Ahn, Effects of moderate intensity static magnetic fields on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, Bioelectromagnetics 36 (4) (2015) 267–276, https://doi.org/10.1002/bem.21903.
[53] F. Herranz, M.P. Morales, A.G. Roca, R. Vilar, J. Ruiz-Cabello, A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe_2O_3 nanoparticles, Contrast Media Mol. Imaging 3 (6) (2008) 215–222, https://doi.org/10.1002/cmmi.254.
[54] M. Estévez, M. Cicuéndez, J. Crespo, J. Serrano-López, M. Colilla, C. Fernández-Acevedo, T. Oroz-Mateo, A. Rada-Leza, B. González, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: in vitro biological evaluation for biomedical applications, J. Colloid Interface Sci. 650 (Pt A) (2023) 560–572, https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.07.009.
[55] J. Linares, M.C. Matesanz, M. Vila, M.J. Feito, G. Gonçalves, M. Vallet-Regí, P. A. Marques, M.T. Portolés, Endocytic mechanisms of graphene oxide nanosheets in osteoblasts, hepatocytes and macrophages, ACS Appl. Mater. Interfaces 6 (16) (2014) 13697–13706, https://doi.org/10.1021/am5031598.
[56] J. Park, K. An, Y. Hwang, J.G. Park, H.J. Noh, J.Y. Kim, J.H. Park, N.M. Hwang, T. Hyeon, Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals, Nat. Mater. 3 (12) (2004) 891–895, https://doi.org/10.1038/nmat1251.
[57] A. Lassenberger, T.A. Grünewald, P.D.J. van Oostrum, H. Rennhofer, H. Amenitsch, R. Zirbs, H.C. Lichtenegger, E. Reimhult, Monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition: elucidating particle formation by second-resolved in situ small-angle X-ray scattering, Chem. Mater. 29 (10) (2017) 4511–4522, https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b01207.
[58] B.D. Cullity, Elements of X-ray diffraction, 3rd ed.;, Addison-Wesley Publishing Company Inc:, Boston, MA, USA, 1978 (ISBN0201011743).
[59] R. Hufschmid, H. Arami, R.M. Ferguson, M. Gonzales, E. Teeman, L.N. Brush, N. D. Browning, K.M. Krishnan, Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition, Nanoscale 7 (25) (2015) 11142–11154, https://doi.org/10.1039/c5nr01651g.
[60] G. Salas, C. Casado, F.J. Teran, R. Miranda, C.J. Serna, M.P. Morales, Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications, J. Mater. Chem. 22 (2012) 21065, https://doi.org/10.1039/C2JM34402E.
[61] L. Gutiérrez, L. de la Cueva, M. Moros, E. Mazarío, S. de Bernardo, J.M. de la Fuente, M.P. Morales, G. Salas, Aggregation effects on the magnetic properties of iron oxide colloids, Nanotechnology 30 (11) (2019) 112001, https://doi.org/10.1088/1361-6528/aafbff.
[62] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M.T. Swihart, T.Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E.P. Furlani, P. N. Prasad, Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control, J. Phys. Chem. B 109 (9) (2005) 3879–3885, https://doi.org/10.1021/jp045402y.
[63] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, Integrins, Cell Tissue Res. 339 (1) (2010) 269–280, https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6.
[64] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, Nature 309 (5963) (1984) 30–33, https://doi.org/10.1038/309030a0.
[65] P. Dhavalikar, A. Robinson, Z. Lan, D. Jenkins, M. Chwatko, K. Salhadar, A. Jose, R. Kar, E. Shoga, A. Kannapiran, E. Cosgriff-Hernandez, Review of integrin-targeting biomaterials in tissue engineering, Adv. Healthc. Mater. (2020) e2000795, https://doi.org/10.1002/adhm.202000795.
[66] M. Alipour, M. Baneshi, S. Hosseinkhani, R. Mahmoudi, A. Jabari Arabzadeh, M. Akrami, J. Mehrzad, H. Bardania, Recent progress in biomedical applications of RGD-based ligand: from precise cancer theranostics to biomaterial engineering: a systematic review, J. Biomed. Mater. Res. A 108 (4) (2020) 839–850, https://doi.org/10.1002/jbm.a.36862.
[67] C.H. Yu, J.B. Law, M. Suryana, H.Y. Low, M.P. Sheetz, Early integrin binding to arg-gly-asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation, PNAS 108 (51) (2011) 20585–20590, https://doi.org/10.1073/pnas.1109485108.
[68] X. Pang, X. He, Z. Qiu, H. Zhang, R. Xie, Z. Liu, Y. Gu, N. Zhao, Q. Xiang, Y. Cui, Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy, Signal Transduct. Target. Ther. 8 (1) (2023) 1, https://doi.org/10.1038/s41392-022-01259-6.
[69] A.G. Roca, J.F. Marco, M.P. Morales, C.J. Serna, Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles, J. Phys. Chem. C 111 (2007) 18577–18584, https://doi.org/10.1021/jp075133m.
[70] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, BBA 1767 (9) (2007) 1073–1101, https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2007.06.004.
[71] N.A.M.A. Kamal, E. Abdulmalek, S. Fakurazi, R. Cordova, K.E.M.B.A. Rahman, Surface peptide functionalization of zeolitic imidazolate framework-8 for autonomous homing and enhanced delivery of chemotherapeutic agent to lung tumor cells, Dalton Trans. 50 (2021) 2375–2386, https://doi.org/10.1039/D1DT00116G.
[72] J. Kong, S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, Acta Biochim. Biophy. Sin. 39 (8) (2007) 549–559, https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
[73] C.G. Hadjipanayis, M.J. Bonder, S. Balakrishnan, X. Wang, H. Mao, G. C. Hadjipanayis, Metallic iron nanoparticles for MRI contrast enhancement and local hyperthermia, Small 4 (11) (2008) 1925–1929, https://doi.org/10.1002/smll.200800261.
[74] S.M. Yu, L. Gonzalez-Moragas, M. Milla, A. Kolovou, R. Santarella-Mellwig, Y. Schwab, A. Laromaine, A. Roig, Bio-identity and fate of albumin-coated SPIONs evaluated in cells and by the C. elegans model, Acta Biomater. 43 (2016) 348–357, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.024.
[75] H. Wei, Y. Hu, J. Wang, X. Gao, X. Qian, M. Tang, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, metabolism, and cellular behavior in biomedicine applications, Int. J. Nanomed. 16 (2021) 6097–6113, https://doi.org/10.2147/IJN.S321984.
[76] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, Science 311 (5761) (2006) 622–627, https://doi.org/10.1126/science.1114397.
[77] M. Redza-Dutordoir, D.A. Averill-Bates, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, BBA 1863 (12) (2016) 2977–2992, https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
[78] U.S. Patil, S. Adireddy, A. Jaiswal, S. Mandava, B.R. Lee, D.B. Chrisey, In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles, Int. J. Mol. Sci. 16 (10) (2015) 24417–24450, https://doi.org/10.3390/ijms161024417.
[79] D.M. Huang, J.K. Hsiao, Y.C. Chen, L.Y. Chien, M. Yao, Y.K. Chen, B.S. Ko, S. C. Hsu, L.A. Tai, H.Y. Cheng, S.W. Wang, C.S. Yang, Y.C. Chen, The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles, Biomaterials 30 (22) (2009) 3645–3651, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.032.
[80] J.A. Kim, C. Åberg, A. Salvati, K.A. Dawson, Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population, Nat. Nanotechnol. 7 (1) (2011) 62–68, https://doi.org/10.1038/nnano.2011.191.
[81] P. Rees, J.W. Wills, M.R. Brown, C.M. Barnes, H.D. Summers, The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells, Nat. Commun. 10 (2019) 2341, https://doi.org/10.1038/s41467-019-10112-4.
[82] Q. Wang, B. Chen, F. Ma, S. Lin, M. Cao, Y. Li, N. Gu, Magnetic iron oxide nanoparticles accelerate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via modulation of long noncoding RNA INZEB2, Nano Res. 10 (2) (2016) 626–642, https://doi.org/10.1007/s12274-016-1322-4.

[83] J.J. Rennick, A.P.R. Johnston, R.G. Parton, Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics, Nat. Nanotechnol. 16 (2021) 266–276, https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8.
[84] C.h. Yu, N. Rafiq, F. Cao, et al., Integrin-beta3 clusters recruit clathrin-mediated endocytic machinery in the absence of traction force, Nat. Commun. 6 (2015) 8672, https://doi.org/10.1038/ncomms9672.
[85] Z. Liu, Q. Wang, J. Zhang, S. Qi, Y. Duan, C. Li, The mechanotransduction signaling pathways in the regulation of osteogenesis, Int. J. Mol. Sci. 24 (18) (2023) 14326, https://doi.org/10.3390/ijms241814326.
[86] D.S. Amarasekara, S. Kim, J. Rho, Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks, Int. J. Mol. Sci. 22 (6) (2021) 2851, https://doi.org/10.3390/ijms22062851.
[87] J. Zhuang, S. Lin, L. Dong, K. Cheng, W. Weng, Magnetically actuated mechanical stimuli on Fe_3O_4/mineralized collagen coatings to enhance osteogenic differentiation of the MC3T3-E1 cells, Acta Biomater. 71 (2018) 49–60, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.009.
[88] S. Yoo, E.J. Lee, N.X. Thang, H. La, H. Lee, C. Park, D.W. Han, S.J. Uhm, H. Song, J. T. Do, Y. Choi, K. Hong, INO80 is required for the cell cycle control, survival, and differentiation of mouse ESCs by transcriptional regulation, Int. J. Mol. Sci. 23 (23) (2022) 15402, https://doi.org/10.3390/ijms232315402.
[89] P. Kangari, T. Talaei-Khozani, I. Razeghian-Jahromi, M. Razmkhah, Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects, Stem Cell Res Ther 11 (1) (2020) 492, https://doi.org/10.1186/s13287-020-02001-1.
[90] B. Son, H.D. Kim, M. Kim, J.A. Kim, J. Lee, H. Shin, N.S. Hwang, T.H. Park, Physical stimuli-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells using magnetic nanoparticles, Adv. Healthc. Mater. 4 (9) (2015) 1339–1347, https://doi.org/10.1002/adhm.201400835.
[91] X. Ba, M. Hadjiargyrou, E. DiMasi, Y. Meng, M. Simon, Z. Tan, M.H. Rafailovich, The role of moderate static magnetic fields on biomineralization of osteoblasts on sulfonated polystyrene films, Biomaterials 32 (31) (2011) 7831–7838, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.053.
[92] H. Wang, J. Li, X. Zhang, T. Ning, D. Ma, Y. Ge, S. Xu, Y. Hao, B. Wu, Priming integrin alpha 5 promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells due to cytoskeleton and cell cycle changes, J. Proteomics 179 (2018) 122–130, https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.008.
[93] M. Mettlen, D. Loerke, D. Yarar, G. Danuser, S.L. Schmid, Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis, J. Cell Biol. 188 (6) (2010) 919–933, https://doi.org/10.1083/jcb.200908078.
[94] H. Hendesi, M.F. Barbe, F.F. Safadi, M.A. Monroy, S.N. Popoff, Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation, PLoS One 10 (2) (2015) e0115325.
[95] Y.C. Kuo, T.H. Chang, W.T. Hsu, J. Zhou, H.H. Lee, J. Hui-Chun Ho, S. Chien, O. K. Lee, Oscillatory shear stress mediates directional reorganization of actin cytoskeleton and alters differentiation propensity of mesenchymal stem cells, Stem Cells 33 (2) (2015) 429–442, https://doi.org/10.1002/stem.1860.
[96] S. Ruijtenberg, S. van den Heuvel, Coordinating cell proliferation and differentiation: antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression, Cell Cycle 15 (2) (2016) 196–212, https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925.

Journal of Colloids and Interface Science

Supporting Information

Magnetic colloidal nanoformulations to remotely trigger mechanotransduction for osteogenic differentiation

Manuel Estévez [a,§], Mónica Cicuéndez [b,§], Montserrat Colilla [a,c], María Vallet-Regí [a,c], Blanca González [a,c] *, Isabel Izquierdo-Barba [a,c] *

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. manestev@ucm.es (M.E.); mcolilla@ucm.es (M.C.); vallet@ucm.es (M.V.-R.); blancaortiz@ucm.es (B.G.); ibarba@ucm.es (I.I.-B.);

[b] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040-Madrid, Spain. mcicuendez@ucm.es (M.C.)

[c] Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain.

§ Both authors contributed equally to the manuscript

* Corresponding authors: blancaortiz@ucm.es; ibarba@ucm.es

Supporting information summary: Equipment; Synthesis of SPIONs via thermal decomposition and transfer to aqueous media by ligand exchange (experimental and Figure S1); Characterization of SPIONs-OA by TEM, DLS, DRX and magnetic properties (Figure S2); TEM images of nanoparticles after ligand exchange (SPIONs-DMSA) and subsequent functionalization with the RGD peptide (SPIONs-DMSA-RGD) (Figure S3); Study of stability of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD aqueous colloids measured by DLS (Figure S4); ζ-potential measurements of the different colloidal SPIONs in water (Figure S5); Cell viability assay with Alamar Blue (Figure S6); ROS intracellular content (Figure S7); Confocal microscopy (Figure S8) and transmission electron microscopy images (Figure S9) of cells exposed to SPIONs.

Equipment

The crystalline structure of the SPIONs was analysed by X-ray diffraction (XRD) using a Philips X'Pert diffractometer with Bragg-Brentano geometry operating with CuKα radiation (λ = 1.5406 Å), (Philips Electronics NV, Eindhoven, Netherlands). XRD patterns were collected in the 2θ range between 10° and 80°, with a step size of 0.04° and a contact time of 5 s per step.

The iron content of the different samples was determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in a Perkin Elmer Optima 2100 DV ICP apparatus. Prior to the analysis, samples were digested at 90 °C in HNO_3/HCl (1:3) and diluted with Milli-Q water.

Hydrodynamic size was measured by dynamic light scattering (DLS) from a dilute suspension of the sample in toluene, in water or in a standard complete cell culture medium consisting of DMEM with 10% of FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Electrophoretic mobility measurements of the nanoparticles suspended in water were used to calculate the zeta-potential (ζ) value of the SPIONs. The measurements of ζ-potential in water of SPIONs after incubation in complete cell culture medium (DMEM + 10% FBS) at 37 ºC during 24 h, required recovering the nanoparticles from the protein/saccharide-rich medium. To do this, the colloidal suspensions were centrifuged, washed with water, and finally resuspended in water and sonicated for 5 minutes. The DLS and electrophoretic mobility measurements were performed in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom) equipped with a 633 nm "red" laser. Samples were measured in quintuplicate (n = 5).

Particle size and shape were determined by transmission electron microscopy (TEM) using JEOL JEM 1400 instrument operated at 120 kV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) and equipped with a CDD camera (KeenView Camera). Sample preparation was performed by placing a drop of dilute colloidal suspensions onto a carbon-coated copper grip.

A magnetometer with a SQUID type sensor (Superconducting Quantum Interference Device, MPMS-XL type SQUID) was used to measure the magnetic properties of the different iron oxide nanoparticles. For the measurement of liquid samples, 100 µL of sample were placed on a piece of cotton wool, allowed to dry and pressed into a sample holder. The hysteresis loops were measured at 24.8 °C up to 5 T, and the magnetic saturation was obtained by extrapolating to 1/H = 0 the high field part of the magnetization curve.

Fourier transformed infrared (FTIR) spectra were collected in a Thermo Nicolet Nexus spectrometer (Waltham, MA, USA) equipped with a Goldengate attenuated total reflectance (ATR) device.

Chemical microanalysis was performed using Perkin Elmer 2400 CHN and LECO CHNS-932 thermoanalyzers.

Synthesis of SPIONs-DMSA

Colloidally stable iron oxide nanoparticles in aqueous media (SPIONs-DMSA) were synthesized by thermal decomposition of an iron-containing precursor followed by ligand exchange according to a previously described procedure (Figure S1) [1].

Synthesis of Iron (III) Oleate [2]*:* A total of 45 g of sodium oleate 82% (0.12121 mol) and 10.8 g of $FeCl_3.6H_2O$ 97% (0.03877 mol) were added to a mixture of 60 mL of distilled water, 80 mL of absolute ethanol and 140 mL of hexane. The mixture was heated to 70 °C and vigorously stirred for 4 h. After cooling down to room temperature, the orange-brown organic phase was washed with ethanol/water mixtures: 1 × (15 mL:35 mL) plus 2 × (25 mL:25 mL). Hexane and traces of water and ethanol were removed in a rotary evaporator resulting in an iron (III) oleate as a dense product that was stored in an oven at 50 °C. Yield 33.57 g, 96.2%.

Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs-OA): In the absence of oxygen, 4.5 g of iron (III) oleate were mixed with 0.71 g of oleic acid (90%) in 50 mL of octadecene (90%) in a 250 mL three-neck round bottom flask equipped with a reflux condenser, mechanical stirring (stirrer shaft), nitrogen flow and thermometer. The mixture was stirred at 340 rpm and heated to boiling temperature. When the temperature reached 50 °C, the stirring was stopped and the nitrogen flow was shut off at 100 °C. Once reflux was reached (315 °C), the reaction was kept at this temperature for 1 h and then allowed to cool to room temperature. In order to remove excess oleic acid on the surface of the nanoparticles, the resulting product was washed with ethanol several times until a clean supernatant was obtained (*ca.* 15 × 30 mL using centrifugation cycles at 7500 rpm for 15 min). The material (SPIONs-OA) was dried under an air stream and resuspended in toluene.

Transfer to Aqueous Media by Ligand Exchange (SPIONs-DMSA): A suspension of 50 mg of SPIONs-OA nanoparticles in 20 mL toluene was added to a solution of 200 mg of DMSA (98%) in 5 mL of DMSO. The obtained suspension was placed in several glass vials that were shaken on a carousel (rotary shaker) at a constant speed for 3 days. DMSA-coated iron oxide nanoparticles precipitated adhering to the wall of the glass vial, and the supernatant was discarded. The nanoparticles were then recovered and washed 4 times with ethanol by centrifugation at 7500 rpm for 20 min. The washes were carried out to remove possible traces of organic solvents present in the exchange (toluene and DMSO). The black solid was dried under an air stream and resuspended in 5 mL of distilled water. The pH of the suspension was adjusted to 10 with 2 M NaOH and dialyzed against distilled water for 72 h using a 12 kDa cellulose membrane in order to remove any traces of DMSA not bound to the SPIONs. Finally, the pH of the colloidal suspension of SPIONs-DMSA was adjusted to 7 and passed through a 0.22 μm filter.

[1] Salas, G.; Casado, C.; Teran, F.J.; Miranda, R.; Serna, C.J.; Morales, M.P. Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 21065. https://doi.org/10.1039/C2JM34402E

[2] Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J. G.; Noh, H. J.; Kim, J. Y.; Park, J. H.; Hwang, N. M.; Hyeon, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials* **2004**, *3(12)*, 891. https://doi.org/10.1038/nmat1251

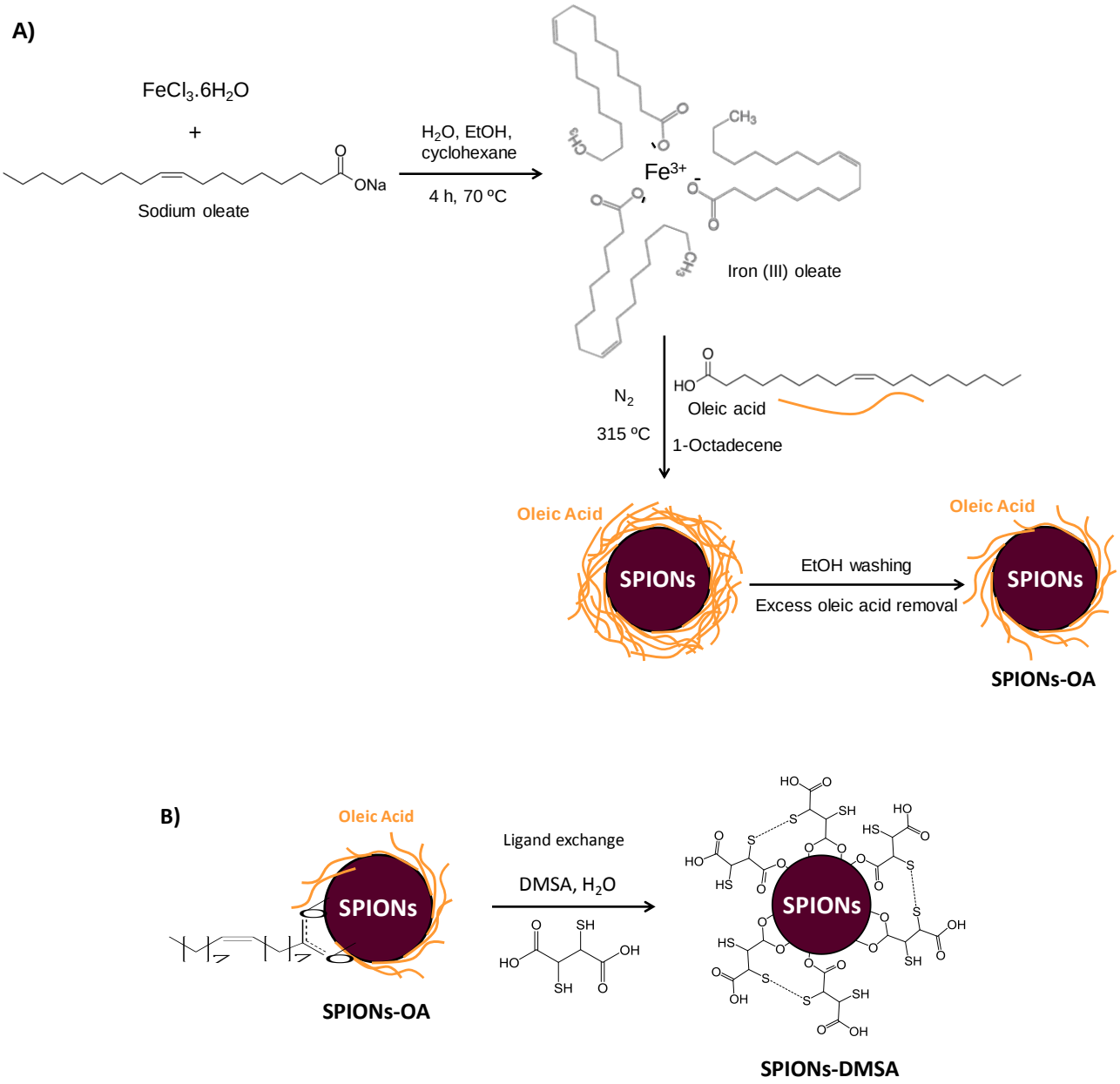


Figure S1. A) Scheme of synthesis of SPIONs-OA and B) subsequent ligand exchange to produce SPIONs-DMSA colloidally stable in an aqueous medium.

Characterization

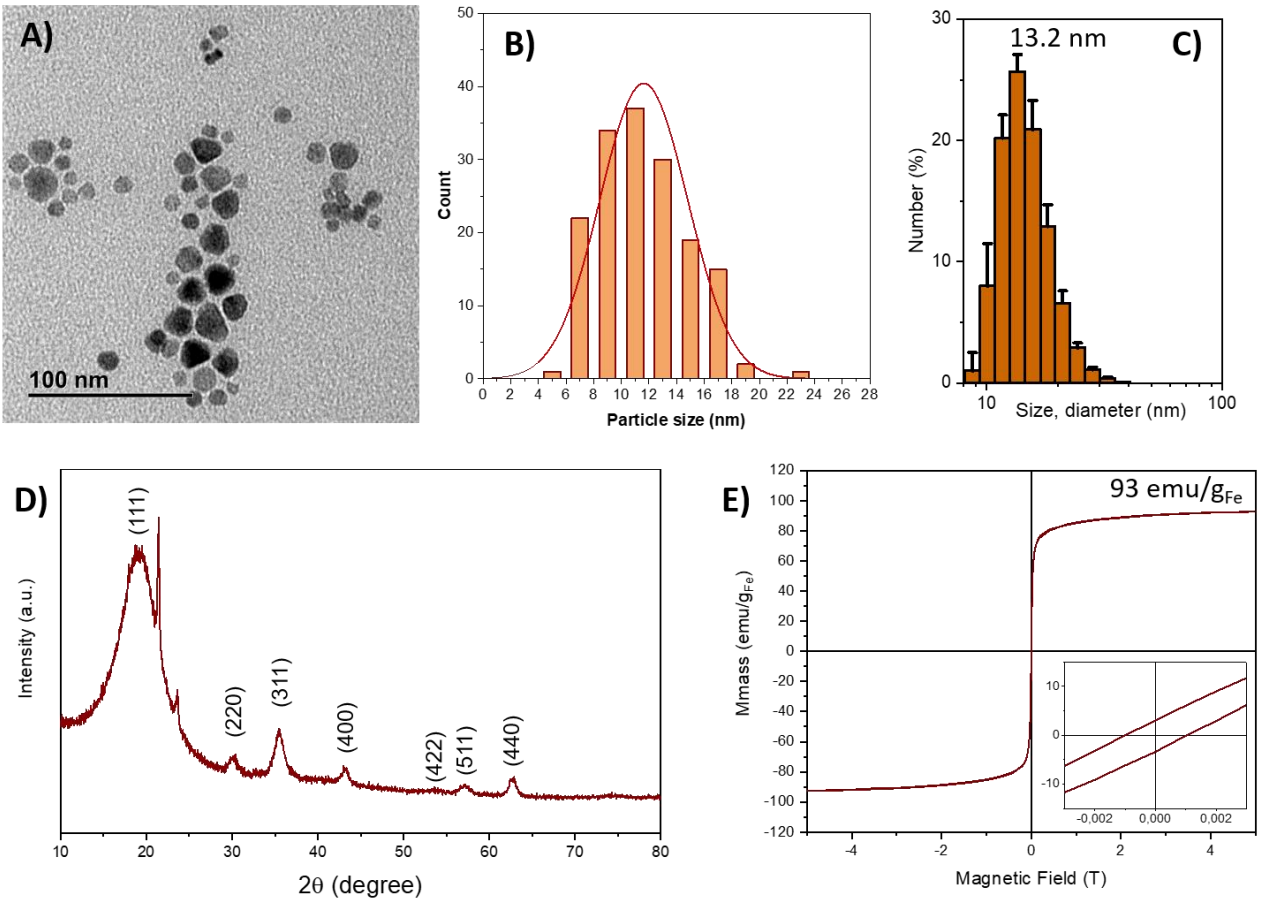


Figure S2. A) TEM image, B) nanoparticles size distribution obtained by statistical treatment of different TEM images, C) size distribution obtained by dynamic light scattering of SPIONs-OA in toluene, D) powder X-ray diffraction pattern and E) magnetization curve normalized to the grams of iron of as-synthetized SPIONs-OA. Inset in E) Magnification of the magnetization curve at low fields (–0.003 to +0.003 T).

TEM analysis confirmed a fairly uniform nanoparticle size of SPIONs-OA, with dimensions between *ca.* 7 and 17 nm, and quasi-spherical faceted nanoparticle morphologies (Figure S2.A). Figure S2.B shows the histogram of nanoparticle diameters (n = 161) as measured in TEM images with the best-fit lognormal distribution superimposed. The mean size and the standard deviation from the statistical analysis resulted in being 11.6 ± 3.2 nm. The normality test using the Kolmogorov-Smirnov approximation indicates that the data are significantly drawn from a normally distributed population. The dispersity value, or polydispersity index, of 0.27 was calculated as the ratio between the standard deviation and the mean of the particle diameter distribution, confirming that the size distribution of SPIONs-OA prepared with the optimized conditions presents a homogeneous population, as indicated by values lower than 0.3 [3]. The size value obtained by TEM is in good agreement with results obtained by dynamic light scattering of SPIONs-OA in toluene, being a monomodal and narrow size distribution in the range 6-30 nm with the maximum at 13.2 ± 0.8 nm.

[3] Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057

The XRD pattern of SPIONs-OA sample (Figure S2.C) shows six maxima that were indexed as (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) and (4 4 0) of a cubic spinel structure. The lattice parameter calculated from the (3 1 1) reflection was 8.38 Å, which is consistent with that of magnetite [4]. The crystalline size (D_{XRD}), calculated from the broadening of the (3 1 1) reflection of the spinel structure using the Scherrer's equation [5], was 6.7 nm.

To evaluate the magnetic behavior of these SPIONs-OA, they were characterized under a direct current (DC) magnetic field. The DC experiments showed loops with coercive fields lower than 3 mT, which can be considered as absence of a hysteresis loop on the magnetization curve, *i.e.*, coercivity and remanence close to zero. Saturation magnetization values of 93 emu/g_{Fe} are close to the bulk value for magnetite (~100 emu/g_{Fe}) and, moreover, the initial slopes show a rapid approach to saturation, suggesting a high magnetic susceptibility. All these facts demonstrate the superparamagnetic-like behavior of the synthetized SPIONs-OA at room temperature (Figure S2E) [6].

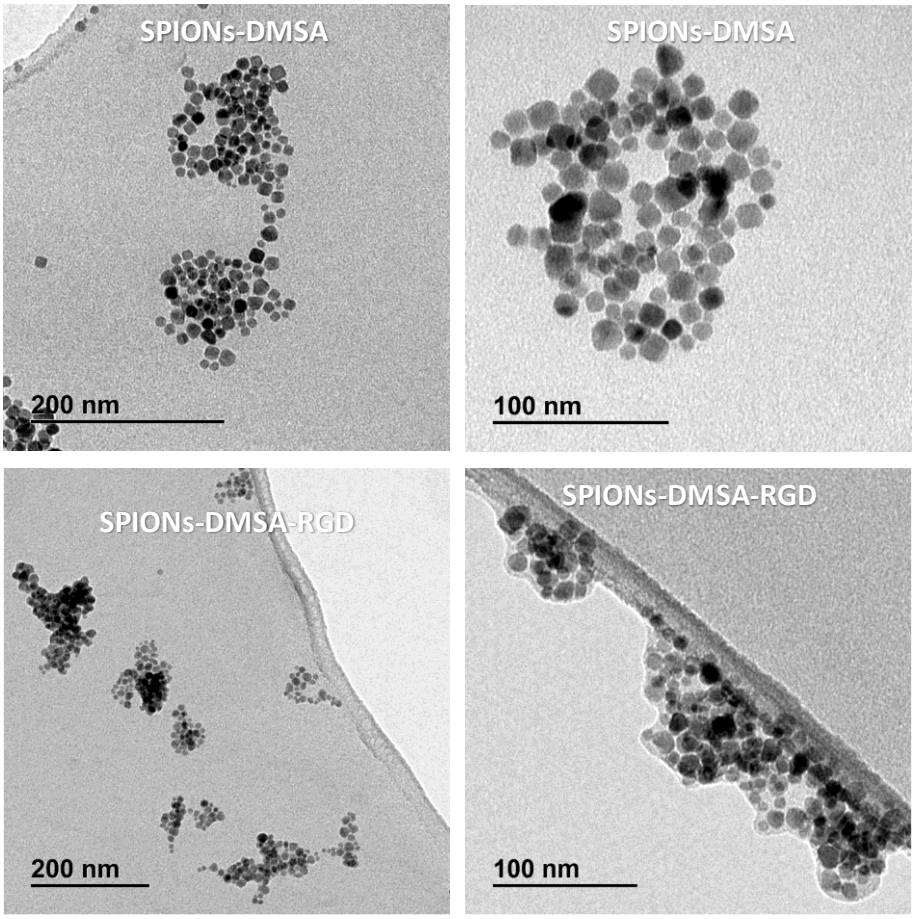


Figure S3. TEM images of ligand exchanged SPIONs-DMSA (up) and functionalized with the RGD peptide SPIONs-DMSA-RGD (down) nanoparticles.

[4] Roca, A.G., Veintemillas-Verdaguer, S., Port, M., Robic, C., Serna, C.J., Morales, M.P. (). Effect of nanoparticle and aggregate size on the relaxometric properties of MR contrast agents based on high quality magnetite nanoparticles. *The journal of physical chemistry B* **2009**, *113(19)*, 7033-7039. https://doi.org/10.1021/jp807820s

[5] B.D. Cullity, "Elements of X-Ray Diffraction", Addison-Wesley Publishing Company Inc., Massachusetts, USA, 1978, M. Cohen Editor, 2nd Edition, page 102

[6] Guardia, P.; Batlle-Brugal, B.; Roca, A.G.; Iglesias, O.; Morales, M.P.; Serna, C.J.; Labarta, A.; Batlle, X. Surfactant effects in magnetite nanoparticles of controlled size. J. Magn. Magn. Mater. 2007, 316, 756–759.

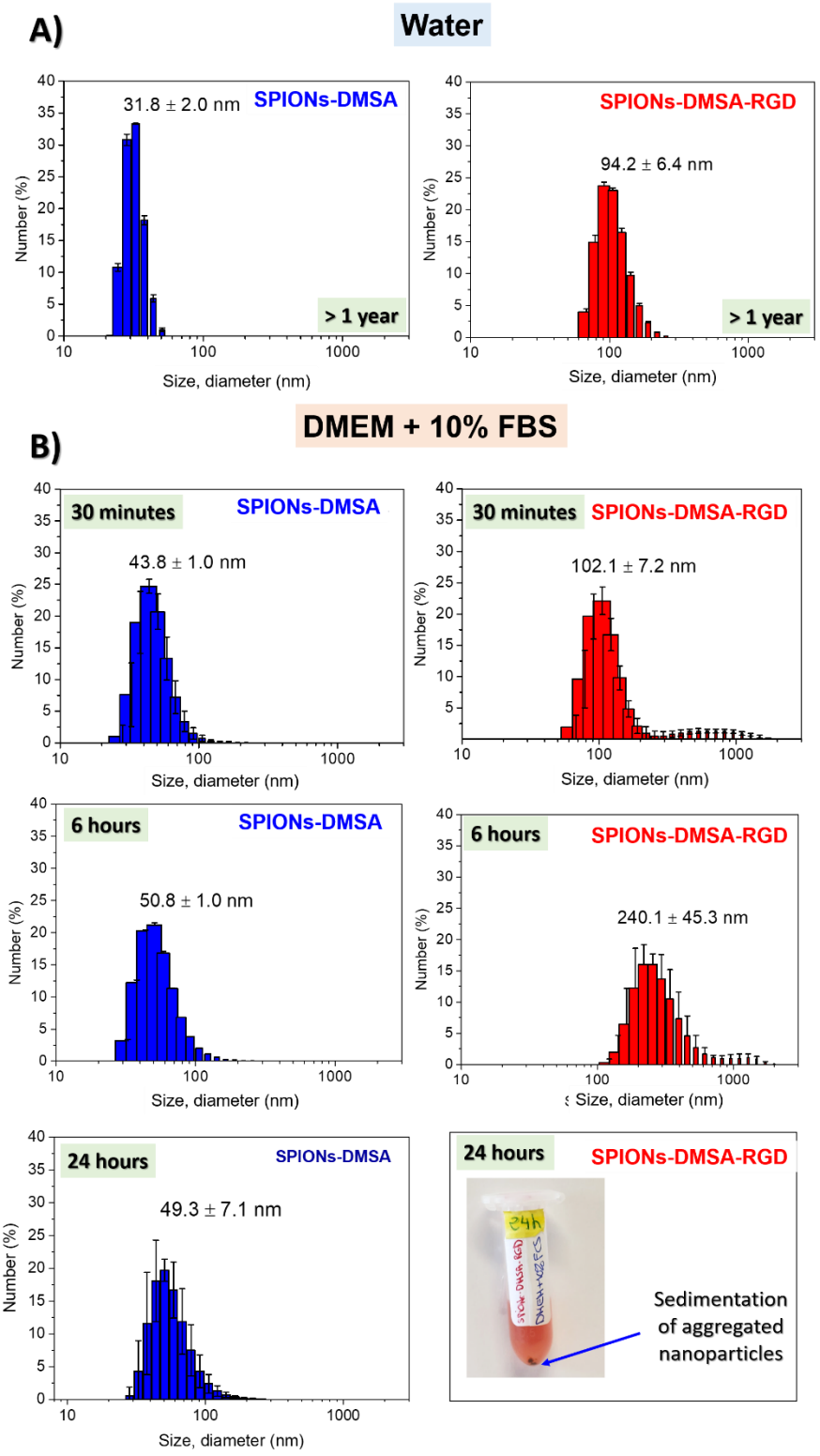


Figure S4. A) Stability study of aqueous colloids SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD measured by dynamic light scattering (DLS), showing reproducible hydrodynamic size distributions for more than 1 year after their preparation. B) Evolution versus time of the hydrodynamic size of the different SPIONs in complete cell culture medium (DMEM + 10% FBS). The data are shown as the mean ± standard deviation of five measurements.

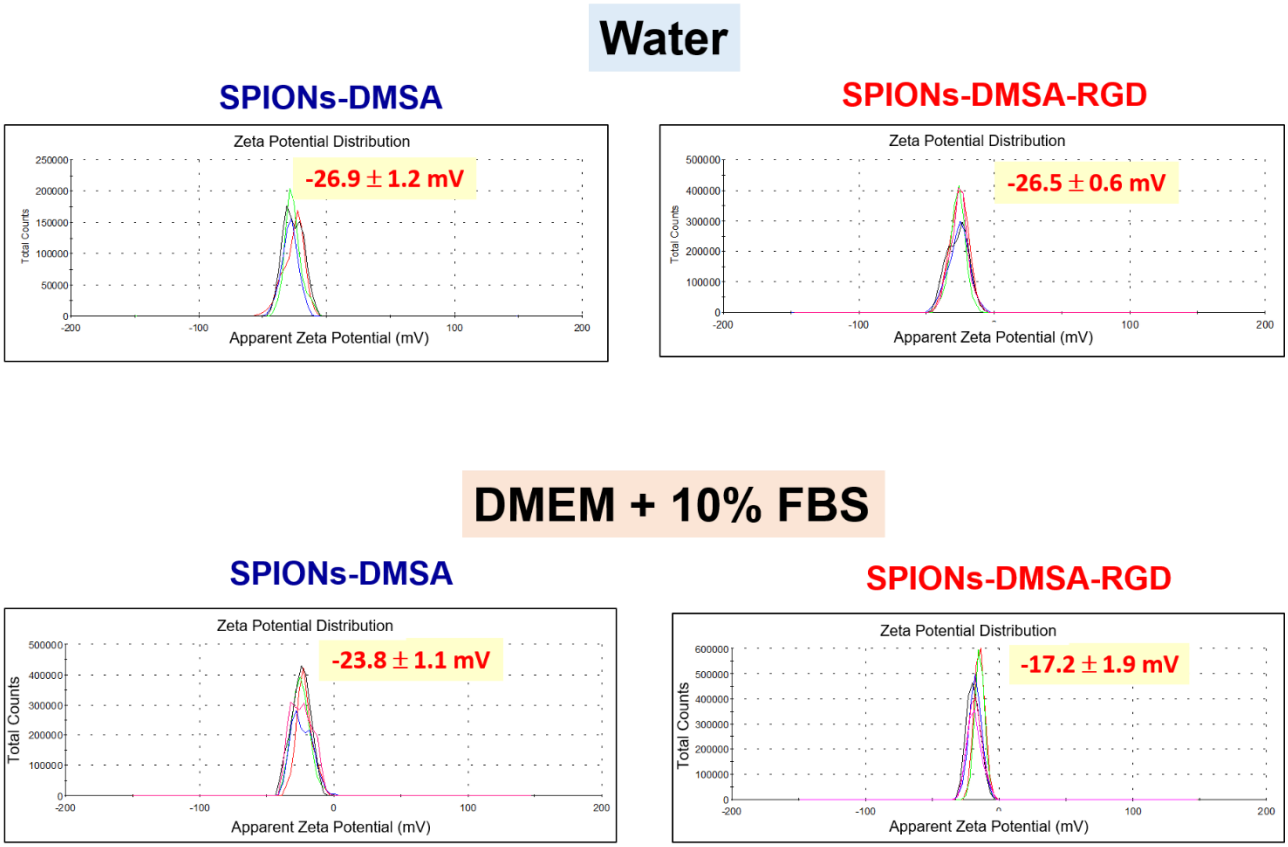


Figure S5. ζ-potential measurements of the different colloidal SPIONs in water (up). ζ-potential measurements of the different colloidal SPIONs were conducted in water before and after being incubated in complete cell medium (DMEM + 10% FBS) during 24 h (down). The data are shown as the mean ± standard deviation of five measurements.

Cell viability assay with Alamar Blue

The percentage viability of hBM-MSCs after 24 h in contact with SPIONs was determined by fluorescence intensity with a Synergy4 Multimode Plate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) with excitation and emission wavelengths of 560 and 590 nm, respectively. The Alamar Blue method (AbD Serotec, Oxford, UK) was used following the manufacturer's instructions. Cells were exposed to 10% AlamarBlue™ HS cell viability reagent solution for 4 h at 37 °C in the dark prior to fluorescence measurements.

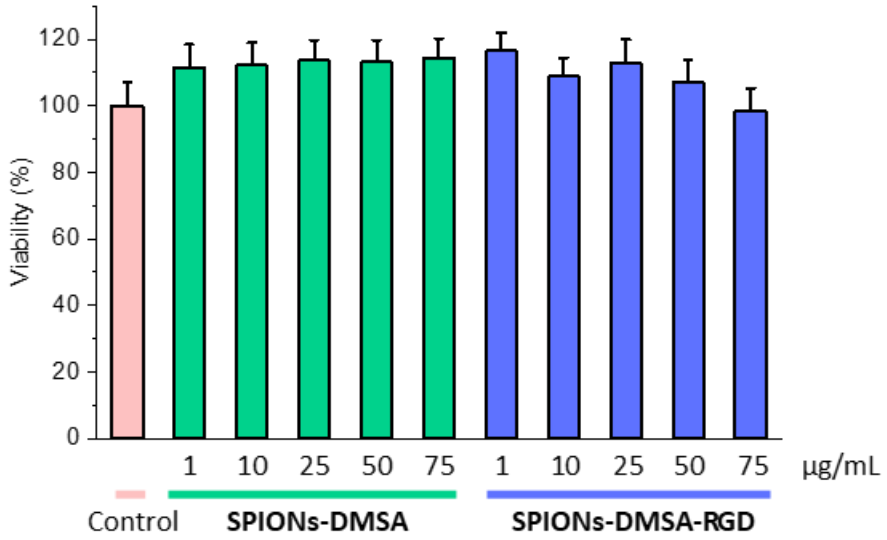


Figure S6. Viability of hBM-MSCs after 24 h of exposure to SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD at different concentrations (1, 10, 25, 50 and 75 µg/mL of Fe_3O_4) measured by Alamar Blue. No significant differences were observed with respect to control cells.

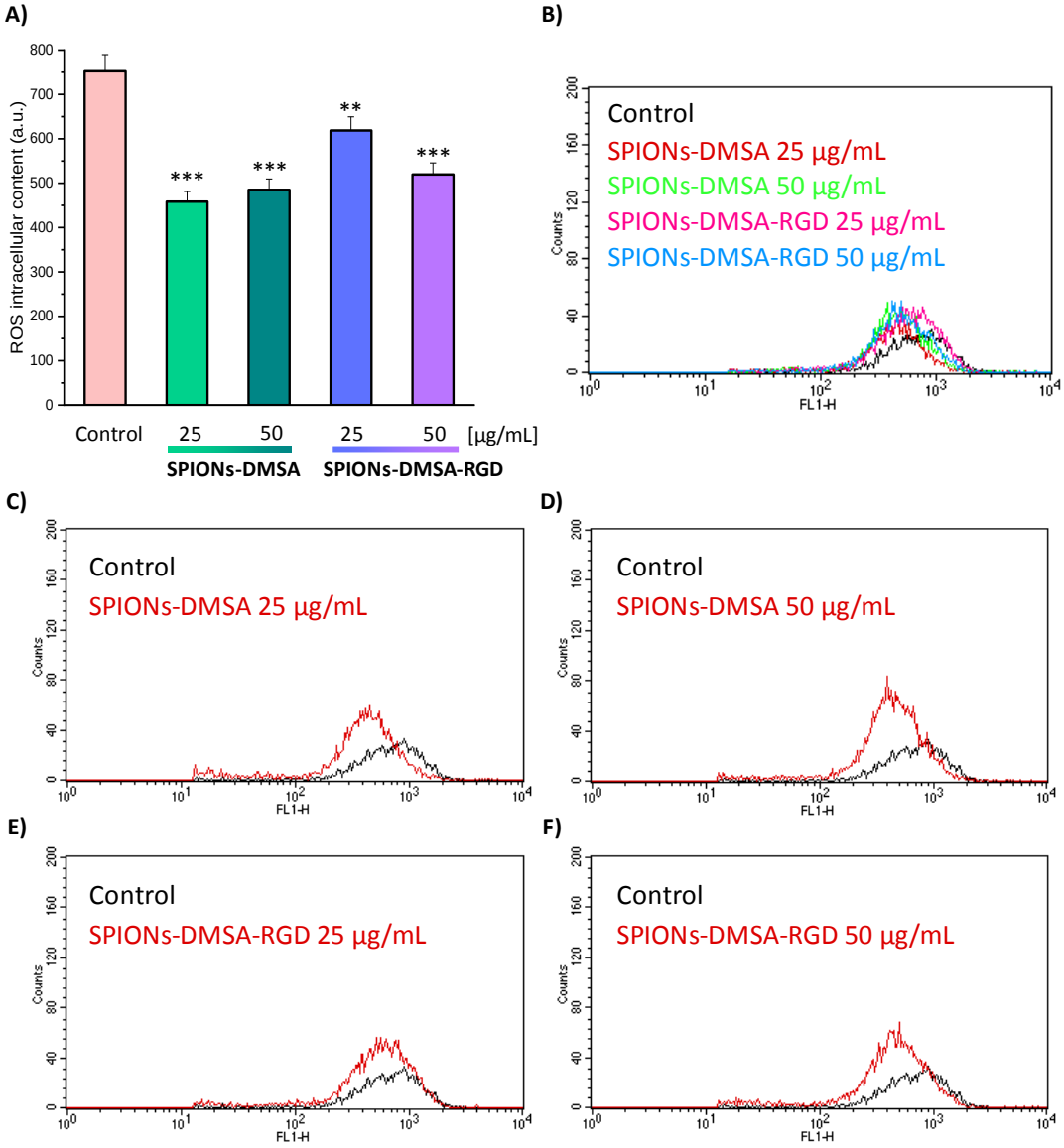


Figure S7. Fluorescence intensity of the intracellular ROS content of hBM-MSCs assessed by flow cytometry after 24 h of exposure to SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD nanoparticles. Data represented in a bar graph (A). Statistical significance: **p < 0.01 (vs Control), ***p < 0.005 (vs Control). Overlay of the ROS-associated fluorescence intensity profiles (FL1-H) of all conditions studied (B). Overlay of the ROS-associated fluorescence intensity profiles (FL1-H) of the control condition and SPIONs-DMSA 25 µg/mL (C), control and SPIONs-DMSA 50 µg/mL (D), control and SPIONs-DMSA-RGD 25 µg/mL (E), control and SPIONs-DMSA-RGD 50 µg/mL (F). The profiles are obtained from the R3 quadrant (live cells, ROS-positive) of the cytometry analysis.

Confocal microscopy. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in PBS for 15 min, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) at 4 °C for 5 min. The samples were then washed with PBS and incubated for 20 min with Phalloidin-Atto 550 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) (1:40 dilution) to stain the F- actin filaments. Samples were then washed with PBS and the cell nuclei were stained with 4′,6-diamidine-2′-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) (1:1000 dilution) for 5 min. The samples were examined in an OLYMPUS FV1200 Confocal Laser Scanning Microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan). DAPI and Phalloidin-Atto 550 staining were shown in blue and red, respectively.

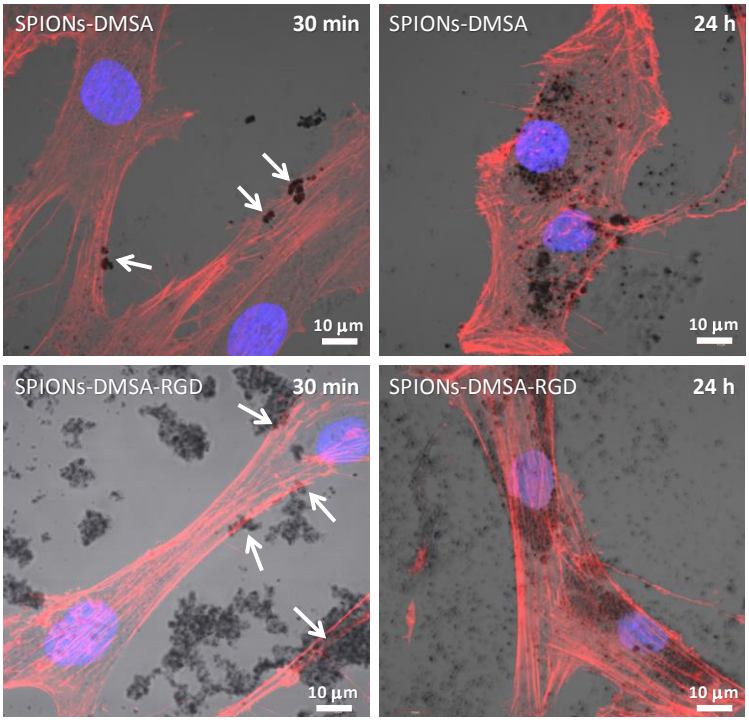


Figure S8. Confocal microscopy images of hBM-MSCs after 30 min (left) and 24 h (right) in presence of 50 µg/mL of SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD, respectively. SPIONs are visualized by transmittance microscopy, F-actin filament of the cell cytoskeleton is visualized in red and cell nucleus in blue.

Localization of SPIONs in hBM-MSCs cells. Cells were exposed to SPIONs-DMSA-RGD at a concentrations of 50 µg/mL and incubated at 37 °C under 5% CO_2 for either 30 min or 24 h. Afterwards, the cells were harvested, rinsed with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% *p*-formaldehyde in a phosphate buffer ($NaH_2PO_4.H_2O$ 2.26% / NaOH 2.52%, 5:1 vol/vol) for 4 h at 4 °C. After this time, the cells were washed twice with the phosphate buffer and incubated in the buffer at 4 °C overnight. After incubation with 1% OsO_4 in Milli-Q water for 1 h at RT, the samples were washed x3, dehydrated in a graded series of acetone and embedded in resin for 72 h at 67 °C. Ultrafine sections were cut with an ultramicrotome, deposited on copper grids, stained with uranyl acetate and chrome citrate and analyzed by transmission electron microscopy (JEOL 1400, CNME).

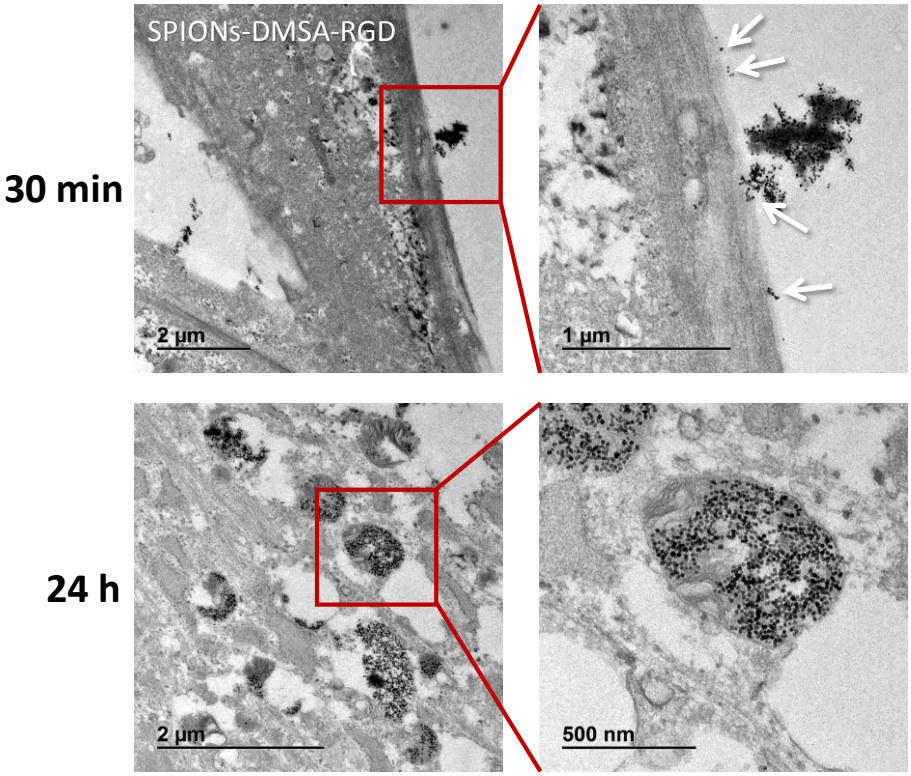


Figure S9. Biological TEM images of hBM-MSCs after incubation with 50 µg/mL with SPIONs-DMSA-RGD for 30 min (top) and 24 h (bottom). In the images after 30 min, the white arrows points to the nanoparticles appearing as scattered black dots interacting with the cell membrane. After 24 h, the complete internalization of the nanoparticles into the cells occurs, as evidenced by the localization of the nanoparticles in the cell vesicles within the cytoplasm.

3.2. Fabricación de andamios tridimensionales magnéticos mediante electrohilado

3.2.1. Introducción y resumen

Como ya se ha mencionado anteriormente, las fracturas óseas osteoporóticas son un problema de salud que afecta a millones de personas en todo el mundo y se prevé que aumenten debido al creciente envejecimiento poblacional [1]. Lamentablemente, en la actualidad no se dispone de soluciones del todo satisfactorias para los injertos óseos debido al insuficiente potencial regenerativo de los defectos y a la eficacia limitada de las opciones de tratamiento [2,3]. El autoinjerto se considera el método de referencia en clínica, pero está muy limitado por su disponibilidad y por la importante morbilidad de la zona donante [4,5]. En respuesta a la necesidad de tratamientos mejorados y novedosos, los avances en la ingeniería del tejido óseo ofrecen multitud de estrategias prometedoras [6-8]. Una de ellas consiste en la combinación de dispositivos biocompatibles, células madre y estímulos mecánicos para crear injertos óseos tridimensionales y funcionales [9,10]. Como se ha demostrado en el apartado anterior de esta tesis doctoral, uno de los métodos utilizados para estimular mecánicamente a las células se basa en el uso de SPIONs y la aplicación de campos magnéticos externos [11-14].

La estimulación mecánica puede utilizarse para facilitar la proliferación, diferenciación y migración de células madre [15]. Las respuestas biológicas se consiguen mediante el proceso de mecanotransducción, por el cuál las células convierten los estímulos mecánicos fisiológicos en señales bioquímicas para activar la respuesta biológica [16]. En este contexto, las SPIONs tienen un papel multifuncional dentro de la medicina regenerativa, donde sus funciones incluyen el marcaje, seguimiento y activación de células madre tanto *in vitro* como *in vivo* [17]. Utilizando esta tecnología se ha demostrado que es posible promover la diferenciación osteogénica de hMSCs en respuesta a la activación magnética utilizando un campo magnético externo oscilante [18]. Así mismo, los andamios que responden magnéticamente se construyen generalmente incorporando partículas magnéticas en otros biomateriales [19]. Cuando los andamios que responden magnéticamente se exponen a un campo magnético, la deformación de los mismos podría estimular la diferenciación de las células madre [20].

Por su parte, el colágeno de tipo I es un biomaterial muy estudiado en la fabricación de andamios biomiméticos para la regeneración del tejido óseo, ya que representa la principal fase orgánica del hueso, además de su alta biocompatibilidad y capacidad para promover la adhesión celular, la proliferación y la regeneración ósea [21-23]. Sin embargo, sus bajas propiedades mecánicas y su alta susceptibilidad a la degradación requieren a menudo tratamientos de entrecruzamiento adicionales, así como la optimización del proceso de fabricación para aumentar la estabilidad de las construcciones finales [24,25].

Además del tipo de material, los métodos de fabricación tienen un papel clave en las características morfológicas, fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del dispositivo final. Entre la gran variedad de técnicas de fabricación existentes, el electrohilado ha despertado un gran interés debido a su potencial en la producción de membranas y estructuras fibrosas [23]. El electrohilado es una técnica robusta para la fabricación de matrices con fibras de tamaños en la nanoescala y la microescala que imitan la naturaleza fibrosa de la ECM nativa [26,27], lo que proporciona un soporte mecánico robusto y un andamiaje adecuado para que las células se adhieran y crezcan. Además, tienen una elevada relación superficie/volumen, lo que proporciona más superficie para la adhesión y el crecimiento celular. Por último, la peculiar flexibilidad de las membranas electrohiladas permitiría la administración de las construcciones tisulares a través de procedimientos mínimamente invasivos como la inyección mediante instrumentos canulados en el lugar de la fractura y laparoscopia [28,29]. Este hecho hace que el dispositivo diseñado sea especialmente adecuado para el tratamiento de lesiones no reparables quirúrgicamente debido a su localización anatómica (por ejemplo, fracturas pélvicas) y al contexto de fragilidad habitual del paciente [29].

Basándonos en las consideraciones anteriores, sería deseable diseñar y desarrollar andamios electrohilados basados en colágeno, dotados de propiedades magnéticas y capaces de favorecer procesos de regeneración ósea.

En este trabajo, hemos explorado por primera vez la combinación de colágeno de tipo I y SPIONs para diseñar andamios electrohilados magnéticos y biocompatibles. Para ello, se obtuvieron SPIONs con un tamaño de 12 nm por descomposición térmica y se transfirieron a un medio acuoso mediante intercambio de ligandos con DMSA. Posteriormente, las SPIONs se incorporaron a soluciones de colágeno de tipo I para probar la procesabilidad de la formulación híbrida resultante mediante electrohilado (**Figura 3.2.**). El método optimizado condujo a la fabricación de andamiajes nanoestructurados compuestos por fibras de colágeno de entre 100 y 200 nm de diámetro orientadas aleatoriamente, donde las SPIONs resultaron distribuidas e incrustadas en las fibras de colágeno. Las estructuras electrohiladas que contenían SPIONs demostraron conservar las propiedades magnéticas de las nanopartículas solas, lo que convierte a estas matrices en excelentes candidatas para explorar los estímulos magnéticos para aplicaciones biomédicas. Además, la evaluación biológica de estos andamios de colágeno confirmó una alta viabilidad, adhesión y proliferación tanto de células preosteoblásticas MC3T3-E1 como de hBM- MSCs.

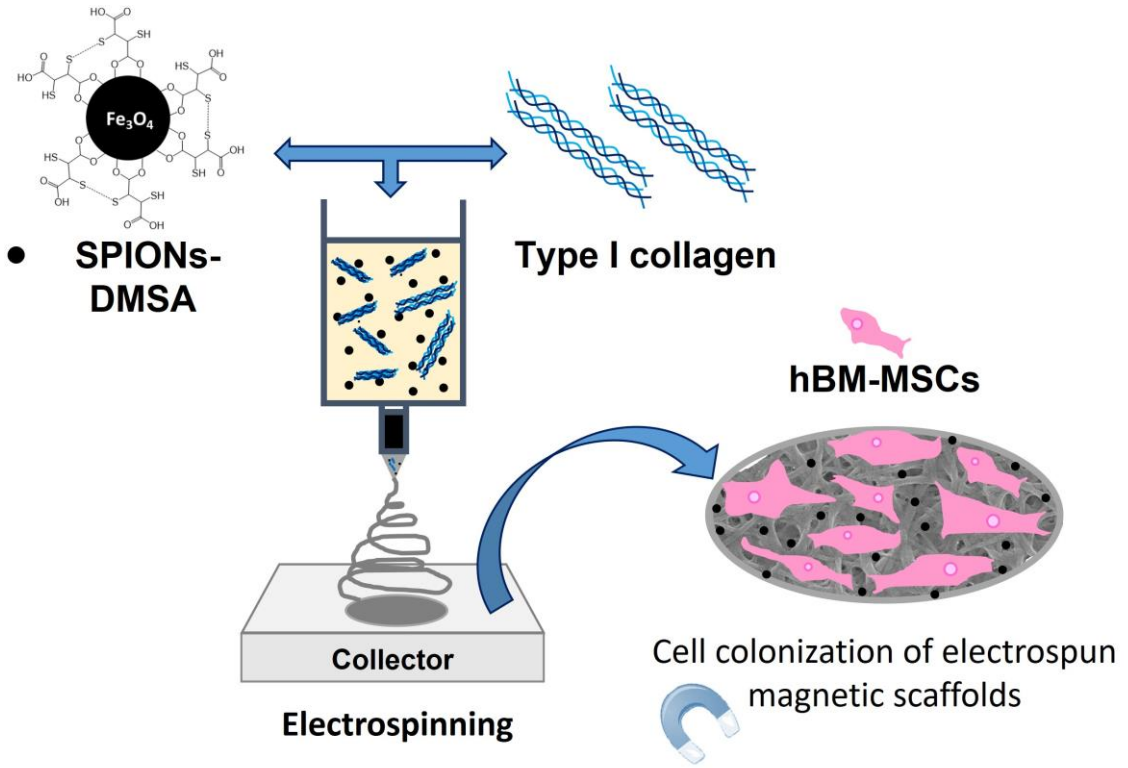


Figura 3.2. Representación esquemática de la combinación de las SPIONs-DMSA y el colágeno de tipo I y su procesado mediante la técnica de electrohilado. Reproducido de la referencia [30].

Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación liderado por la profesora Chiara Vitale Brovarone del *Politecnico di Torino*, donde se realizó el proceso de electrohilado y parte de la caracterización de los andamios. En la Universidad Complutense de Madrid se realizaron el resto de tareas (síntesis y caracterización de SPIONs, caracterización de andamios con SPIONs incorporadas y estudios de citocompatibilidad).

Referencias bibliográficas

[1] Harvey, N., Dennison, E., & Cooper, C. (2010). Osteoporosis: impact on health and economics. *Nature Reviews Rheumatology*, *6*(2), 99-105.

[2] Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for bone regenerative engineering. *Advanced healthcare materials*, *4*(9), 1268-1285.

[3] Battafarano, G., Rossi, M., De Martino, V., Marampon, F., Borro, L., Secinaro, A., & Del Fattore, A. (2021). Strategies for bone regeneration: from graft to tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, *22*(3), 1128.

[4] Santos, M. I., & Reis, R. L. (2010). Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromolecular bioscience*, *10*(1), 12-27.

[5] Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, *78*, 1246-1262.

[6] Dang, M., Saunders, L., Niu, X., Fan, Y., & Ma, P. X. (2018). Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone research*, *6*(1), 25.

[7] Tang, D., Tare, R. S., Yang, L. Y., Williams, D. F., Ou, K. L., & Oreffo, R. O. (2016). Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, *83*, 363-382.

[8] Georgeanu, V. A., Gingu, O., Antoniac, I. V., & Manolea, H. O. (2023). Current options and future perspectives on bone graft and biomaterials substitutes for bone repair, from clinical needs to advanced biomaterials research. *Applied Sciences*, *13*(14), 8471.

[9] Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D., & Cooper Jr, J. A. (1999). Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual review of biomedical engineering*, *1*(1), 19-46.

[10] Hao, Z., Xu, Z., Wang, X., Wang, Y., Li, H., Chen, T., Hu, Y., Chen, R., Huang, K., Chen, C., & Li, J. (2021). Biophysical stimuli as the fourth pillar of bone tissue engineering. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 790050.

[11] Boda, S. K., Thrivikraman, G., & Basu, B. (2015). Magnetic field assisted stem cell differentiation–role of substrate magnetization in osteogenesis. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(16), 3150-3168.

[12] Labusca, L., Herea, D. D., Danceanu, C. M., Minuti, A. E., Stavila, C., Grigoras, M., Gherca, D., Stoian, G., Ababei, G., Chiriac, H., & Lupu, N. (2020). The effect of magnetic field exposure on differentiation of magnetite nanoparticle-loaded adipose-derived stem cells. *Materials Science and Engineering: C*, *109*, 110652.

[13] Henstock, J. R., Rotherham, M., Rashidi, H., Shakesheff, K. M., & El Haj, A. J. (2014). Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy. *Stem cells translational medicine*, *3*(11), 1363-1374.

[14] Xia, Y., Sun, J., Zhao, L., Zhang, F., Liang, X. J., Guo, Y., Weir, M. D., Reynolds, M. A., Gu, N., & Xu, H. H. (2018). Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*, *183*, 151-170.

[15] Sniadecki, N. J. (2010). Minireview: a tiny touch: activation of cell signaling pathways with magnetic nanoparticles. *Endocrinology*, *151*(2), 451-457.

[16] Ingber, D. E. (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *The FASEB journal*, *20*(7), 811-827.

[17] Markides, H., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2012). Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of nanomaterials*, *2012*, 13-13.

[18] Kanczler, J. M., Sura, H. S., Magnay, J., Green, D., Oreffo, R. O., Dobson, J. P., & El Haj, A. J. (2010). Controlled differentiation of human bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle technology. *Tissue engineering Part A*, *16*(10), 3241-3250.

[19] Santos, L. J., Reis, R. L., & Gomes, M. E. (2015). Harnessing magnetic-mechano actuation in regenerative medicine and tissue engineering. *Trends in biotechnology*, *33*(8), 471-479.

[20] Spangenberg, J., Kilian, D., Czichy, C., Ahlfeld, T., Lode, A., Günther, S., Odenbach, S., & Gelinsky, M. (2021). Bioprinting of magnetically deformable scaffolds. *ACS biomaterials science & engineering*, *7*(2), 648-662.

[21] Zhang, D., Wu, X., Chen, J., & Lin, K. (2018). The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive materials*, *3*(1), 129-138.

[22] Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., & Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia*, *8*(9), 3191-3200.

[23] Feng, Y., Shi, Y., Tian, Y., Yang, Y., Wang, J., Guo, H., Banitaba, S. N., Khademolqorani, S., & Li, J. A. (2023). The collagen-based scaffolds for bone regeneration: A journey through electrospun composites integrated with organic and inorganic additives. *Processes*, *11*(7), 2105.

[24] Marques, C. F., Diogo, G. S., Pina, S., Oliveira, J. M., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2019). Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: A comprehensive review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *30*, 1-12.

[25] Montalbano, G., Borciani, G., Cerqueni, G., Licini, C., Banche-Niclot, F., Janner, D., Sola, S., Fiorilli, S., Mattioli-Belmonte, M., Ciapetti, G., & Vitale-Brovarone, C. (2020). Collagen hybrid formulations for the 3d printing of nanostructured bone scaffolds: An optimized genipin-crosslinking strategy. *Nanomaterials*, *10*(9), 1681.

[26] Meamar, R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Norouzi, M. R., Siavash, M., Hamblin, M. R., & Fesharaki, M. (2021). Improved wound healing of diabetic foot ulcers using human placenta-derived mesenchymal stem cells in gelatin electrospun nanofibrous scaffolds plus a platelet-rich plasma gel: A randomized clinical trial. *International immunopharmacology*, *101*, 108282.

[27] Norouzi, M. R., Ghasemi-Mobarakeh, L., Itel, F., Schoeller, J., Fashandi, H., Borzi, A., Neels, A., Fortunato, G., & Rossi, R. M. (2022). Emulsion electrospinning of sodium

alginate/poly (ε-caprolactone) core/shell nanofibers for biomedical applications. *Nanoscale Advances*, *4*(13), 2929-2941.

[28] Chen, S., Carlson, M. A., Li, X., Siddique, A., Zhu, W., & Xie, J. (2021). Minimally invasive delivery of 3D shape recoverable constructs with ordered structures for tissue repair. *ACS biomaterials science & engineering*, *7*(6), 2204-2211.

[29] Melo, P., Montalbano, G., Boggio, E., Gigliotti, C. L., Dianzani, C., Dianzani, U., Vitale-Brovarone, C., & Fiorilli, S. (2022). Electrospun Collagen Scaffold Bio-Functionalized with Recombinant ICOS-Fc: An Advanced Approach to Promote Bone Remodelling. *Polymers*, *14*(18), 3780.

[30] Estévez, M., Montalbano, G., Gallo-Cordova, A., Ovejero, J. G., Izquierdo-Barba, I., González, B., Tomasina, C., Moroni, L., Vallet-Regí, M., Vitale-Brovarone, C., & Fiorilli, S. (2022). Incorporation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles into collagen formulation for 3D electrospun scaffolds. *Nanomaterials*, *12*(2), 181.

nanomaterials

MDPI

Article

Incorporation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Collagen Formulation for 3D Electrospun Scaffolds

Manuel Estévez [1,†], Giorgia Montalbano [2,†], Alvaro Gallo-Cordova [3], Jesús G. Ovejero [3], Isabel Izquierdo-Barba [1,4,*], Blanca González [1,4], Clarissa Tomasina [5], Lorenzo Moroni [5], María Vallet-Regí [1,4], Chiara Vitale-Brovarone [2] and Sonia Fiorilli [2,*]

1 Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, 28040 Madrid, Spain; manestev@ucm.es (M.E.); blancaortiz@ucm.es (B.G.); vallet@ucm.es (M.V.-R.)
2 Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, 10129 Torino, Italy; giorgia.montalbano@polito.it (G.M.); chiara.vitalebrovarone@polito.it (C.V.-B.)
3 Department of Energy Environment and Health, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid C.S.I.C., Sor Juana Inés de la Cruz 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; alvaro.gallo@csic.es (A.G.-C.); jgovejero@ucm.es (J.G.O.)
4 CIBER de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain
5 Complex Tissue Regeneration Department, MERLN Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine, Maastricht University, Universiteitssingel 40, 6229 ET Maastricht, The Netherlands; c.tomasina@maastrichtuniversity.nl (C.T.); l.moroni@maastrichtuniversity.nl (L.M.)
* Correspondence: ibarba@farm.ucm.es (I.I.-B.); sonia.fiorilli@polito.it (S.F.)
† These authors contributed equally to this work.

check for updates

Citation: Estévez, M.; Montalbano, G.; Gallo-Cordova, A.; Ovejero, J.G.; Izquierdo-Barba, I.; González, B.; Tomasina, C.; Moroni, L.; Vallet-Regí, M.; Vitale-Brovarone, C.; et al. Incorporation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Collagen Formulation for 3D Electrospun Scaffolds. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 181. https://doi.org/10.3390/nano12020181

Academic Editors: Jean-Marie Nedelec and Alexander M. Seifalian

Received: 2 November 2021
Accepted: 31 December 2021
Published: 6 January 2022

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

Copyright: © 2022 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: Nowadays, there is an ever-increasing interest in the development of systems able to guide and influence cell activities for bone regeneration. In this context, we have explored for the first time the combination of type-I collagen and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) to design magnetic and biocompatible electrospun scaffolds. For this purpose, SPIONs with a size of 12 nm were obtained by thermal decomposition and transferred to an aqueous medium via ligand exchange with dimercaptosuccinic acid (DMSA). The SPIONs were subsequently incorporated into type-I collagen solutions to prove the processability of the resulting hybrid formulation by means of electrospinning. The optimized method led to the fabrication of nanostructured scaffolds composed of randomly oriented collagen fibers ranging between 100 and 200 nm, where SPIONs resulted distributed and embedded into the collagen fibers. The SPIONs-containing electrospun structures proved to preserve the magnetic properties of the nanoparticles alone, making these matrices excellent candidates to explore the magnetic stimuli for biomedical applications. Furthermore, the biological assessment of these collagen scaffolds confirmed high viability, adhesion, and proliferation of both pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs).

Keywords: SPIONs; type-I collagen; magnetic scaffolds; electrospinning; human bone marrow-derived mesenchymal stem cells; bone regeneration; bone tissue engineering

1. Introduction

Bone disorders and injuries are considered a significant healthy and economic burden affecting millions of people worldwide and they are expected to rise due to the increasing aging of the population and the diffused sedentary lifestyle [1,2]. Despite the current pharmacological and surgical strategies that have demonstrated remarkable progress leading to the improvement of clinical outcomes, these approaches are limited by the poor availability of autologous tissues and the significant donor site morbidity [3,4]. Consequently, especially in pathological conditions, bone tissue engineering has gained great interest as an alternative method to support and stimulate the regeneration of new healthy tissue, where biomaterials and constructs are designed with the aim to guide and rebalance specific cell

activities [5–11]. In this context, three dimensional (3D) scaffolds can be fabricated with the aim to mimic the chemical and morphological features of the native extracellular matrix (ECM), where different biomaterials can be selected and combined to provide specific and multiple stimuli to support the regeneration of the targeted tissue [5].

Among the different existing biomaterials, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have been widely explored in several biomedical applications such as magnetic resonance imaging, cell separation and detection, tissue repair, magnetic hyperthermia, drug and gene delivery [12–15]. Thanks to their superparamagnetic properties, size, biocompatibility, multifunctionality and possibility of further surface modification with various chemical agents, SPIONs represent a promising tool in many fields of medicine [16,17]. Furthermore, the absence of residual magnetization upon removal of an external magnetic stimulus allows for their precise remote control [16,17]. In this framework, SPIONs are particularly useful in regenerative medicine for labelling, tracking, and activation of stem cells [17], since their incorporation into the cells allows remote manipulation upon the application of an external magnetic field gradient. This facilitates the targeting of cells to desired sites for tissue regeneration [18,19], making SPIONS a powerful non-invasive tool in stem cell therapy [20].

With regard to cell activation, different physical forces such as fluid flow, axial compression, tension and magnetism can be used to generate a mechanical stimulus able to promote stem cell proliferation and differentiation [21–23]. These biological responses are achieved through the process of mechanotransduction, whereby cells convert mechanical stimuli into biochemical signals to generate a biological response [24,25]. In this scenario, the use of nanoparticles functionalized with antibodies or peptides targeting ion channels and membrane receptors such as integrins proved to elicit receptor activation and subsequent second messenger signals in human mesenchymal stem cells (hMSCs) [26]. Moreover, following the activation of SPIONs with an oscillating external magnetic field, the differentiation of osteoprogenitor cell populations towards an osteogenic lineage can be favoured [21,27]. In this regard, SPIONs have also demonstrated great potential in the design of magnetic scaffolds for different tissue engineering applications [28,29], especially in the regeneration of bone tissue [30,31], where improved implant integration and newly developed tissue with higher density have been achieved by applying an external magnetic field [32].

The advantages provided by the use of SPIONs can be further enhanced by exploiting their combination with polymeric matrices in order to design smart constructs able to support specific regeneration processes [33–35]. In this view, Johnson and co-workers observed the ability of poly-L-lactic acid (PLLA) electrospun fibrous scaffolds incorporating SPIONs to support neuron guidance, increasing neurite alignment and length within an injectable hydrogel [33].

For applications in bone tissue regeneration, type-I collagen represents a strategic candidate for the fabrication of biomimetic scaffolds since it represents the main organic phase of bone, in addition to the well-known high biocompatibility and ability to promote cell adhesion and proliferation [36–38]. However, the low mechanical properties and its high susceptibility to degradation and denaturation often require additional crosslinking treatments as well as the proper optimization of the manufacturing process to increase the stability of the final constructs [38–40].

Alongside the chemical composition to reproduce the structural features of native ECM, the electrospinning technique is considered a powerful tool to create biomimetic fibrous scaffolds. Electrospun scaffolds possess fibers ranging from the nano- to the microscale and a high surface-area-to-volume ratio, according to the physicochemical properties of the materials and the processing parameters [41,42].

Based on the above considerations, the present study aims at the fabrication of collagen-based electrospun scaffolds provided with magnetic properties through the incorporation of SPIONs into polymeric fibers during the electrospinning process. To the best of our

knowledge, the combination of SPIONs with type-I collagen and the further processing of the resulting hybrid formulation by electrospinning technology have not been explored yet.

Firstly, in this work, uniform SPIONs were produced by a thermal decomposition process and transferred to the water by ligand exchange with dimercaptosuccinic acid (DMSA), obtaining time-stable colloidal suspensions of SPIONs. Subsequently, the developed SPIONs were combined with a type-I collagen solution and the processability of the hybrid formulation was explored by means of electrospinning. The obtained composite scaffolds were characterized and compared with SPIONs-free electrospun collagen mats. The morphological evaluation of the scaffolds was performed using scanning electron microscopy (SEM) and the distribution of the nanosized superparamagnetic particles throughout the collagenous matrix was observed by transmission electron microscopy (TEM), while vibrating sample magnetometry measurements were carried out to investigate the preservation of the magnetic properties. Finally, a preliminary biological assessment of the scaffolds was performed using pre-osteoblastic MC3T3-E1 and hBM-MSCs, to prove their biocompatibility and their ability to be cell colonized as potential platform for bone tissue regeneration.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Sodium oleate 82%, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 97%, oleic acid 90%, octadecene 90%, dimercaptosuccinic acid 98% (DMSA), dimethyl sulfoxide ≥99.9% (DMSO), acetic acid, and 12 kDa cellulose membrane were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol 99.5%, hexane 95% and toluene 99.5% were purchased from PanReac (Barcelona, Spain). All other chemicals (NaOH, HNO_3 65%, HCl 37%, NaCl, $MgCl_2$, etc.) were of the highest quality commercially available and used as received. Milli-Q water (resistivity 18.2 MΩ·cm at 25 °C) was used in all experiments. Type-I collagen powders extracted from rat tails (N_COL) were provided by NOVAICOS Srl (Novara, Italy, https://www.novaicos.com/ (accessed on 20 December 2021)).

2.2. Preparation of SPIONs

Iron oxide nanoparticles were synthetized through thermal decomposition of an iron-containing precursor following a previously described procedure [43].

2.2.1. Synthesis of Iron (III) Oleate

A total of 45 g of sodium oleate (82%) and 10.8 g of $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (97%) were added to a mixture of 60 mL of distilled water, 80 mL of absolute ethanol and 140 mL of hexane. The mixture was heated to 70 °C and vigorously stirred for 4 h. After cooling down to room temperature, the orange-brown organic phase was washed with ethanol/water mixtures: 1 × (15 mL:35 mL) plus 2 × (25 mL:25 mL). Hexane and traces of water and ethanol were removed in a rotary evaporator resulting in an iron (III) oleate as a dense product that was stored in an oven at 50 °C.

2.2.2. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles

In the absence of oxygen, 4.5 g of iron (III) oleate were mixed with 0.71 g of oleic acid (90%) in 50 mL of octadecene (90%) in a 250 mL three-neck round bottom flask equipped with a reflux condenser, mechanical stirring (stirrer shaft), nitrogen flow and thermometer. The mixture was stirred at 340 rpm and heated to boiling temperature. When the temperature reached 50 °C, the stirring was stopped and the nitrogen flow was shut off at 100 °C. Once reflux was reached (315 °C), the reaction was kept at this temperature for 1 h and then allowed to cool to room temperature. The resulting product was washed with ethanol several times until a clean supernatant was obtained (ca. 15 × 30 mL using centrifugation cycles at 7500 rpm for 15 min). The material was dried under an air stream and resuspended in toluene.

2.2.3. Transfer to Aqueous Medium by Ligand Exchange

A suspension of 50 mg of Fe_3O_4 nanoparticles in 20 mL toluene was added to a solution of 200 mg of DMSA (98%) in 5 mL of DMSO. The obtained suspension was placed in several glass vials that were shaken on a carousel (rotary shaker) at a constant speed for 3 days. DMSA-coated nanoparticles precipitated adhering to the wall of the glass vial, and the supernatant was discarded. The nanoparticles were then recovered and washed 4 times with ethanol by centrifugation at 7500 rpm for 20 min. The black solid was dried under an air stream and resuspended in 5 mL of distilled water. The pH of the suspension was adjusted to 10 with 2 M NaOH and dialyzed against distilled water for 72 h using a 12 kDa cellulose membrane. Finally, the pH of the colloidal suspension was adjusted to 7 and passed through a 0.22 μm filter.

2.3. SPIONs Characterization

The crystalline structure of the nanoparticles was analyzed by X-ray diffraction (XRD) with a Bruker D8 Advance diffractometer (Billerica, MA, USA) equipped with a graphite monochromator using CuKα radiation (λ = 1.5406 Å), within 10 and 90 2θ degrees. Particle size and shape were determined by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL JEM 1400 instrument operated at 120 kV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Sample preparation was performed by placing one drop of a dilute suspension in toluene onto a carbon-coated copper grid. A vibrating sample magnetometer MagLabVSM (Oxford Instrument, High Wycombe, UK) was used to measure the magnetic properties of the nanoparticles before and after transfer to the aqueous medium. For the measurement, 25 μL of each sample were placed on a piece of cotton wool, allowed to dry at 50 °C and pressed into a sample holder. The hysteresis loops were measured at 290 K and 5 K up to 3 T, and the maximum magnetization at the maximum field was obtained for comparison. The hydrodynamic size was measured by dynamic light scattering (DLS) from a dilute suspension of the sample in water at pH 7. Electrophoretic mobility measurements for the nanoparticles suspended in water were used to calculate the zeta-potential (ζ) value of the DMSA-coated nanoparticles. Both DLS and electrophoretic mobility measurements were performed in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) equipped with a 633 nm "red" laser. Thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermal analysis (DTA) were performed in a Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA analyzer (Perkin Elmer, CA, USA) by placing approximately 5 mg of sample in a platinum crucible and heating to 800 °C at 5 °C/min under an airflow rate of 100 mL/min. Fourier transformed infrared (FTIR) spectra were collected in a Thermo Nicolet Nexus spectrometer (Waltham, MA, USA) equipped with a Goldengate attenuated total reflectance (ATR) device. The Fe content in the samples was determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in a PerkinElmer Optima 2100 DV ICP apparatus (Waltham, MA, USA). Prior to the analysis, samples were digested at 90 °C in HNO_3/HCl (1:3) overnight and diluted with double distilled water. The same procedure was followed to detect the iron content on the SPIONs containing collagen scaffolds.

2.4. Preparation of SPIONs Containing Collagen Formulation

To obtain the hybrid formulation, SPIONs were firstly homogeneously dispersed in 40% acetic acid in the water, sonicated for 1 h and stirred for 4 h. Subsequently, type-I collagen powders (N_COL) were dissolved into the particle suspension previously stirred overnight at room temperature, obtaining a final formulation containing a concentration of 20% (*w*/*v*) in collagen and a nominal 2% (*w*/*w*) of SPIONs with respect to the collagen weight (20% N_COL/2% SPIONs). In addition, a collagen solution (20 wt%) was prepared to dissolve rat tail collagen powders in 40% acetic acid (20% N_COL), as a reference for the electrospinning tests and the characterization of the designed scaffolds. The resulting 20% N_COL/2% SPIONs suspension and 20% N_COL solution were used for electrospinning tests immediately after preparation.

2.5. Rheology

The rheological assessment of the resulting hybrid formulation was carried out using a DHR-2 controlled stress rotational Rheometer (TA Instruments, Waters, New Castle, DE, USA). For the analysis, the instrument was equipped with a parallel plate geometry of 20 mm in diameter, while a Peltier plate system was exploited to constantly control the sample temperature. Flow ramp tests at 23 °C were conducted to investigate the viscosity of the 20% N_COL/2% SPIONs suspension over a wide range of shear rates (0.01–1000 s^{-1}) and compared with that of the reference 20% N_COL solution.

2.6. Electrospinning of Col/SPIONs Scaffolds

Electrospun scaffolds of 20% N_COL/2% SPIONs and 20% N_COL (as reference) were obtained using a LE-50 Fluidnatek electrospinning system (Bioinicia, Spain) equipped with a temperature and humidity control system. A plate collector and a spinneret tip of 22 G (0.4 mm internal diameter) were used for all the tests to obtain randomly oriented fibrous mats. The electrospinning process was conducted setting a distance between the spinneret tip and collector of 12 cm (working distance) with voltage and flow rate ranging from 20 to 22 kV and 400 to 300 µL/h respectively, in order to obtain a stable material jet. The electrospinning was carried out for 3 h, keeping a constant temperature of 23 °C at 30% humidity in the working chamber. The resulting electrospun matrices were left to dry overnight at room temperature and subsequently chemically crosslinked with a solution of 30 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-hydrochloride (EDC) and 15 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) in ethanol, following a protocol previously optimized by Ribeiro et al. [44]. In brief, electrospun scaffolds were immersed in the EDC/NHS crosslinking solution at 4 °C for 8 h. The scaffolds were subsequently washed with ethanol to remove any crosslinker residuals and dried before analysis.

2.7. Characterisation of the Electrospun Scaffolds

2.7.1. Morphological Assessment

Scanning electron microscopy (SEM) was used to explore the morphological features and measure the fiber diameter of the resulting 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds. For the analysis, samples of the electrospun scaffolds were sputter-coated with platinum (up to 7 nm thickness), and images were acquired using a Desktop SEM Phenom XL (Phenom-World B.V., Eindhoven, The Netherlands) at an accelerating voltage of 15 kV and different magnifications.

The distribution of SPIONs into the collagen fibers of the scaffolds was observed by means of Transmission Electron Microscopy (TEM). For the analysis, the 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds were embedded in Epon 112 for 72 h at 60 °C. Subsequently, ultrathin 50 nm sections were cut with a diamond knife on a Leica EM UC7 microtome and placed on copper TEM grids. Finally, samples were counterstained with 2% uranyl acetate for 30 s and imaged with a FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN iCorr microscope.

2.7.2. Magnetic Properties

Vibrating sample magnetometry (VSM) was used to measure the magnetic properties of the collagen scaffold with the SPIONs incorporated. Circular samples were cut to have a diameter of 4 mm, accurately weighed and pressed into a sample holder. The hysteresis loops were measured at 290 K and 5 K up to 3 T, and the maximum magnetization at the maximum field was obtained for comparison.

2.8. In Vitro Cytocompatibility Tests

Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, L-glutamine, trypsin/0.25% EDTA, Eagle's minimum essential medium (α-MEM) and Triton X-100 were purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA. AlamarBlueTM HS Cell Viability Reagent, Atto 565-conjugated phalloidin and 4′-6-diamino-2′-phenylindole dihydrochloride (DAPI)

were purchased from Invitrogen (Thermo Fisher Waltham, MA, USA). All other chemicals (paraformaldehyde, sucrose, hexamethyldisilazane, 4-(2hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid (HEPES), etc.) were of the highest quality commercially available and used as received.

For the in vitro tests, scaffolds were peeled off from the supporting aluminum foil and cut in pieces of about 20 × 20 mm^2 to enable the punching of disks of 18 mm diameter samples. The discs were immersed in 100% ethanol for 2 s, placed in wells (24-well plate) and secured with a 15 mm O-ring (Viton 51414, Eriks) to prevent floating. This was followed by hydration steps in decreasing ethanol concentrations (90, 70, 60, 50, 40, 30, 15 and 10% ethanol) and finally 100% water, being the contact time for each concentration 2 s. The scaffolds were then sterilized by exposure to UV light for 30 min. Then, samples were incubated in 1 mL of DMEM without FBS for 3 h. Finally, the medium was removed, and the scaffolds were ready for cell seeding.

Human mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) (Lonza Donor 38157, passage 5) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin and 5 mM of L-glutamine. Cells were washed with PBS and then tripsinized with 4 mL of trypsin/EDTA 0.25%. Cells were then centrifuged at 600× *g* for 5 min. The resulting pellet was suspended in 100 µL of culture medium and added drop by drop onto each scaffold (1×10^5 cells/scaffold). Thereafter, 0.9 mL of DMEM were added per well, and scaffolds were incubated at 37 °C in 5% CO_2 for different times. As a control, cells were cultured in TCP at the same density. Assays were also carried out with the pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1 (subclone 4, CRL-2593; ETCC, Mannassas, VA, USA). In this case, cells were cultured in supplemented α-MEM, the number of cells for the scaffold assays was 4×10^4 cells/scaffold and 2×10^4 cells/well (24-well plate) for the Fe_3O_4-DMSA nanoparticles viability assay.

2.8.1. Cell Viability Assay

hBM-MSCs and pre-osteoblastic cell growth onto the scaffolds was determined by fluorescence intensity with a Synergy4 Multimode Plate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 2 and 5 days with excitation and emission wavelengths of 560 and 590 nm, respectively. The Alamar Blue method (AbD Serotec, Oxford, UK) was used according to the manufacturer's instructions. Scaffolds were exposed to 10% AlamarBlue™ HS Cell Viability Reagent solution for 4 h at 37 °C in darkness before fluorescence measurements.

2.8.2. Cell Adhesion and Spreading Assays

hBM-MSCs and pre-osteoblastic cell attachment, morphology and colonization onto the scaffolds were studied by SEM and fluorescence microscopy after 5 days of culture.

For the SEM study, the attached cells were rinsed twice with PBS and fixed with 4% (*w*/*v*) paraformaldehyde in PBS with 1% (*w*/*v*) sucrose at room temperature for 30 min. Thereafter, scaffolds were washed 3 times with PBS, dehydration was performed by slow water replacement by a series of graded ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% ethanol), with final dehydration in absolute ethanol (100% ethanol, 2×). For the drying process, the dehydrated samples were immersed in hexamethyldisilazane (15 min, 2×) and dried overnight. The scaffolds were gold plated in a vacuum using a sputter coater.

For confocal microscopy, the cells adherent onto scaffolds were rinsed twice with PBS and fixed with 4% (*w*/*v*) paraformaldehyde in PBS with 1% (*w*/*v*) sucrose at 37 °C for 20 min, washed again with PBS and permeabilized with buffered 0.5% Triton X-100 (10.3 g sucrose, 0.292 g NaCl, 0.06 g $MgCl_2$, 0.476 g HEPES, 0.5 mL of Triton X-100 in 100 mL of water, pH 7.2) at 4 °C for 5 min. Then, nonspecific bindings were blocked with 1% (*w*/*v*) bovine serum albumin (BSA) in PBS for 20 min at 37 °C. Samples were then incubated at 37 °C for 20 min with Atto 565-conjugated phalloidin (dilution 1:40), which stains actin filaments. After washing with PBS, cell nuclei were stained with DAPI in PBS. Confocal microscopy was analyzed with a confocal laser microscope OLYMPUS FV1200 (OLYMPUS, Tokyo, Japan), using a 60X FLUOR water dipping lens (NA = 1.0). Images were obtained using the software 3D Imaris to project a single 2D image–converted into a TIF file from

the multiple Z sections by using an algorithm displaying the maximum pixel value of each Z 1-µm slice. DAPI and Atto 565-phalloidin staining were shown in blue and red, respectively.

3. Results and Discussion

3.1. Preparation and Characterisation of SPIONs

Iron oxide nanoparticles were prepared to exploit the thermal decomposition of iron (III) oleate as an iron-containing precursor [43,45]. After preparation, a comprehensive structural characterization of the oleic acid stabilized nanoparticles Fe_3O_4-OA was performed and the results are summarized in Figure 1.

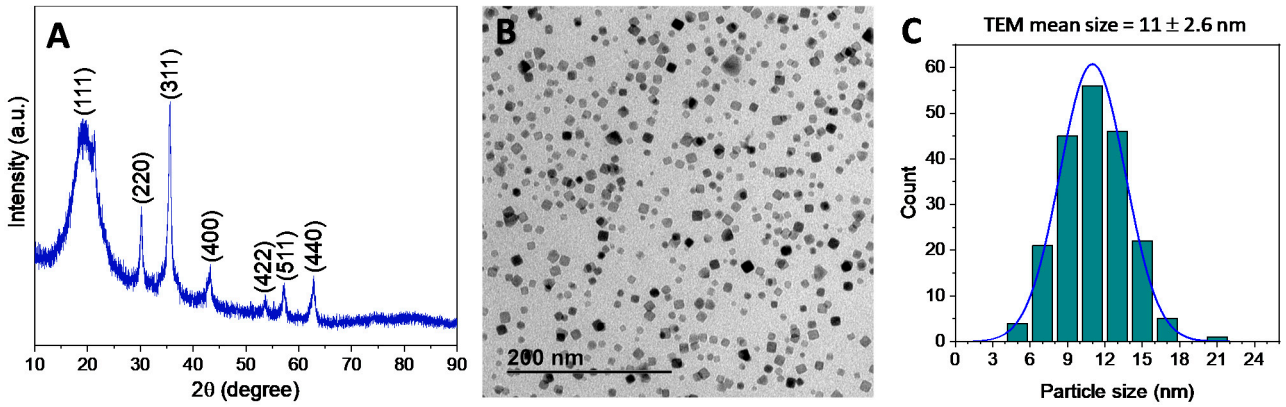


Figure 1. Powder X-ray diffraction pattern (**A**), TEM image (**B**) and NPs size distribution were obtained by statistical treatment of different TEM images (**C**) of Fe_3O_4-OA nanoparticles.

In details, the XRD pattern of the resulting powders (Figure 1A) displays the characteristic maxima (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), and (4 4 0) of a Fe_3O_4 magnetite phase [46]. In addition, TEM analysis (Figure 1B) confirmed a fairly uniform nanoparticle size, with dimensions of ca. 11 nm, and octahedral or truncated octahedral nanoparticle morphologies. As further confirmation, Figure 1C shows the histogram of nanoparticle diameters (n = 200) as measured in TEM images with the best-fit lognormal distribution superimposed. The mean size and the standard deviation from the statistical analysis resulted in being 11.0 ± 2.6 nm, in agreement with the previous data. The normality test using the Kolmogorov-Smirnov approximation indicates that the data are significantly drawn from a normally distributed population. The dispersity value, or polydispersity index, of 0.24 was calculated as the ratio between the standard deviation and the mean of the particle diameter distribution, confirming that the size distribution of Fe_3O_4-OA nanoparticles presents a homogeneous population, as indicated by values lower than 0.3 [47].

The nanoparticles were further processed exploiting a ligand exchange of the oleic acid surface layer with DMSA to obtain a stable suspension of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles in water [43]. Due to the hydrophobic nature of Fe_3O_4-OA nanoparticles, the ligand exchange is considered a necessary step for biological purposes. As confirmation of the successful functionalization, TGA performed on the Fe_3O_4-DMSA nanoparticles showed a weight loss of 15.3% in the 150 to 600 °C temperature range. Moreover, FTIR spectrum (Figure S1) presented a weak absorption peak at 2916 cm^{-1} (due to the aliphatic $\nu_{(CH)}$ modes) and broad bands at 1574 and 1365 cm^{-1} related to the asymmetric and symmetric stretching of the $–COO^-$ groups of DMSA respectively, confirming the successful ligand interchange.

As further confirmation, the DLS measurement of the resulting aqueous suspension indicated a monomodal hydrodynamic size distribution centered at 21 nm (Figure S2). The ζ-potential value of −26.7 mV (measured at pH 7) also indicated that most carboxylic groups at the surface of the nanoparticles are deprotonated, suggesting that the long-term colloidal stability in water can be ascribed to the electrostatic repulsion among $–COO^-$ groups.

3.2. Design and Characterisation of N_COL/SPIONs Electrospun Scaffolds

The possibility to use superparamagnetic nanoparticles to create hybrid formulations suitable for the electrospinning of biocompatible 3D smart collagen-based scaffolds has been explored. To this purpose, before performing the electrospinning tests, rheological analyses on the collagen formulation before and after the addition of SPIONs were conducted to measure the viscosity and the overall processability of the systems. As presented in Figure 2, flow ramp tests were conducted, observing the variation of the viscosity at increasing shear rates (10^{-1}–10^{3} s^{-1}) at a constant temperature of 23 °C, to mimic the environmental conditions used during the electrospinning process. As proved by the curves reported in Figure 2, the introduction of SPIONs did not significantly alter the rheological properties of the system, where both 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs showed a similar shear thinning behaviour, described by the decrease of viscosity at higher shear rates. A slight increase of the viscosity from about 0.5 Pa.s to 2 Pa.s was registered after the addition of SPIONs. Despite the high concentration of collagen, the analysis registered low values of viscosity of the systems, confirming the high solubility of the protein in the selected solvent.

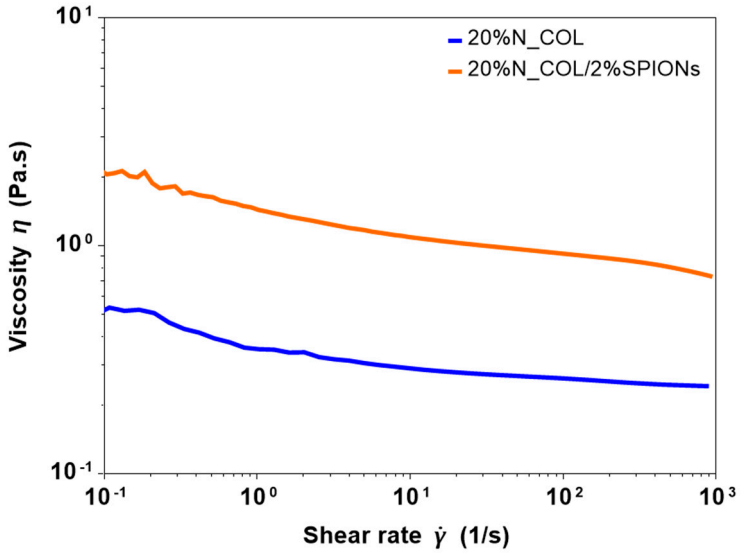


Figure 2. Viscosity of collagen formulation before (20% N_COL) and after (20% N_COL/2% SPIONs) the incorporation of the SPIONs.

In addition, exploratory tests performed at first with the SPIONs-free collagen formulation evidenced the good processability of the selected collagen solution (20% N_COL) by means of electrospinning, leading to homogeneous nanostructured matts characterised by fibres between 100–200 nm in diameter (see Figure 3B).

Based on these promising results, SPIONs were incorporated into the collagen solution, resulting in a final weight percentage of 2% with respect to the collagen weight (20% N_COL/2% SPIONs). The concentration of SPIONs was selected according to the range already reported in the literature [33], with the purpose of achieving magnetically responsive scaffolds while preserving the biocompatibility of the final systems.

The developed 20% N_COL/2% SPIONs formulation was subsequently processed by means of electrospinning, by using a plate collector to obtain random-like fibrous mats.

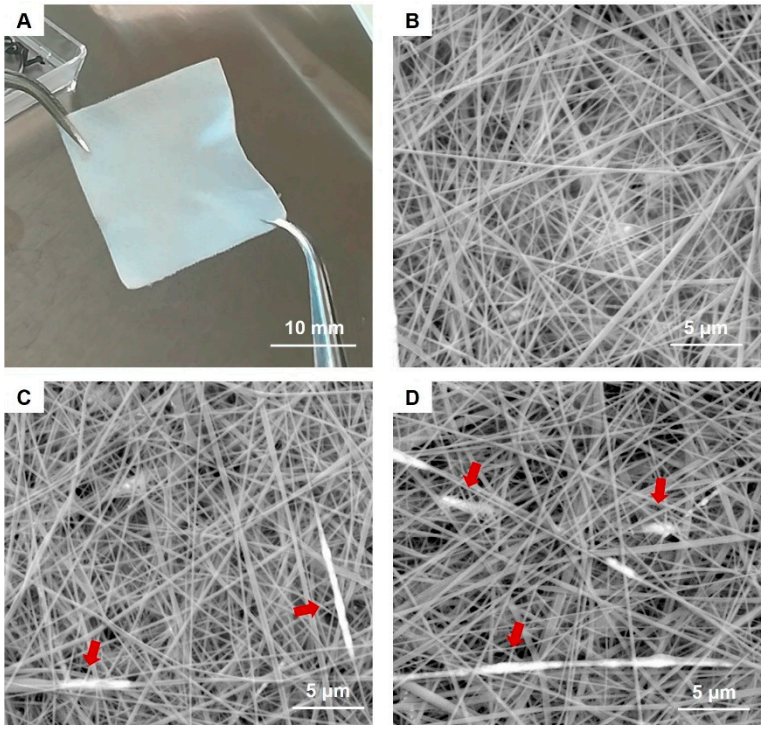


Figure 3. Image of the resulting 20 × 20 mm 20% N_COL/2% SPIONs scaffold (**A**) and SEM images of 20% N_COL (**B**) and 20% N_COL/2% SPIONs (**C**,**D**) showing the fibrous structure at the microscale. Red arrows indicate the presence of SPIONs along the fibers.

For the scaffold preparation, the jet was stabilised, exploiting an applied voltage and material flow of 20 kV and 300 µL/h respectively, keeping constant conditions of temperature and humidity for 3 h. Similarly, the 20% N_COL formulation was processed exploiting applied voltage and flow rate of 22 kV and 400 µL/h respectively, where the resulting scaffolds were used as reference for the further characterisation in terms of morphological, magnetic and biological properties.

To increase the stability of the constructs and avoid a too fast dissolution in aqueous medium, the obtained 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs mats were subsequently chemically crosslinked upon incubation in a solution of 30 mM EDC and 15 mM NHS in ethanol, following a procedure previously reported in the literature [44].

The morphological assessment of the resulting scaffolds (Figure 3A) was subsequently investigated by means of SEM.

SEM images clearly showed the nanostructure of the 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds (Figure 3C,D), characterized by randomly oriented fibres of about 170 nm, evidencing a slight increase in the final fibre diameter compared to the electrospinning of collagen alone (Figure 3B). SEM analysis confirmed the formation of a homogeneous biomimetic system presenting fibres with homogeneous dimension and morphology, mimicking the microarchitectural features of the native ECM. Small aggregates of SPIONs were visible throughout the scaffolds, along the collagen fibers (Figure 3C,D). However, due to the extremely small size of the particles, TEM was exploited to better explore the distribution and the aggregate dimension of SPIONs (Figure 4). As shown in Figure 4, TEM images of both horizontal and vertical sections of the 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds confirmed the embedding of the superparamagnetic particles into the collagen fibers with aggregates not larger than 200 nm in size, without non-significant distortion of both fiber morphology and dimension. The natural high tendency of nanoparticles to aggregate due to their large surface tension and the electrostatic forces involved in the electrospinning process is expected to favour the formation of aggregates. However, the good stability of the Fe_3O_4-DMSA in the solvent and their further dispersion into the collagenous system

avoided the massive aggregation of nanoparticles during the process, as confirmed by the obtained data.

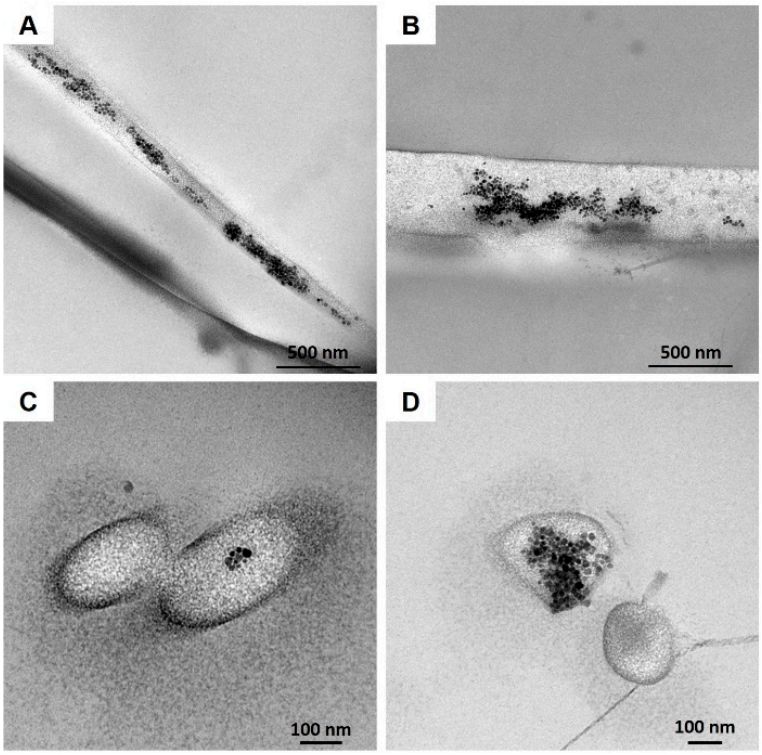


Figure 4. TEM images of 20% N_COL/2% SPIONs highlighting the SPION distribution into the collagen fibers: horizontal (**A**,**B**) and vertical sections (**C**,**D**).

With regard to the magnetic properties of the materials, SPIONs exhibited magnetization curves with similar shape and coercivity at low and room temperatures, both alone or incorporated into the collagen scaffold (Figure 5A,B). As shown in the graphs, coercivity values lower than 3 mT were registered in both cases at room temperature, which for most of the biomedical applications of the SPIONs can be considered as a non-hysteric response, confirming their superparamagnetic behaviour (see insets in Figure 5). At low temperature, the coercivity is 450 Oe for both samples, thus registering no significant differences between nanoparticles alone and SPION-containing scaffolds. Therefore, the similarity between both cycles suggests that the magnetic properties of SPIONs were not affected by their integration into collagen scaffolds.

Furthermore, the Fe_3O_4-OA sample showed a magnetization curve very similar to that presented by the DMSA-coated nanoparticles, indicating that the magnetic properties are also unaffected after ligand exchange (see Figures S3B and 5A).

Finally, the maximum magnetization values normalized to Fe content calculated for SPIONs alone and Coll/SPIONs scaffolds resulted to be consistent, M_{SPIONs} (3 T, RT-5K) = 106–123 emu/gFe and $M_{SPIONs\text{-}Scaffold}$ (3 T, RT-5K) = 107–130 emu/gFe, confirming that the integration into the collagen matrix does not affect the magnetic response of the nanoparticles. The magnetization value at 3 T normalized to the total mass of scaffold is reduced to 0.53 emu/g (Figure S3A), as expected, considering that collagen represents 99.4% of the overall weight (based on the amount of Fe as measured by ICP).

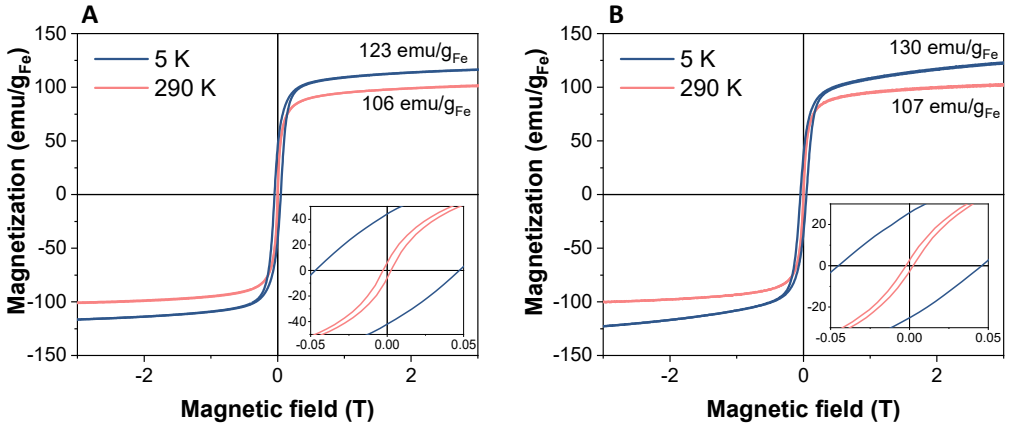


Figure 5. Magnetization curves of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles (**A**) and 20% N_COL/2% SPIONs scaffold (**B**) normalized to the grams of iron. The magnification of the curves at low fields is shown in the insets.

3.3. Biological Assessment

With the aim of demonstrating whether the incorporation of magnetic nanoparticles into electrospun collagen scaffolds influences cell viability, spreading and colonization of the scaffolds, a preliminary cytocompatibility assay was performed using two types of cells, namely hMSCs and MC3T3-E1. Figure 6 shows the proliferation of hMSCs cultured onto 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds at 2 and 5 days, measured by the Alamar Blue method. On day 2, a slight increase in the percentage of cell viability was observed for electrospun collagen scaffolds (20% N_COL) compared to the control (TCP-cultured cells). This observation could be attributed to the nanostructure of the matrix as well as the ability of collagen to enhance cell activity and promote cell adhesion thanks to specific aminoacidic sequences such as RGD and the hexapeptide GFOGER [36]. Similarly, SPIONs containing scaffolds overall preserved cell viability with respect to the control. On day 5, hMSCs cultured onto scaffolds without and with SPIONs equally exhibited notable increase in proliferation, demonstrating that the addition of SPIONs into the collagenous matrix does not affect the final biocompatibility of the system. Furthermore, these results were found to be consistent to those obtained with MC3T3-E1 cells (Figure S4), which indicated good preservation of cell viability for SPION-containing scaffolds. These findings are also coherent with those obtained for nanoparticles alone at different concentrations (Figure S5).

Spreading, colonization and cell morphological studies were carried out on 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds by confocal laser scanning microscopy (Figure 7). Different parts of the scaffolds were scanned after 5 days of culture, using Atto 565-phalloidin as a fluorescence probe for F-actin microfilaments and DAPI fluorostaining for nuclei. The images showed that hMSCs presented their typical spindle-shaped morphology, spread over the surface of the 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds and colonized the entire scaffold without leaving any gaps (Figure 7A,B, respectively) in agreement with what was observed for MC3T3-E1 cells (Figure S6). Moreover, confocal microscopy enabled observation of the presence of cells throughout the entire thickness of the scaffold by taking images at different depths (z-heights). A three-dimensional reconstruction of the different scaffolds was carried out, showing complete colonization of the constructs. Figure 7C shows a representative image at low magnification of the SPION-containing scaffolds. As a detail, a higher magnification image is also shown in Figure 7D, where the cellular lattice arranged throughout the thickness of the scaffold can be clearly observed (see Video S1 in the Supplementary Materials). The results showed complete colonization forming an adequate and complete cellular lattice regardless of the presence of embedded SPIONs.

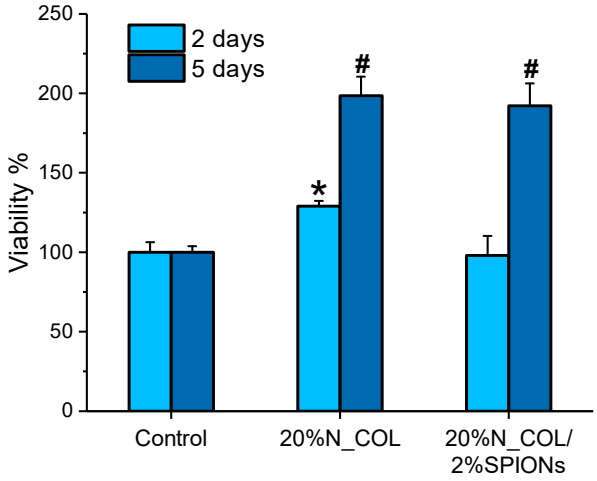


Figure 6. Cell viability of hMSCs incubated onto 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds after 2 and 5 days (measured by Alamar Blue). * indicate $p < 0.01$ vs. control; # indicate $p < 0.001$ vs. control.

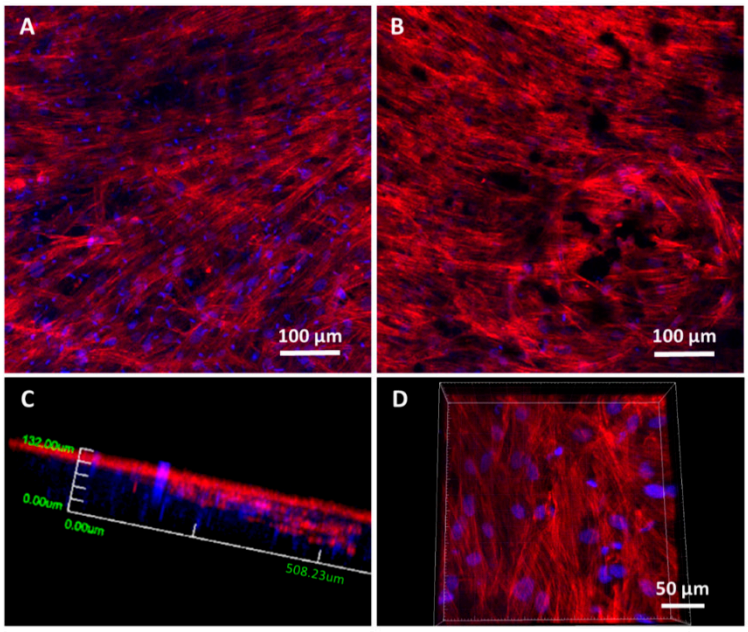


Figure 7. Representative confocal laser scanning microscopy images of hMSCs cultured onto 20% N_COL (**A**) and 20% N_COL/2% SPIONs (**B**–**D**) scaffolds for 5 days. F-actin microfilaments were stained with Atto 565-phaloidin to visualize the cytoskeleton and determine cell morphology (red fluorescence). Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence). Images were generated using Z-axis projections (**A**,**B**). (**C**,**D**) 3D-reconstruction and different magnification of the z-projection corresponding to 20% N_COL/2% SPIONs electrospun scaffold. (**C**) 3D reconstruction at low magnification taken from the surface until a z-height of 200 microns. (**D**) 3D reconstruction at higher magnification taken from the center of the scaffold thickness down to 100 microns.

Cell adhesion, spreading and morphology after 5 days of incubation of both electrospun scaffolds have also been evaluated by SEM (see Figure 8 and Figure S7). After 5 days of culture, the cells appeared to be fully integrated into the scaffold structure, extending their typical projections (filopodia and lamellipodia) into and around the nanofibers (Figure 8A) also in the presence of dispersed SPIONs (Figure 8B). This interaction demonstrates that the cells are not only able to adhere to the surface but are also able to proliferate within the electrospun scaffolds, as demonstrated by confocal analysis.

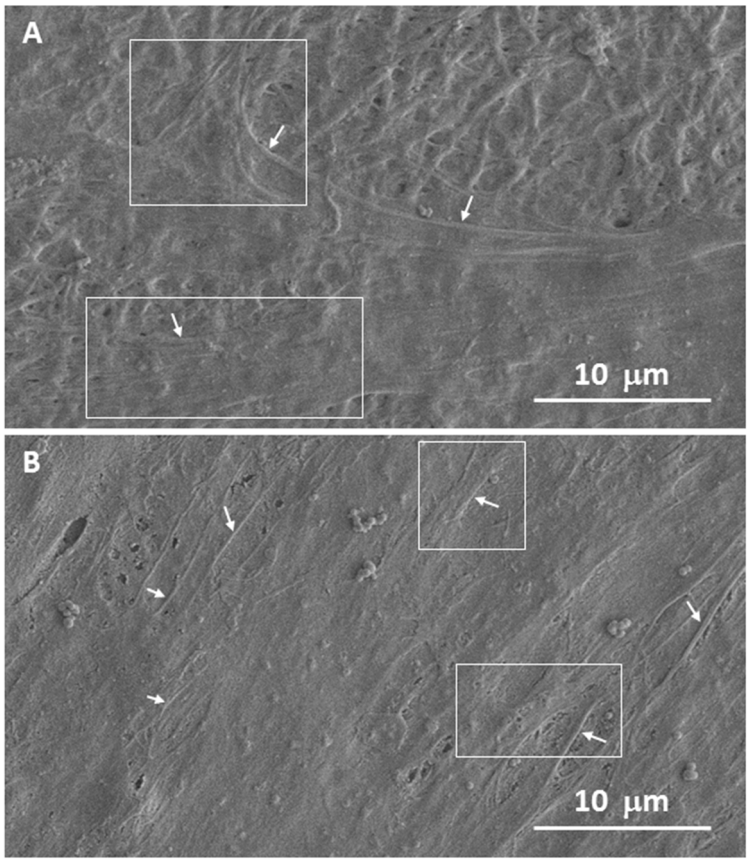


Figure 8. Representative SEM micrographs of hMSCs cultured onto 20% N_COL (**A**) and 20% N_COL/2% SPIONs (**B**) after 5 days of incubation. The areas highlighted in the images with arrows and boxes indicate the different projections of these cells in the form of filopodia and lamellipodia, respectively.

The results shown in Figures 7 and 8 show that after 5 days, the results obtained in the viability test (Figure 5) are corroborated where both electrospun matrices are similarly colonized on their whole surface, demonstrating that the presence of SPIONs does not alter the overall cellular response.

4. Conclusions

In this work, a nanostructured magnetic scaffold composed of type-I collagen embedding superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) has been successfully obtained by electrospinning. To this aim, SPIONs prepared by thermal decomposition and ligand exchange have been homogeneously incorporated into a type-I collagen solution thanks to their enhanced colloidal stability in water medium.

The rheological properties of the system were not significantly altered by the introduction of SPIONs with respect to the SPIONs-free collagen solution investigated as a reference in view of the electrospinning processing. The hybrid formulation has been successfully processed by electrospinning, resulting in nanostructured fibrous mats. The morphological characterization of the scaffolds by means of SEM and TEM confirmed the successful incorporation of the SPIONs, which resulted in being properly embedded in the collagen fibers.

In addition, the magnetic characterization indicated that the superparamagnetic properties of the SPIONs are preserved after their incorporation into the collagen scaffold.

The selected amount of incorporated SPIONs (2% w/w with respect to the collagen weight) was effective in obtaining a saturation magnetization value of 0.53 emu/g referred to the total scaffold weight.

Moreover, the biological assessment performed on the scaffolds proved high viability, adhesion, and proliferation of both hMSCs and MC3T3-E1 cells, proving the high biocompatibility of the final system for the envisaged biomedical applications.

The architecture obtained by electrospinning in combination with the superparamagnetic behaviour of the incorporated SPIONs make the developed electrospun scaffolds very promising tools for advanced and personalized treatments for bone regeneration, and for this ultimate goal, future in-depth studies applying different magnetic fields and their influence on cell differentiation behaviour are underway.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano12020181/s1, Figure S1: FTIR spectrum of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles; Figure S2: Hydrodynamic size distribution obtained by dynamic light scattering of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles suspended in water; Figure S3: Magnetization curve of Fe_3O_4-OA nanoparticles with magnetic saturation value in emu/g of iron; Figure S4: Cell viability of MC3T3-E1 onto 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds measured by Alamar Blue at 2 and 5 days; Figure S5: Viability of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells in contact with different concentrations of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles for 2 h and measured by Alamar Blue at 1 and 4 days of cell culture; Figure S6: Representative confocal laser images of MC3T3-E1 cells cultured onto 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds for 5 days; Figure S7: Confocal and SEM images of hMSCs onto 20% N_COL and 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds for 5 days; Video S1: 3D reconstruction by confocal microscope of 20% N_COL/2% SPIONs scaffolds incubated with hMSC during 5 days, the reconstruction have performed compiling different heights in Z.

Author Contributions: For this research paper, S.F., C.V.-B., I.I-B. and L.M. formulated the research ideas; M.E. and G.M. developed the systems and interpreted the results under the supervision of S.F., L.M., C.V.-B., B.G., I.I.-B., M.E. and G.M. Conceptualization: L.M., C.V.-B., B.G., I.I.-B. and S.F.; methodology, M.E., G.M., A.G.-C., J.G.O. and C.T.; software, M.E. and G.M.; validation, M.E., G.M., A.G.-C., J.G.O., C.T., L.M., C.V.-B., B.G., I.I.-B. and S.F.; formal analysis, M.E. and G.M.; investigation, M.E., G.M., B.G. and I.I.-B.; resources, C.V.-B., L.M. and M.V.-R.; data curation, M.E., G.M., A.G.-C., J.G.O., B.G. and I.I.-B.; writing—original draft preparation, M.E. and G.M.; writing—review and editing, S.F., C.V.-B., L.M., B.G., I.I.-B. and M.V.-R..; visualization B.G., I.I.-B. and S.F.; supervision, S.F., C.V.-B., L.M., B.G., I.I.-B. and M.V.-R.; project administration, S.F., C.V.-B., L.M., I.I.-B. and M.V.-R.; funding acquisition, C.V.-B., L.M., I.I.-B. and M.V.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement No 814410 (GIOTTO) and ERC-2015-AdG (VERDI) Proposal No. 694160.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in ZENODO at 10.5281/zenodo.5812097, https://doi.org/10.5281/zenodo.5812097.

Acknowledgments: We thank Prof. María del Puerto Morales (ICMM/CSIC) for her support and valuable scientific discussions on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, as well as for the use of equipment for the characterization of the magnetic properties. We also thank the ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (UCM). This work was also supported by Compagnia di San Paolo under the initiative "Metti in rete la tua idea di ricerca" in the frame of ZODIAC project. Finally, the Authors would like to acknowledge and thank NOVAICOS Srl for the supply of rat tail type-I collagen (N_COL).

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

References

1. Jakob, F.; Ebert, R.; Ignatius, A.; Matsushita, T.; Watanabe, Y.; Groll, J.; Walles, H. Bone tissue engineering in osteoporosis. *Maturitas* **2013**, *75*, 118–124. [CrossRef]
2. Scheinpflug, J.; Pfeiffenberger, M.; Damerau, A.; Schwarz, F.; Textor, M.; Lang, A.; Schulze, F. Journey into Bone Models: A Review. *Genes* **2018**, *9*, 247. [CrossRef] [PubMed]
3. Henkel, J.; Woodruff, M.A.; Epari, D.R.; Steck, R.; Glatt, V.; Dickinson, I.C.; Choong, P.F.M.; Schuetz, M.A.; Hutmacher, D.W. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions—A 21st Century Perspective. *Bone Res.* **2013**, *1*, 216–248. [CrossRef] [PubMed]
4. Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 1246–1262. [CrossRef] [PubMed]
5. Tang, D.; Tare, R.S.; Yang, L.Y.; Williams, D.F.; Ou, K.L.; Oreffo, R.O.C. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials* **2016**, *83*, 363–382. [CrossRef]
6. Sterling, J.A.; Guelcher, S.A. Biomaterial Scaffolds for Treating Osteoporotic Bone. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2014**, *12*, 48–54. [CrossRef]
7. Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 278–314. [CrossRef]
8. Vallet-Regí, M.; Ruiz-Hernández, E. Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5177–5218. [CrossRef]
9. Vallet-Regí, M.; Lozano, D.; González, B.; Izquierdo-Barba, I. Biomaterials against Bone Infection. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9*, e2000310. [CrossRef]
10. Xie, C.; Ye, J.; Liang, R.; Yao, X.; Wu, X.; Koh, Y.; Wei, W.; Zhang, X.; Ouyang, H. Advanced Strategies of Biomimetic Tissue-Engineered Grafts for Bone Regeneration. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, e2100408. [CrossRef]
11. Cicuéndez, M.; Doadrio, J.C.; Hernández, A.; Portolés, M.T.; Izquierdo-Barb, I.; Vallet-Regí, M. Multifunctional pH sensitive 3D scaffolds for treatment and prevention of bone infection. *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 450–461. [CrossRef] [PubMed]
12. Arias, L.S.; Pessan, J.P.; Vieira, A.P.M.; Lima, T.M.T.D.; Delbem, A.C.B.; Monteiro, D.R. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics* **2018**, *7*, 46. [CrossRef]
13. Guisasola, E.; Asín, L.; Beola, L.; de la Fuente, J.M.; Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Beyond Traditional Hyperthermia. In vivo Cancer Treatment with Magnetic-Responsive Mesoporous Silica Nanocarriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 12518–12525. [CrossRef] [PubMed]
14. González, B.; Ruiz-Hernández, E.; Feito, M.J.; López de Laorden, C.; Arcos, D.C.; Ramírez-Santillán, C.; Matesanz, M.T.; Portolés, M. Vallet-Regí, Covalently bonded dendrimer-maghemite nanosystems: Nonviral vectors for in vitrogene magnetofection. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 4598–4604. [CrossRef]
15. Arcos, D.; Del Real, R.P.; Vallet-Regí, M. A novel bioactive and magnetic biphasic material. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2151–2158. [CrossRef]
16. Dulińska-Litewka, J.; Łazarczyk, A.; Hałubiec, P.; Szafrański, O.; Karnas, K.; Karewicz, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles—Current and prospective medical applications. *Materials* **2019**, *12*, 617. [CrossRef]
17. Markides, H.; Rotherham, M.; El Haj, A.J. Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 614094. [CrossRef]
18. Ho, V.H.; Barcza, A.; Chen, R.; Müller, K.H.; Darton, N.J.; Slater, N.K. The precise control of cell labelling with streptavidin paramagnetic particles. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6548–6555. [CrossRef]
19. Kyrtatos, P.G.; Lehtolainen, P.; Junemann-Ramirez, M.; García-Prieto, A.; Price, A.N.; Martin, J.F.; Gadian, D.G.; Pankhurst, Q.A.; Lythgoe, M.F. Magnetic Tagging Increases Delivery of Circulating Progenitors in Vascular Injury. *JACC Cardiovasc. Interv.* **2009**, *2*, 794–802. [CrossRef]
20. Kim, J.A.; Lee, H.J.; Kang, H.J.; Park, T.H. The targeting of endothelial progenitor cells to a specific location within a microfluidic channel using magnetic nanoparticles. *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 287–296. [CrossRef] [PubMed]
21. Cartmell, S.H.; Dobson, J.; Verschueren, S.B.; El Haj, A.J. Development of magnetic particle techniques for long-term culture of bone cells with intermittent mechanical activation. *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2002**, *99*, 92–97. [CrossRef]
22. Sniadecki, N.J. Minireview: A tiny touch: Activation of cell signaling pathways with magnetic nanoparticles. *Endocrinology* **2010**, *151*, 451–457. [CrossRef]
23. Schwartz, L.; da Veiga Moreira, J.; Jolicoeur, M. Physical forces modulate cell differentiation and proliferation processes. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 738–745. [CrossRef]
24. Ingber, D.E. Cellular mechanotransduction: Putting all the pieces together again. *FASEB J.* **2006**, *20*, 811–827. [CrossRef] [PubMed]
25. Martino, F.; Perestrelo, A.R.; Vinarský, V.; Pagliari, S.; Forte, G. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 824. [CrossRef]
26. Kirkham, G.R.; Elliot, K.J.; Keramane, A.; Salter, D.M.; Dobson, J.P.; El Haj, A.J.; Cartmell, S.H. Hyperpolarization of human mesenchymal stem cells in response to magnetic force. *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2010**, *9*, 71–74. [CrossRef] [PubMed]
27. Kanczler, J.M.; Sura, H.S.; Magnay, J.; Green, D.; Oreffo, R.O.C.; Dobson, J.P.; El Haj, A.J. Controlled differentiation of human bone marrow stromal cells using magnetic nanoparticle technology. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 3241–3250. [CrossRef]

28. Mertens, M.E.; Hermann, A.; Bühren, A.; Olde-Damink, L.; Möckel, D.; Gremse, F.; Ehling, J.; Kiessling, F.; Lammers, T. Iron oxide-labeled collagen scaffolds for non-invasive MR imaging in tissue engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 754–762. [CrossRef] [PubMed]
29. Bettini, S.; Bonfrate, V.; Valli, L.; Giancane, G. Paramagnetic Functionalization of Biocompatible Scaffolds for Biomedical Applications: A Perspective. *Bioengineering* **2020**, *7*, 153. [CrossRef]
30. Mortimer, C.J.; Wright, C.J. The fabrication of iron oxide nanoparticle-nanofiber composites by electrospinning and their applications in tissue engineering. *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, 1600693. [CrossRef]
31. Tanasa, E.; Zaharia, C.; Hudita, A.; Radu, I.C.; Costache, M.; Galateanu, B. Impact of the magnetic field on 3T3-E1 preosteoblasts inside SMART silk fibroin-based scaffolds decorated with magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110*, 110714. [CrossRef]
32. Yun, H.M.; Ahn, S.J.; Park, K.R.; Kim, M.J.; Kim, J.J.; Jin, G.Z.; Kim, H.W.; Kim, E.C. Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. *Biomaterials* **2016**, *85*, 88–98. [CrossRef]
33. Johnson, C.D.L.; Ganguly, D.; Zuidema, J.M.; Cardinal, T.J.; Ziemba, A.M.; Kearns, K.R.; Mccarthy, S.M.; Thompson, D.M.; Ramanath, G.; Borca-Tasciuc, D.A.; et al. Injectable, Magnetically Orienting Electrospun Fiber Conduits for Neuron Guidance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *11*, 356–372. [CrossRef]
34. Friedrich, R.P.; Cicha, I.; Alexiou, C. Iron Oxide Nanoparticles in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2337–2409. [CrossRef] [PubMed]
35. Hashemzadeh, H.; Allahverdi, A.; Sedghi, M.; Vaezi, Z.; Tohidi Moghadam, T.; Rothbauer, M.; Fischer, M.B.; Ertl, P.; Naderi-Manesh, H. PDMS Nano-Modified Scaffolds for Improvement of Stem Cells Proliferation and Differentiation in Microfluidic Platform. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 668–683. [CrossRef] [PubMed]
36. Ferreira, A.M.; Gentile, P.; Chiono, V.; Ciardelli, G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3191–3200. [CrossRef]
37. Montalbano, G.; Fiorilli, S.; Caneschi, A.; Vitale-brovarone, C. Type I Collagen and Strontium-Containing Mesoporous Glass Particles as Hybrid Material for 3D Printing of Bone-Like Materials. *Materials* **2018**, *11*, 700. [CrossRef]
38. Zhang, D.; Wu, X.; Chen, J.; Lin, K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 129–138. [CrossRef]
39. Marques, C.F.; Diogo, G.S.; Pina, S.; Oliveira, J.M.; Silva, T.H.; Reis, R.L. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: A comprehensive review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, 32. [CrossRef] [PubMed]
40. Montalbano, G.; Borciani, G.; Cerqueni, G.; Licini, C.; Banche-Niclot, F.; Janner, D.; Sola, S.; Fiorilli, S.; Mattioli-Belmonte, M.; Ciapetti, G.; et al. Collagen Hybrid Formulations for the 3D Printing of Nanostructured Bone Scaffolds: An Optimized Genipin-Crosslinking Strategy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1681. [CrossRef]
41. Jun, I.; Han, H.; Edwards, J.R.; Jeon, H. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 745. [CrossRef] [PubMed]
42. Schiffman, J.D.; Schauer, C.L. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications a Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polym. Rev.* **2008**, *48*, 317–352. [CrossRef]
43. Salas, G.; Casado, C.; Teran, F.J.; Miranda, R.; Serna, C.J.; Morales, M.P. Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 21065–21075. [CrossRef]
44. Ribeiro, N.; Sousa, S.R.; van Blitterswijk, C.A.; Moroni, L.; Monteiro, F.J. A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. *Biofabrication* **2014**, *6*, 035015. [CrossRef] [PubMed]
45. Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891–895. [CrossRef]
46. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, *16*, 023501. [CrossRef]
47. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [CrossRef]

Nanomaterials

Supplementary Materials

Incorporation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Collagen Formulation for 3D Electrospun Scaffolds

Manuel Estévez [1,†], Giorgia Montalbano [2,†], Alvaro Gallo-Cordova [3], Jesús G. Ovejero [3], Isabel Izquierdo-Barba [1,4,*], Blanca González [1,4], Clarissa Tomasina [5], Lorenzo Moroni [5], María Vallet-Regí [1,4], Chiara Vitale-Brovarone [2] and Sonia Fiorilli [2,*]

[1] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12; manestev@ucm.es (M.E.); blancaortiz@ucm.es (B.G.); vallet@ucm.es (M.V.-R.)
[2] Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, 10129 Torino, Italy; giorgia.montalbano@polito.it (G.M.); chiara.vitalebrovarone@polito.it (C.V.-B.)
[3] Department of Energy Environment and Health, Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid C.S.I.C. Sor Juana Inés de la Cruz 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; alvaro.gallo@csic.es (A.G.-C.); jgovejero@ucm.es (J.G.O.)
[4] CIBER de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain
[5] Complex Tissue Regeneration Department, MERLN Institute for Technology-Inspired Regenerative Medicine, Maastricht University, Universiteitssingel 40, 6229 ET Maastricht, The Netherlands; c.tomasina@maastrichtuniversity.nl (C.T.); l.moroni@maastrichtuniversity.nl (L.M.)
* Correspondence: ibarba@farm.ucm.es (I.I.-B.); sonia.fiorilli@polito.it (S.F.)
† These authors contributed equally to this work.

Supplementary Materials:

Figure S1: FTIR spectrum of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles; **Figure S2:** Hydrodynamic size distribution obtained by dynamic light scattering of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles suspended in water; **Figure S3:** Magnetization curve of Fe_3O_4-OA nanoparticles at 290 K (A) and magnetization curve of 20%N_COL/2%SPION scaffold at 290 K and 5 K with magnetic saturation value in emu/g of scaffold; **Figure S4:** Cell viability of MC3T3-E1 onto 20%N_COL and 20%N_COL/2%SPIONs scaffolds measured by Alamar Blue at 2 and 5 days; **Figure S5:** Viability of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells in contact with different concentrations of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles for 2 hours and measured by Alamar Blue at 1 and 4 days of cell culture; **Figure S6:** Representative confocal laser scanning microscopy images of MC3T3-E1 cells cultured onto 20%N_COL and 20%N_COL/2%SPIONs scaffolds for 5 days. **Figure S7:** Confocal and SEM images of hMSCs onto 20%N_COL and 20%N_COL/2%SPIONs scaffolds for 5 days; **Video S1:** 3D reconstruction by confocal microscopy of 20%N_COL/2%SPIONs scaffolds incubated with hMSC during 5 days, the reconstruction have performed compiling different heights in Z.

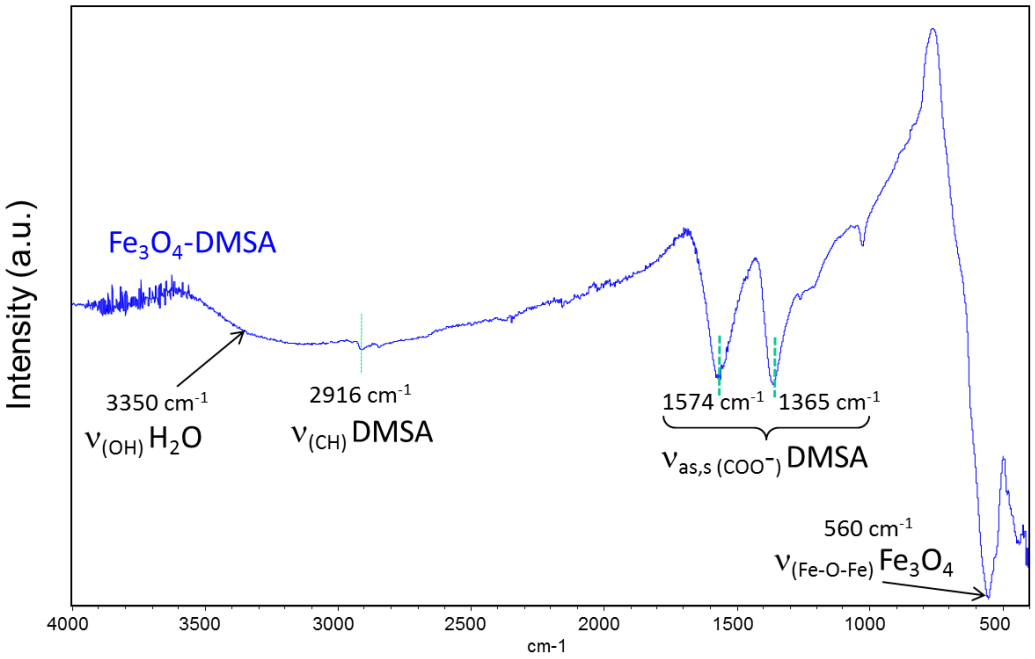


Figure S1. FTIR spectrum of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles in the 4000–400 cm^{-1} region.

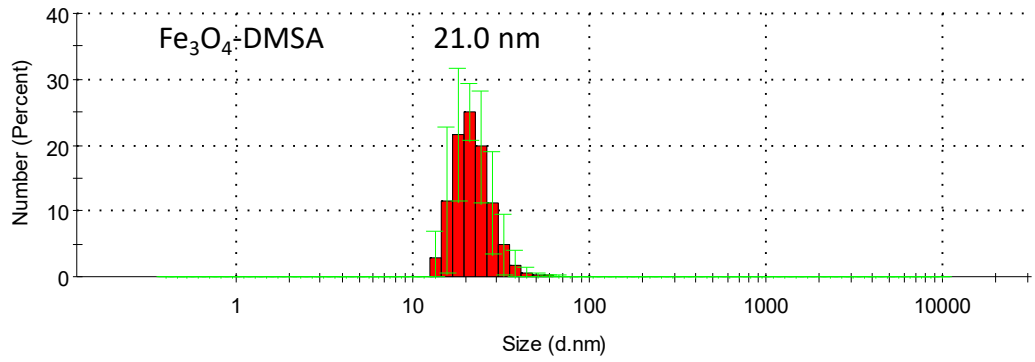


Figure S2. Hydrodynamic size distribution obtained by dynamic light scattering of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles suspended in water.

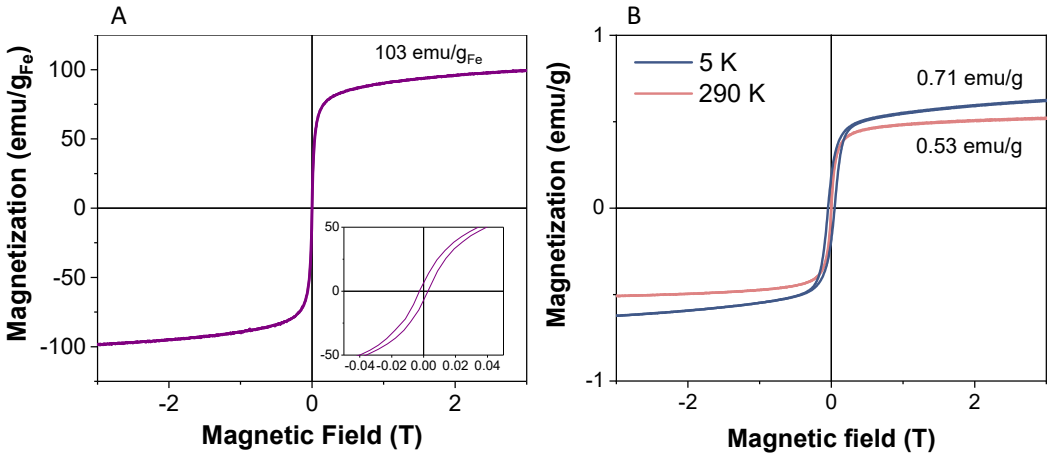


Figure S3. Magnetization curve of Fe_3O_4-OA nanoparticles at 290 K with magnetic saturation value in emu/g of iron (**A**) and magnetization curve of 20%N_COL/2%SPION scaffold at 290 K and 5 K with magnetic saturation value in emu/g of scaffold (**B**). The magnification of the magnetization curve of Fe_3O_4-OA nanoparticles is shown in the inset.

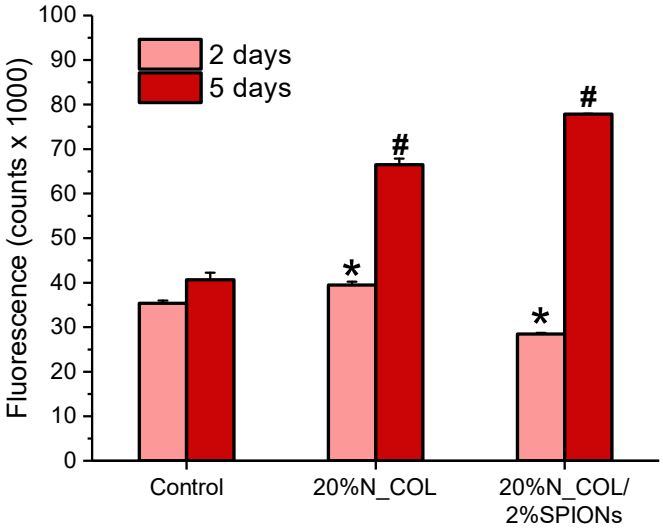


Figure S4. P Cell viability of MC3T3-E1 onto 20%N_COL and 20%N_COL/2%SPIONs scaffolds measured by Alamar Blue at 2 and 5 days. * indicate $p < 0.05$ vs control; # indicate $p < 0.01$ vs control.

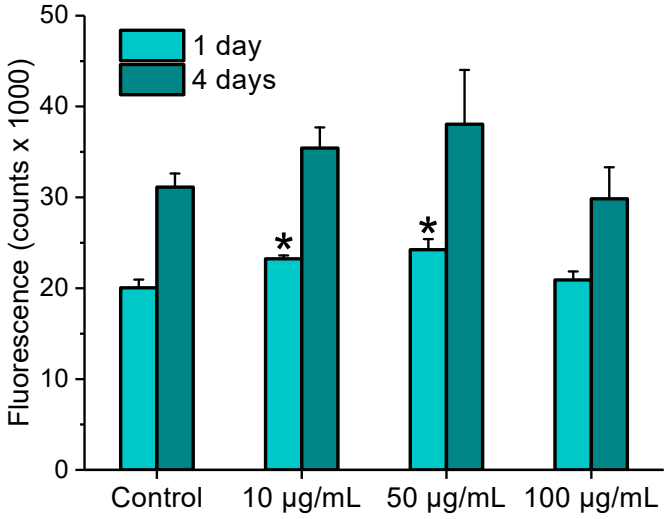


Figure S5. Viability of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells in contact with different concentrations of Fe_3O_4-DMSA nanoparticles for 2 hours and measured by Alamar Blue at 1 and 4 days of cell culture. * indicate $p < 0.05$ vs control.

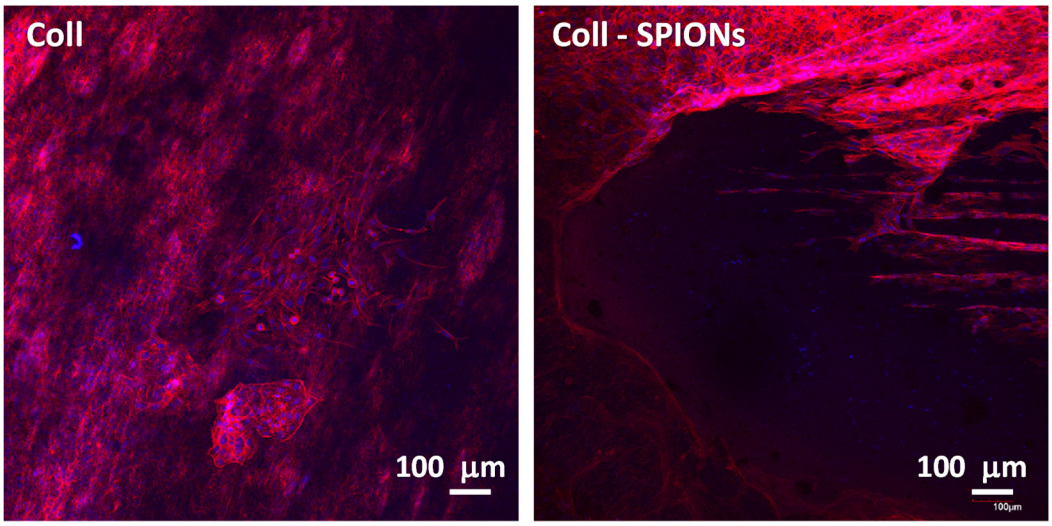


Figure S6. Representative confocal laser scanning microscopy images of MC3T3-E1 cells cultured onto 20%N_COL and 20%N_COL/2%SPIONs scaffolds for 5 days. F-actin microfilaments were stained with Atto 565-phaloidin to visualize the cytoskeleton and determine cell morphology (red fluorescence). Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence).

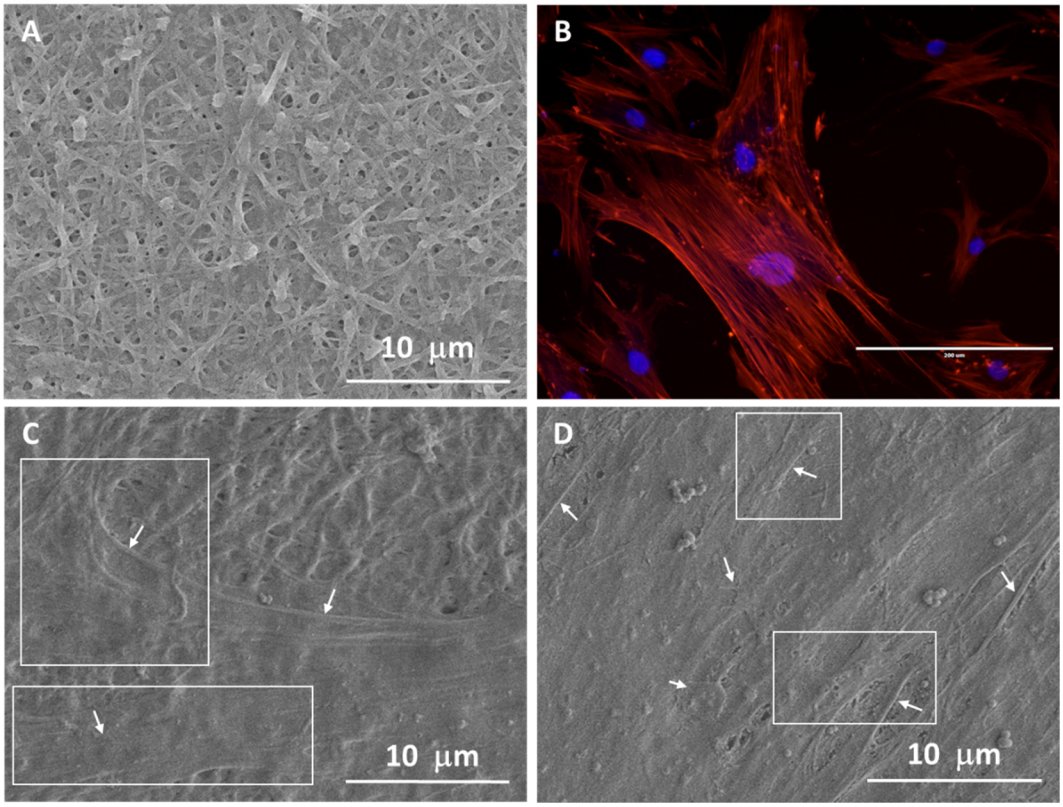


Figure S7. Image **A** is a representative SEM micrograph of the 20%N_COL/2%SPIONs material after 5 days of incubation in culture medium, without cells. **B** is a fluorescence microscopy image of hMSCs cultured in TCP for 5 days where F-actin microfilaments were stained with Atto 565-phalloidin to visualise the cytoskeleton and determine cell morphology (red fluorescence), nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence); image was taken using an EVOS FL inverted fluorescence microscope set at 20× magnification. **C** and **D** are SEM micrographs of hMSCs cultured onto 20%N_COL and 20%N_COL/2%SPIONs respectively, after 5 days of incubation. The areas highlighted in the images with arrows and boxes indicate the different projections of these cells in the form of filopodia and lamellipodia respectively. The image panel clearly shows that the cell morphology visible in the confocal image corresponds to that observed in the SEM images.

3.3. Fabricación de andamios funcionales 3D combinando el modelado por deposición fundida y la impresión por inyección de tinta de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro

3.3.1. Introducción

Las enfermedades óseas constituyen un reto clínico mundial que previsiblemente irá en aumento debido a la creciente esperanza de vida [1]. Tradicionalmente, los tratamientos más comunes para los defectos óseos se han centrado en el trasplante (autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos); sin embargo, el coste, las infecciones y el número de donantes compatibles limitan este enfoque [2]. La ingeniería de tejidos óseos (BTE) representa una alternativa a estas técnicas tradicionales y se define como un campo multidisciplinar cuyo objetivo es encontrar nuevas soluciones para la curación, reparación y regeneración del tejido óseo. Los componentes básicos son los andamios, las fuentes celulares y los estímulos bioquímicos y físicos necesarios para guiar la diferenciación celular hacia el tejido diana [2]. Un andamio se define como una estructura porosa tridimensional (3D) altamente interconectada que favorece la adhesión, el crecimiento y la función celular, proporcionando un entorno similar al de la matriz extracelular (ECM) natural [3]. Las fuentes celulares específicas deben elegirse adecuadamente en función del tejido diana, y deben proporcionarse condiciones de cultivo celular apropiadas para guiar su diferenciación y mantener su estabilidad y crecimiento [4].

El hueso es un tejido conectivo complejo que desempeña distintas funciones en el cuerpo humano, como el soporte mecánico, la protección de órganos y la producción de sangre. Dada la complejidad del tejido óseo, sigue siendo un reto desarrollar un sustituto óseo que se asemeje a las propiedades mecánicas y biológicas de la ECM del hueso nativo, así como a su funcionalidad, para promover la curación y regeneración del lugar dañado. En las últimas décadas, se ha prestado gran atención al desarrollo de tecnologías de fabricación avanzadas y a la síntesis de materiales con una resistencia y rigidez mecánicas adecuadas, y con propiedades bioactivas para promover la formación de hueso sano [5]. En la BTE, las tecnologías de fabricación aditiva (AM) se han utilizado ampliamente para fabricar andamiajes óseos debido a su mayor precisión, reproducibilidad y variabilidad en comparación con las técnicas convencionales [6,7]. Una de las tecnologías de AM más utilizadas en la fabricación de andamios óseos es el modelado por deposición fundida (FDM), en el que un polímero termoplástico se deposita automáticamente capa por capa para crear una estructura 3D a partir de un modelo digital [8]. En la literatura se ha utilizado una gran variedad de polímeros termoplásticos biodegradables para fabricar andamios óseos mediante FDM, como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), la policaprolactona (PCL) y sus mezclas [9]. Además, también se han desarrollado formulaciones compuestas que comprenden diferentes polímeros termoplásticos y una fase cerámica (por ejemplo, PLA

y fosfato de calcio) para mejorar el potencial osteogénico y las propiedades mecánicas de los andamios [10-12].

Recientemente, los biomateriales compuestos magnéticos han suscitado interés en la BTE, ya que la aplicación de campos magnéticos dinámicos demostró modular la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares, como las células madre mesenquimales de médula ósea y los preosteoblastos de calvaria de ratón (MC3T3-E1) [13]. Así, mediante la incorporación de bajas cantidades de material magnético, los andamios fabricados pueden ser dotados de una respuesta magnética y posteriormente manipulados a distancia mediante la aplicación de campos magnéticos de baja intensidad [14]. En este contexto, como ya se ha comentado a lo largo de la presente tesis doctoral, las SPIONs constituyen una potente herramienta para la regeneración ósea, es por eso que han sido ampliamente utilizadas en la fabricación de nuevos biomateriales y andamios dotados de propiedades magnéticas [15]. Bajo la acción de un campo magnético, los andamios cargados con SPIONs pueden promover eficazmente la proliferación y diferenciación de osteoblastos, así como la angiogénesis [14]. Se han investigado diferentes estrategias para sintetizar andamios magnéticos que contienen SPIONs, como la liofilización, el electrohilado, la impresión 3D y la síntesis química [14,16,17]. En los métodos de síntesis química, las SPIONs suelen integrarse en los andamios por infiltración o adsorción. Por ejemplo, Samal *et al*. [16] integraron nanopartículas magnéticas en andamios de fibroína de seda mediante el método de recubrimiento por inmersión. En otro estudio, se obtuvieron andamios de fibroína de seda decorados con SPIONs mediante polimerización por radicales libres para acelerar el proceso de respuesta osteogénica a través del efecto sinérgico de las estructuras 3D magnéticas en respuesta a campos magnéticos estáticos débiles [18]. De forma similar, se prepararon andamios magnéticos de HA sumergiendo los andamios de HA en una solución de SPIONs que permitía la infiltración de las partículas magnéticas en los poros del andamio a través de fuerzas capilares [19]. Gracias a las ventajas de la impresión 3D sobre las técnicas convencionales de fabricación de andamios, los investigadores han estado experimentando con la posibilidad de imprimir directamente mezclas de biomateriales que contengan SPIONs. Por ejemplo, Zhang *et al*. [20] imprimieron en 3D una pasta inyectable compuesta de SPIONs, vidrios bioactivos mesoporosos (MBGs) y PCL para fabricar andamios compuestos magnéticos en 3D, que mostraron propiedades multifuncionales de actividad osteogénica mejorada, administración local de fármacos contra el cáncer e hipertermia magnética. De forma similar, Das *et al*. [21] prepararon un hidrogel cargado con SPIONs para imprimir en 3D andamios destinados a promover la regeneración del tejido osteocondral mediante un actuador magnético externo. Otro ejemplo ha sido el de Shokouhimehr *et al*. [22], que imprimieron en 3D un andamio de hueso hiperplásico (HB) con SPIONs incorporadas para mejorar las propiedades bacteriostáticas de los injertos óseos para fracturas óseas grandes que no cicatrizan. Recientemente, la bioimpresión 3D de tintas cargadas de células (denominadas biotintas [23]) ha cobrado interés también en el desarrollo de andamiajes magnéticos. Se

desarrolló una biotinta compuesta por alginato, metilcelulosa y micropartículas de magnetita para fabricar andamios cargados de células que podían deformarse mediante la aplicación de un campo magnético externo, proporcionando así una estimulación mecánica a las células dentro de la construcción [24].

Asimismo, en función del enfoque empleado, el efecto osteogénico que se persigue se podría atribuir a los estímulos mecánicos (fuerzas) provocados por SPIONs en contacto directo con mecanosensores celulares y bajo la acción de un campo magnético externo [25-28]; o bien a una estimulación mecánica causada por las deformaciones y movimientos del conjunto del andamio, como consecuencia también de la aplicación de un campo magnético externo y la respuesta al mismo de las SPIONs que conforman el andamio [24,29-31]. En este último caso las SPIONs deberían estar completamente integradas en el biomaterial empleado.

Los resultados del apartado 3.1. de la presente tesis doctoral demuestran el potencial osteogénico de las SPIONs sintetizadas por descomposición térmica y funcionalizadas con un péptido RGD bajo la aplicación de un campo magnético externo cuando se administran en suspensión. Los resultados exhibieron la promoción de la diferenciación osteogénica (expresión de *ALP* y *Runx2*, y actividad ALP) de hBM-MSCs en un tiempo corto cuando el campo magnético se aplicaba 30 minutos después de la adición de las nanopartículas. Sin embargo, 24 h después de la adición, las SPIONs se encontraban en el interior celular, alejándose de los mecanosensores de la membrana celular como las integrinas o lo canales iónicos. En el trabajo de investigación del presente apartado se pretende incorporar este mismo tipo de SPIONs en la superficie de andamios poliméricos para dotarlos de propiedades magnéticas y a la vez favorecer el contacto a largo plazo entre las SPIONs y la superficie de las células. Así, en este estudio, presentamos un método novedoso para fabricar andamios magnéticos mediante la deposición de SPIONs a través de la impresión por inyección térmica de tinta por goteo a demanda (DoD) sobre andamios FDM impresos en 3D (**Figura 3.3.1.**). La bioimpresión por inyección de tinta se define como la aplicación de técnicas de inyección de tinta con materiales biológicos como biomateriales, biomoléculas y células [32]. Entre ellas, la bioimpresión por inyección térmica de tinta DoD se considera la más adecuada para manipular biomateriales debido a su rápida velocidad de impresión, alta resolución y bajo coste de los equipos [32,33]. El principio de funcionamiento se basa en un actuador térmico que calienta la tinta localmente durante varios microsegundos. Así, la tinta se vaporiza localmente y se producen burbujas que se expanden generando una fuerza motriz para expulsar la tinta a través de las boquillas [32,34,35]. En la literatura muchos estudios han reportado el uso de la bioimpresión por inyección de tinta de pequeñas moléculas, disueltas o suspendidas en solución acuosa u orgánica, para ser depositadas localmente sobre un sustrato [32,35]. En este trabajo se evaluó la posibilidad de depositar SPIONs en suspensión acuosa mediante impresión por inyección térmica de tinta DoD para fabricar andamios magnéticos combinando las

ventajas de la impresión 3D de andamios óseos y la bioimpresión por inyección de tinta de biomoléculas. En primer lugar, los andamios se imprimieron en 3D con un filamento polimérico termoplástico compuesto por ácido poli-L-láctico (PLLA)/PCL/poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) (95/5/5 % en masa), ya que su biocompatibilidad y potencial osteogénico *in vitro* se habían descrito en estudios anteriores [10,11]. En un segundo paso, se imprimió por inyección de tinta una suspensión de SPIONs sobre la superficie de los andamios para dotarlos de una propiedad funcional magnética. Se utilizaron suspensiones de SPIONs funcionalizadas con un péptido RGD y sin funcionalizar. Además, se produjeron andamios con diferentes cantidades de SPIONs (25 y 50 capas de impresión) para estudiar la precisión y la versatilidad de la técnica de producción. Asimismo, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la citocompatibilidad de las hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los nuevos andamios magnéticos desarrollados. Por último, se investigó la diferenciación osteogénica de las hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios de 25 capas de impresión tras una estimulación magnética diaria de 1 h y 1 Hz de frecuencia utilizando un biorreactor de fuerza magnética oscilante (MICA Biosystems).

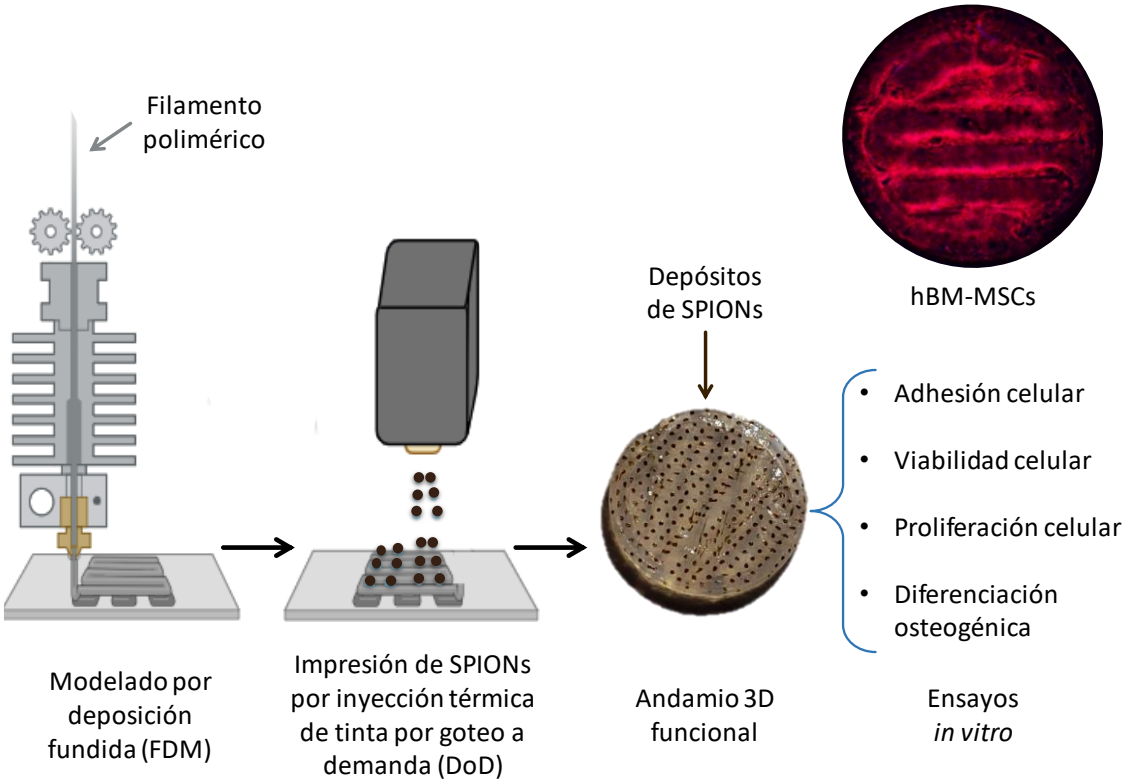


Figura 3.3.1. Representación esquemática del trabajo desarrollado en el presente aparatado (fabricación de los andamios poliméricos mediante FDM, incorporación de las SPIONs en la superficie mediante impresión por inyección térmica de tinta por goteo a demanda y ensayos *in vitro* para estudiar la funcionalidad de los mismos).

Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación liderado por el profesor Giovanni Vozzi de la Universidad de Pisa, donde se realizó la impresión de los andamios y la combinación con la impresión por inyección de tinta de las SPIONs. En la Universidad Complutense de Madrid se realizaron el resto de tareas (síntesis, funcionalización y caracterización de SPIONs, caracterización de andamios con SPIONs incorporadas, estudios de citocompatibilidad y estudios de diferenciación osteogénica).

3.3.2. Materiales y métodos

3.3.2.1. Reactivos

Oleato de sodio 82 %, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 97 %, ácido oleico 90 %, octadeceno 90 %, ácido dimercaptosuccínico 98 % (DMSA), dimetilsulfóxido ≥ 99,9 % (DMSO), membrana de celulosa de 12 kDa, péptido Arg-Gly-Asp (RGD) ≥ 97 %, clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC·HCl) ≥ 98 % y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida ≥ 98 % se compraron a Sigma-Aldrich (Madrid, España). El etanol absoluto 99,5 %, el hexano 95 % y el tolueno 99,5 % se compraron a PanReac (Barcelona, España). Todos los demás productos químicos (NaOH, HNO_3 65 %, HCl 37 %, NaCl, $MgCl_2$, etc.) eran de la mejor calidad disponible en el mercado y se utilizaron tal como se recibieron. En todos los experimentos se utilizó agua Milli-Q (resistividad 18,2 MΩ·cm a 25 °C). El filamento de mezcla de 3 polímeros, compuesto por ácido poli-L-láctico (PLLA), policaprolactona (PCL) y poli(3-hidroxibutirato-3-hidroxivalerato) (PHBV), PLLA/PCL/PHBV (90/5/5 % masa), fue proporcionado por la Universidad de Newcastle [36].

Las células, los medios de cultivo y los reactivos biológicos para los ensayos celulares *in vitro* fueron los siguientes: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hBM-MSCs) (donante 38157), medio basal de células madre mesenquimales (MSCBM), suplemento de crecimiento de células mesenquimales (MCGS), L-glutamina, sulfato de gentamicina-anfotericina (GA-1000), medio de diferenciación osteogénica para hBM-MSCs, tripsina/EDTA 0,25 % y solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) se compraron a Lonza y Gibco, Thermo Fisher Scientific (Wilmington, DE, EE.UU.). La solución de yoduro de propidio de 1,0 mg/mL en agua se compró a Life Technologies Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific). El diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) se compró a Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). El rojo de alizarina S, el cloruro de cetilpiridinio, el kit de proliferación celular WST-8, el paraformaldehído, el tritón X-100, la faloidina-Atto 565 y el dihidrocloruro de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI) se compraron a Sigma-Aldrich.

3.3.2.2. Caracterización

Los métodos analíticos utilizados para caracterizar las SPIONs sintetizadas fueron los siguientes: espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microanálisis químico, magnetometría con sensor de tipo SQUID, medidas de movilidad electroforética para calcular los valores de potencial zeta (potencial-ζ) y dispersión dinámica de la luz (DLS). Los equipos y las condiciones utilizadas se describen en la información complementaria del primer artículo mostrado en esta tesis (apartado 3.1.). La caracterización fisicoquímica de los andamios se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), ICP-AES y magnetometría con sensor tipo SQUID. Los equipos y las condiciones utilizadas se describen más adelante.

3.3.2.3. Preparación de las suspensiones de SPIONs

En este trabajo se prepararon dos suspensiones acuosas de SPIONs (SPIONs-DMSA y SPIONs-DMSA-RGD). Las nanopartículas de óxido de hierro de partida se sintetizaron por el método de descomposición térmica siguiendo un procedimiento descrito previamente [37]. En primer lugar, se sintetizó oleato de hierro(III) a partir de oleato sódico y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. A continuación, las nanopartículas se obtuvieron mezclando oleato de hierro(III) (como precursor que contiene hierro), ácido oleico (como estabilizante) y octadeceno (como disolvente) y sometiendo la mezcla a 315 °C en atmósfera inerte. El producto resultante se lavó con etanol varias veces y se suspendió en tolueno. A continuación, las SPIONs sintetizados se transfirieron a un medio acuoso por intercambio de ligando, agitando durante 3 días una mezcla de DMSA disuelto en DMSO y la suspensión de SPIONs en tolueno. Después, se recuperaron las nanopartículas recubiertas de DMSA y se lavaron con etanol. A continuación, se suspendieron en agua destilada, se ajustó el pH a 10 y se dializaron con agua destilada. Finalmente, el pH se ajustó a 7. La suspensión acuosa coloidal de SPIONs recubiertas de DMSA obtenida se denominó SPIONs-DMSA. Posteriormente, el péptido RGD se unió covalentemente a los grupos carboxilo presentes en el recubrimiento de DMSA de las SPIONs mediante química EDC/sulfoNHS siguiendo el procedimiento descrito recientemente [38]. La suspensión resultante se denominó SPIONs-DMSA-RGD. La metodología detallada se puede encontrar en el artículo y la información complementaria del apartado 3.1. de esta tesis.

3.3.2.4. Plataforma de bioimpresión

Los andamios se fabricaron en 3D con una novedosa plataforma de bioimpresión caracterizada por una alta precisión y repetibilidad en el posicionamiento, dotada de múltiples cabezales para bioimpresión multimaterial y multiescala y controlada mediante LinuxCNC, un software de código abierto para el control de máquinas CNC [39-41]. Los andamios se fabricaron utilizando dos módulos: (i) un cabezal de modelado por

deposición fundida (FDM), para la impresión 3D de andamios con un filamento de una mezcla termoplástica, y (ii) un cartucho térmico de inyección de tinta de goteo a demanda (DoD), para la deposición precisa y local de soluciones de tinta de baja viscosidad cargadas con SPIONs sobre la superficie del andamio (**Figura 3.3.2.**). El módulo FDM se compone de un cabezal de impresión 3D (Revo™ Hemera, E3D) y una cama calefactada, mientras que el cabezal de inyección de tinta se compone de un cartucho caracterizado por 12 boquillas y 96 puntos por pulgada (DPI) de resolución (modelo C6602A de HP), con un volumen de gota de tinta expulsada de 160 pL. Las temperaturas del cabezal de impresión y de la cama calefactada se controlan mediante un bucle PID a través de una placa Arduino UNO y dos termistores diferentes. Por otro lado, las boquillas de inyección de tinta se controlan a través de una placa Arduino Nano para enviar los pulsos eléctricos para disparar las boquillas específicas. Para controlar los dos módulos diferentes (es decir, el de FDM y el de inyección de tinta DoD) juntos, se realizaron actualizaciones específicas en el software de control de la impresora. En concreto, se crearon tres nuevos comandos M de usuario [40] para controlar automáticamente el módulo FDM (es decir, el comando de ajuste del cabezal de impresión y de la temperatura de la cama) y el de inyección de tinta (es decir, el comando de chorro) a través del lenguaje de programación *G-Code*.

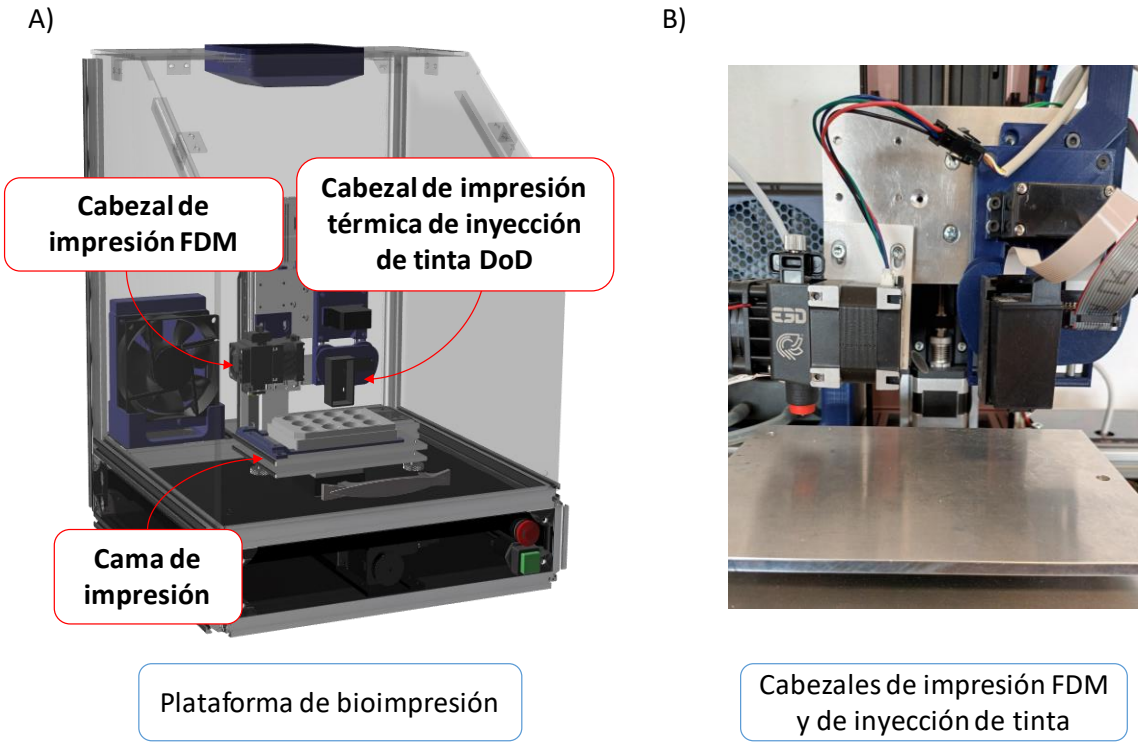


Figura 3.3.2. Nueva plataforma de bioimpresión: A) representación de la plataforma desarrollada, y B) imagen de las herramientas de bioimpresión (cabezales de impresión FDM y de inyección de tinta).

3.3.2.5. Diseño y fabricación de los andamios

3.3.2.5.1. Diseño e impresión 3D

Se diseñaron andamios cilíndricos en *Fusion360®* (Autodesk Inc) con un diámetro de 5 mm y una altura de 0,6 mm para facilitar su colocación dentro de los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos para los ensayos *in vitro*. El diseño se exportó como archivo *.STL* y se cortó en capas horizontales en *Slic3r* con una altura de capa de 0,2 mm, un perímetro externo y un relleno rectangular al 100 %, con líneas alternas de 90 grados para cada capa. Se añadió un faldón exterior alrededor del andamio para limpiar la boquilla del exceso de material entre una sesión de impresión y otra.

Los andamios se imprimieron en 3D con un filamento de mezcla de 3 polímeros compuesto por PLLA/PCL/PHBV (90/5/5 % masa). La biocompatibilidad y el potencial osteogénico *in vitro* de esta mezcla polimérica ya se han descrito anteriormente [10,11]. La mezcla polimérica se preparó siguiendo un protocolo establecido [36,11], presentando un diámetro de filamento de 1,75 ± 0,2 mm. El cabezal de la herramienta FDM estaba equipado con una boquilla de latón de 0,4 mm (Revo™ Nozzles, E3D). Los parámetros de impresión (por ejemplo, velocidad de impresión, boquilla y temperatura de la cama) se optimizaron específicamente para imprimir el filamento de la mezcla polimérica con la plataforma de bioimpresión mediante pruebas de impresión preliminares, partiendo de la información de un estudio anterior (**Tabla 3.3.1.**) [10]. Para acelerar el proceso, se imprimieron 20 andamios a la vez sobre un portaobjetos de vidrio (**Figura 3.3.3.A**). Tras la impresión 3D, se midió el diámetro y la altura de cada andamio con un calibre digital para evaluar la precisión de la impresión.

Tabla 3.3.1. Principales parámetros de impresión de los andamios cilíndricos 3D con la nueva plataforma de bioimpresión.

Temperatura de extrusión (°C)	Temperatura de la cama (°C)	Velocidad de impresión (mm/s)	Altura de las capas (mm)	Relleno (-)
190	40	10	0.2	100 %

3.3.2.5.2. Impresión de SPIONs por inyección térmica de tinta por goteo a demanda

Se utilizó el módulo de impresión por inyección térmica de tinta DoD para depositar gotitas cargadas de SPIONs sobre la superficie exterior del andamio impreso con FDM. Se ensayaron dos suspensiones acuosas diferentes cargadas con SPIONs: (i) suspensión coloidal de SPIONs recubiertas de DMSA (SPIONs-DMSA) y (ii) suspensión

coloidal de SPIONs funcionalizadas con un péptido RGD (SPIONs-DMSA-RGD), ambas a una concentración de 4 mg/mL de Fe_3O_4.

Antes de la impresión por inyección de tinta de las suspensiones de SPIONs, los cartuchos térmicos de inyección de tinta DoD se lavaron a fondo con agua destilada para eliminar cualquier presencia de tinta anterior del depósito y las boquillas. A continuación, se llenó la cámara de tinta del cartucho con 150 µL de suspensión de SPIONs y se montó en el cabezal correspondiente de la impresora.

El patrón 2D de la tinta se diseñó como un círculo de 6 mm de diámetro para cubrir completamente la superficie exterior del andamio (de 5 mm de diámetro). La resolución del patrón fue de 96x96 DPI como la del cartucho de inyección de tinta. El patrón se exportó como imagen binaria en escala de grises (formato *.bmp*) para cortarlo con un software previamente desarrollado para el procesamiento de imágenes de inyección de tinta [41]. Específicamente, la imagen *.bmp* se corta de izquierda a derecha en un patrón de zigzag y luego se convierte en un archivo 2D de *G-Code* con el comando M específico para enviar el pulso de disparo a las boquillas específicas de acuerdo con la imagen cortada.

Los parámetros de impresión se optimizaron mediante pruebas preliminares, así como con los resultados obtenidos en estudios anteriores. Se definieron valores de distancia específicos a lo largo de los ejes X e Y de la placa de impresión para que los puntos se distribuyeran por igual en el plano sin solaparse. Los puntos se depositaron en cada andamio a una distancia entre el cartucho y la superficie del andamio de 5 mm, y con una velocidad de impresión de 2 mm/s para evitar la formación de gotas satélite. Cada boquilla se activó enviando una señal de pulso que tenía una onda cuadrada caracterizada por un pico a 19 V durante 5 µs (T_{on}), un retardo de 800 µs (T_{off}) entre dos pulsos consecutivos en una boquilla dada, y un retardo de 0,5 µs antes de disparar una boquilla diferente (**Tabla 3.3.2.**). El patrón 2D se inyectó repetidamente sobre la misma superficie exterior del andamio 25 y 50 veces, para cada una de las dos suspensiones diferentes de SPIONs, dando un total de 60 andamios por condición (**Figura 3.3.3.B**).

Tabla 3.3.2. Principales parámetros utilizados en la impresión de suspensiones de SPIONs mediante inyección térmica de tinta por goteo a demanda sobre la superficie exterior de los andamios impresos en 3D.

Tensión del pulso (V)	Periodo de aplicación del pulso (µs)	Periodo de retardo (µs)	Distancia Z (mm)	Velocidad de impresión (mm/s)
19	5	800	5	2

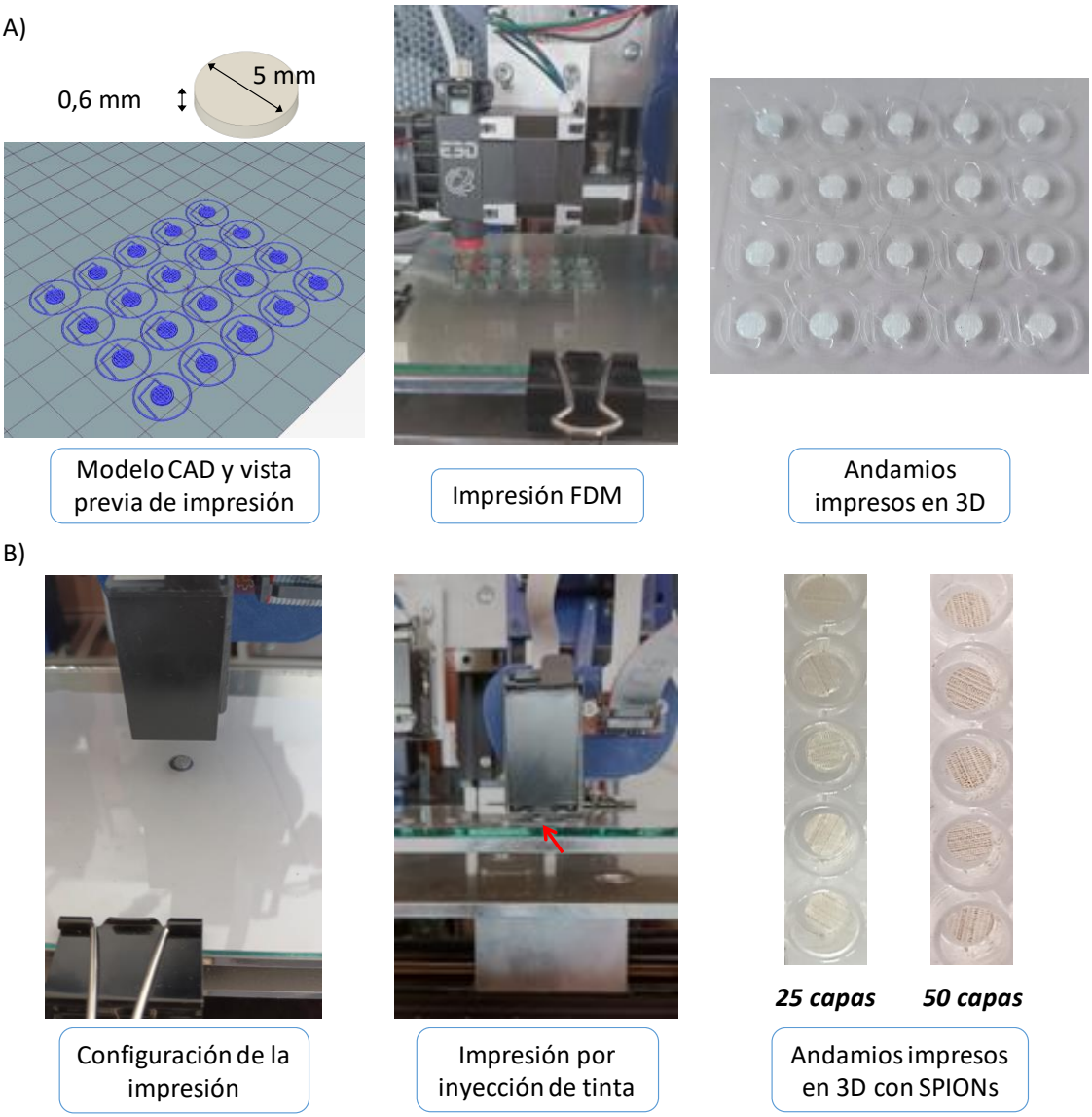


Figura 3.3.3. A) Impresión FDM de andamios cilíndricos: modelo CAD y vista previa de impresión, impresión FDM con el filamento de mezcla polimérica y andamios impresos en 3D. B) Impresión por inyección de tinta de SPIONs sobre la superficie exterior del andamio: configuración de la impresión, deposición de SPIONs sobre la superficie exterior del andamio (señalada por la flecha roja), y andamios impresos en 3D con 25 capas y 50 capas de SPIONs depositadas sobre la superficie.

3.3.2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El SEM se utilizó para explorar las características morfológicas y el aspecto superficial de los andamios, así como para medir el tamaño de los depósitos de SPIONs. Para el análisis, los andamios se montaron en soportes de SEM y se recubrieron con carbono a vacío mediante pulverización catódica. Las imágenes se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 7600F a un voltaje de aceleración de 15 kV

y diferentes aumentos. Además, se obtuvieron imágenes utilizando electrones retrodispersados (BSE).

3.3.2.7. Cuantificación del contenido inicial de Fe y ensayo de estabilidad

Para evaluar el contenido inicial de Fe de los andamios, las muestras se digirieron primero en HNO_3/HCl (1:3) y luego se diluyeron con agua Milli-Q. A continuación, se cuantificó la concentración de Fe mediante ICP-AES. La estabilidad de las muestras se estudió en PBS 1× (pH 7,4) a 37 °C durante 7 días, tras lo cual se recuperaron los andamios y se midió el contenido de Fe como se ha indicado anteriormente.

3.3.2.8. Propiedades magnéticas

Para medir las propiedades magnéticas de los andamios se utilizó un magnetómetro con un sensor de tipo SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*, MPMS-XL tipo SQUID). Las muestras se pesaron con precisión y se colocaron en el portamuestras. Los bucles de histéresis se midieron a 24,8 °C hasta 5 T.

3.3.2.9. Ensayos celulares *in vitro*

Antes de los ensayos celulares, los andamios utilizados se enjuagaron rápidamente con agua Milli-Q, se esterilizaron en una solución de etanol al 70 % y se colocaron en placas de 96 pocillos. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana (hBM-MSCs) (Lonza, donante 38157, pase 5) se cultivaron en medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCBM suplementado con MCGS, GA-1000 y L-glutamina). Las células se lavaron con PBS y luego se tripsinizaron con 3 mL de tripsina/EDTA al 0,25 %. A continuación, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. El precipitado resultante se suspendió en 1 mL de medio de cultivo, se midió el número de células y se sembró en la superficie de los andamios la densidad celular adecuada para cada ensayo diferente. Se utilizó un volumen de siembra de 20 µL para conseguir una gota en la superficie del andamio y, por tanto, la adhesión celular a la superficie del andamio; 2 h después, se llenaron los pocillos con 200 µL de medio de cultivo. Las células se incubaron a 37 °C en un 5 % de CO_2 durante 24 h para permitir la adhesión celular. Los controles fueron células cultivadas a la misma densidad celular en la superficie de andamios poliméricos similares, pero sin SPIONs en la superficie.

3.3.2.9.1. Ensayos de citocompatibilidad

Los ensayos de citocompatibilidad se llevaron a cabo con medio de crecimiento de células madre mesenquimales y la densidad celular utilizada para la siembra fue de 4 × 10^4 células/andamio. Las células se cultivaron durante 14 días en la superficie de los andamios para evaluar su citocompatibilidad. Los días 7 y 14 se evaluaron la proliferación y la adhesión celular. La viabilidad celular y el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluaron el día 14 mediante citometría de flujo.

Las células destinadas a ensayos analizados por citometría de flujo se lavaron con PBS 1×, se recogieron con tripsina/EDTA al 0,25 % y se procesaron para su análisis.

Proliferación celular. La proliferación se midió utilizando el kit de proliferación celular WST-8 mediante la obtención de valores de absorbancia a 450 nm (ensayo colorimétrico). El kit de proliferación celular WST-8 se utiliza para determinar el número de células viables y estudiar la inducción o inhibición de la proliferación celular *in vitro*. Este kit de ensayo se basa en la reducción celular de la sal de tetrazolio WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) en un colorante formazán altamente soluble en agua y de color naranja.

Viabilidad celular. La viabilidad celular se midió añadiendo a las muestras 0,005 % (m/v) de yoduro de propidio (PI) en PBS para teñir el ADN de las células muertas. La exclusión del PI indica la integridad de la membrana plasmática y la viabilidad celular, ya que las células con daños en la membrana plasmática incorporan la sonda y el PI se intercala con su ADN. La fluorescencia del PI se excitó a 488 nm, y la fluorescencia emitida se registró con un filtro 585/42 en un citómetro de flujo FACScalibur Becton Dickinson.

Contenido intracelular de ROS. Las células se incubaron con H_2DCFDA 10 µM durante 45 min a 37 °C. El H_2DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) tras la hidrólisis por esterasas celulares y la oxidación por ROS. Cuando el DCF se excita a longitudes de onda de emisión de 488 nm, se emite fluorescencia verde que puede detectarse a 525 nm. La fluorescencia DCF se midió en un citómetro de flujo FACScalibur Becton Dickinson con un filtro 530/30, excitando la muestra a 488 nm.

Microscopía confocal de fluorescencia. La adhesión, colonización y morfología de las células en los andamios se estudiaron mediante microscopía de fluorescencia tras 7 y 14 días de cultivo. Para la microscopía confocal, las células adheridas a los andamios se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (m/v) en PBS con sacarosa al 1 % (m/v) a 37 °C durante 20 min, se lavaron de nuevo con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % a 4 °C durante 5 min. A continuación, las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min con faloidina-Atto 565 (dilución 1:40), que tiñe los filamentos de actina. Tras lavar con PBS, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI durante 5 min. La microscopía confocal se analizó con un microscopio confocal láser OLYMPUS FV1200 (OLYMPUS, Tokio, Japón). Las imágenes se obtuvieron utilizando el software Imaris 3D para proyectar una única imagen 2D convertida a un archivo TIF a partir de las múltiples secciones del eje Z. Las tinciones con DAPI y faloidina-Atto 565 se mostraron en azul y rojo, respectivamente.

3.3.2.9.2. Ensayos de diferenciación osteogénica

Los ensayos de diferenciación osteogénica se realizaron con un medio de diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales y la densidad celular utilizada para la siembra fue de 6×10^4 células/pocillo. 24 h después de la siembra, las placas de cultivo se sometieron a estimulación magnética diaria durante 1 h y 1 Hz de frecuencia utilizando un biorreactor de fuerza magnética oscilante (MICA Biosystems). La estimulación magnética se aplicó durante 14 días y los marcadores de diferenciación osteogénica se evaluaron en los días 7 y 14. Las placas se evaluaron con las mismas condiciones de estudio, pero sin aplicar el estímulo magnético como control.

Expresión génica por PCR. El RNA celular total se aisló mediante un procedimiento estándar (Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y la síntesis de cDNA se realizó utilizando un kit de RNA a cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, EE.UU.). Los niveles de expresión de *ALP* y *Runx2* se determinaron mediante qRT-PCR utilizando las sondas Taqman Hs01029144_m1 y Hs01047973_m1 (sondas TaqMan® MGB marcadas con colorante FAM™, Applied Biosystems). Para la cuantificación de la expresión génica, los valores de los genes diana se normalizaron con respecto a la expresión de la referencia endógena *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, Hs02786624_g1). Para calcular la expresión relativa se utilizó el método del ciclo umbral comparativo (Ct). Para la cuantificación de la expresión génica, el valor del gen diana se normalizó con respecto a la expresión de la referencia endógena. La expresión del gen diana, normalizada con respecto a la referencia endógena y relativa al control viene dada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cuantificación relativa, RQ). ($\Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{referencia endógena}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condición de estudio}} - \Delta Ct_{\text{control}}$) [42].

Actividad enzimática ALP. La actividad ALP se utilizó como marcador clave de diferenciación para evaluar la expresión del fenotipo osteoblástico. Las células se lisaron mediante tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación. Los lisados se incubaron con una solución de p-nitrofenilfosfato 10 mM y, a continuación, se detuvieron las reacciones añadiendo NaOH 2 M. La actividad ALP se midió espectrofotométricamente, mediante el aumento de la absorbancia a 405 nm que acompaña a la producción de p-nitrofenol y se normalizó por el contenido de proteína celular total, que se midió mediante un kit de determinación cuantitativa de proteínas totales.

Mineralización. La mineralización de la matriz se analizó mediante tinción con rojo de alizarina S. Las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con etanol al 70 % durante 1 h a 4 °C y se tiñeron con rojo de alizarina S 40 mM durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron a fondo con H_2O destilada para eliminar la tinción no específica. Por último, para cuantificar la mineralización de la matriz, las

muestras teñidas se eluyeron con cloruro de cetilpiridinio (10 % m/v) en PBS 10 mM pH 7 y se midió la absorbancia a 620 nm.

3.3.3. Resultados y discusión

3.3.3.1. Preparación de las suspensiones de SPIONs

Las SPIONs se prepararon aprovechando el método de descomposición térmica del oleato de hierro(III) como precursor que contiene hierro [37]. Tras la síntesis, se llevó a cabo la caracterización estructural de las nanopartículas estabilizadas con ácido oleico (SPIONs-OA). El patrón XRD mostró múltiples picos consistentes con la estructura de espinela inversa de la magnetita [43], el análisis TEM confirmó un tamaño uniforme de las nanopartículas, con dimensiones de unos 11 nm. Las nanopartículas se procesaron posteriormente aprovechando un intercambio de ligando de la capa superficial de ácido oleico con DMSA para obtener una suspensión estable de nanopartículas en agua (SPIONs-DMSA) [17,37]. El espectro FTIR confirmó el éxito del intercambio del ligando. A continuación, las nanopartículas SPIONs-DMSA se funcionalizaron covalentemente con un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) mediante enlaces amida para obtener la suspensión SPIONs-DMSA-RGD. Para ello, los grupos de ácido carboxílico presentes en el recubrimiento de DMSA de las SPIONs se activaron mediante química EDC/sulfoNHS y reaccionaron con la amina primaria de la secuencia RGD. La funcionalización se verificó mediante FTIR, DLS y microanálisis químico [38]. Las curvas de magnetización de las SPIONs sintetizadas mostraron ausencia de bucle de histéresis, confirmando así su comportamiento superparamagnético. Todas las figuras que respaldan estos resultados se pueden consultar en el artículo y la información complementaria del apartado 3.1. de esta tesis.

3.3.3.2. Diseño y fabricación de los andamios

La combinación de la impresión FDM y la inyección térmica de tinta DoD de SPIONs se consiguió gracias a la plataforma de bioimpresión calibrada y precisa. Los andamios se imprimieron en 3D con un filamento de mezcla de 3 polímeros compuesto de PLLA/PCL/PHBV (90/5/5 % respectivamente). La biocompatibilidad y el potencial osteogénico *in vitro* de esta mezcla de polímeros ya se habían descrito anteriormente [10,11]. El diámetro y la altura de cada uno de los andamios impresos (n = 300) se midieron manualmente con un calibre digital, obteniéndose un diámetro y una altura medios de, respectivamente, 4,98 mm y 0,63 mm y, por tanto, un error absoluto del 0,4 % y el 5 % (**Figura 3.3.4.**). La precisión (calculada como la desviación estándar de la diferencia entre el diámetro/altura correctos, 5 mm/0,6 mm), fue de ± 60 µm en diámetro y ± 20 µm en altura. Globalmente, puede afirmarse que la precisión de los andamios impresos en 3D fue de ± 40 µm mientras que, a título comparativo, las impresoras FDM comerciales tienen una resolución de ± 100 µm [44].

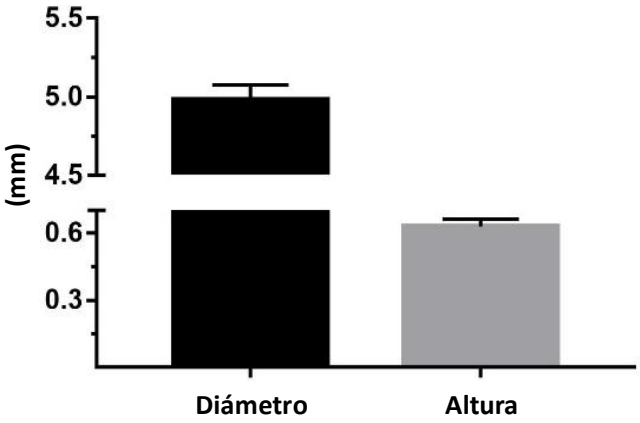


Figura 3.3.4. Evaluación de la precisión de impresión FDM de los andamios impresos en 3D con el filamento de mezcla polimérica.

Se probaron dos dispersiones diferentes de SPIONs para la impresión térmica por inyección de tinta DoD: (i) suspensión coloidal de SPIONs recubiertas de DMSA (SPIONs-DMSA) y (ii) suspensión coloidal de SPIONs funcionalizadas con un péptido RGD (SPIONs-DMSA-RGD). El patrón 2D se inyectó repetidamente con las suspensiones sobre la misma superficie exterior del andamio 25 y 50 veces, para cada una de las dos suspensiones diferentes de SPIONs. A partir de ahora, los andamios poliméricos sin nanopartículas se denominarán SC, los andamios con 25 capas de SPIONs-DMSA se denominarán DMSA 25L, los andamios con 25 capas de SPIONs-DMSA-RGD se denominarán RGD 25L, los andamios con 50 capas de SPIONs-DMSA se denominarán DMSA 50L y los andamios con 50 capas de SPIONs-DMSA-RGD se denominarán RGD 50L.

3.3.3.3. Caracterización de los andamios fabricados

La morfología de los andamios impresos se evaluó mediante SEM (**Figura 3.3.5.A-E**). Las imágenes mostraron una superficie generalmente lisa del material con zonas de mayor rugosidad en el borde entre una línea de impresión y otra. A bajo aumento (**Figura 3.3.5.B-E**), se puede observar la consecución del patrón de inyección de tinta previsto. A mayor aumento (**Figura 3.3.5.G-J**), en las imágenes BSE pueden observarse depósitos de SPIONs de aproximadamente 100 µm de diámetro, que se distribuyen ordenadamente por toda la superficie. Las imágenes BSE revelan la diferencia de composición en una muestra (diferencia en el número atómico medio). Así, una intensidad de BSE "más brillante" se correlaciona con un número atómico medio más alto en la muestra, y las zonas "oscuras" tienen un número atómico medio más bajo. En este caso es fácil atribuir las zonas de mayor brillo en las imágenes a depósitos de SPIONs debido a la diferencia entre el número atómico del hierro y del carbono.

La **Figura 3.3.5.K** muestra la cantidad de hierro en la superficie de los andamios tras su producción (inicial), y la cantidad de hierro restante en los andamios después de 7 días en medio fisiológico, medida por ICP-AES. Los resultados obtenidos para DMSA 25L y RGD 25L fueron de 2,32 y 2,25 µg de hierro, respectivamente. Las cantidades resultantes para DMSA 50L y RGD 50L fueron de 4,45 y 4,54 µg, respectivamente. La cantidad de SPIONs depositadas se duplicó al duplicar el número de capas de impresión, lo que indica una gran precisión en la técnica de producción y versatilidad para producir nuevos materiales con diferentes cantidades de SPIONs. Además, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de SPIONs depositadas entre las suspensiones SPIONs-DMSA y SPIONs-DMSA-RGD para el mismo número de capas. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de hierro en la superficie de los andamios tras 7 días en PBS 1× a 37 °C con respecto al contenido inicial, lo que indica que los depósitos de SPIONs son muy estables tras el remojo y permanecen en la superficie.

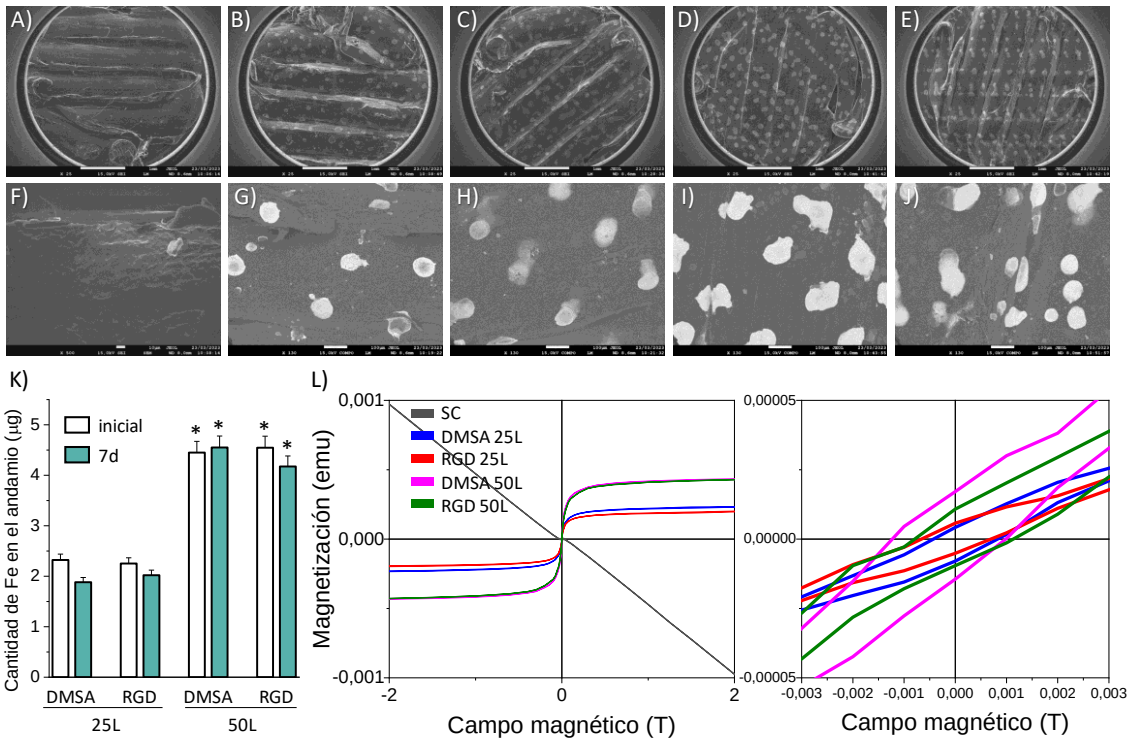


Figura 3.3.5. Imágenes de SEM de SC (A y F), DMSA 25L (B y G), RGD 25L (C y H), DMSA 50L (D e I) y RGD 50L (E y J) mostrando sus superficies. Imágenes a bajo aumento (desde A hasta E). Imágenes de BSE a mayor aumento (desde F hasta J). Estabilidad de los diferentes andamios con SPIONs (K) mostrando la cantidad inicial de Fe y la cantidad de Fe restante en los andamios después de 7 días en PBS 1× a 37 °C. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 25L (valor $p < 0,05$). Curvas de magnetización de los distintos andamios (L izquierda). A la derecha se muestra la ampliación de las curvas a campos bajos (L derecha).

La evaluación de las propiedades magnéticas de los materiales mostró un comportamiento diamagnético (pendiente negativa) del andamio control (SC, andamio sin SPIONs), por lo que inicialmente en las curvas de magnetización de los andamios con SPIONs se observaron dos componentes, uno diamagnético atribuido al andamio polimérico y otro superparamagnético atribuido a las SPIONs. Las curvas de magnetización de los andamios DMSA 25L, RGD 25L, DMSA 50L y RGD 50L (**Figura 3.3.5.L**) se trazaron tras la corrección del componente diamagnético. Las curvas correspondientes a los andamios con 50 capas de SPIONs mostraron un valor de magnetización de saturación doble que el observado en las curvas correspondientes a los andamios con 25 capas de SPIONs. Este aumento se debe a la cantidad de SPIONs presentes en el andamio, en consonancia con el resultado de ICP-AES (**Figura 3.3.5.K**) donde se observa aproximadamente el doble de hierro en los andamios con 50 capas de impresión. Con respecto al tipo de SPIONs incorporadas (SPIONs-DMSA o SPIONs-DMSA-RGD), no se detectan grandes diferencias. Cuando los andamios tienen 50 capas impresas las curvas son similares (DMSA 50L y RGD 50L), y cuando tienen 25 capas impresas, la magnetización de DMSA 25L es ligeramente superior a la de RGD 25L, lo que podría deberse a una ligera diferencia en la cantidad de SPIONs entre las muestras, pero aun así los valores son muy similares. Además, las curvas de magnetización en ambos casos, SPIONs solas e incorporadas en los andamios, mostraron una forma y coercitividad similares. Como se muestra en los gráficos, en ambos casos se registraron valores de coercitividad inferiores a 3 mT, lo que para la mayoría de las aplicaciones biomédicas de las SPIONs puede considerarse como una respuesta no histerética, es decir, coercitividad y remanencia cercanas a cero; confirmando su comportamiento superparamagnético (ver **Figura 3.3.5.L** derecha y recuadros de la **Figura 3.3.6.**). Finalmente, los valores máximos de magnetización normalizados al contenido en Fe calculados para las SPIONs solas (**Figura 3.3.6.A**) y los andamios con SPIONs (**Figura 3.3.6.B**) fueron consistentes, obteniéndose un valor alrededor de 90 emu/g_{Fe} en todos los casos. Por tanto, la similitud entre los diferentes ciclos sugiere que las propiedades magnéticas de las SPIONs no se vieron afectadas por su incorporación en la superficie de los andamiajes poliméricos.

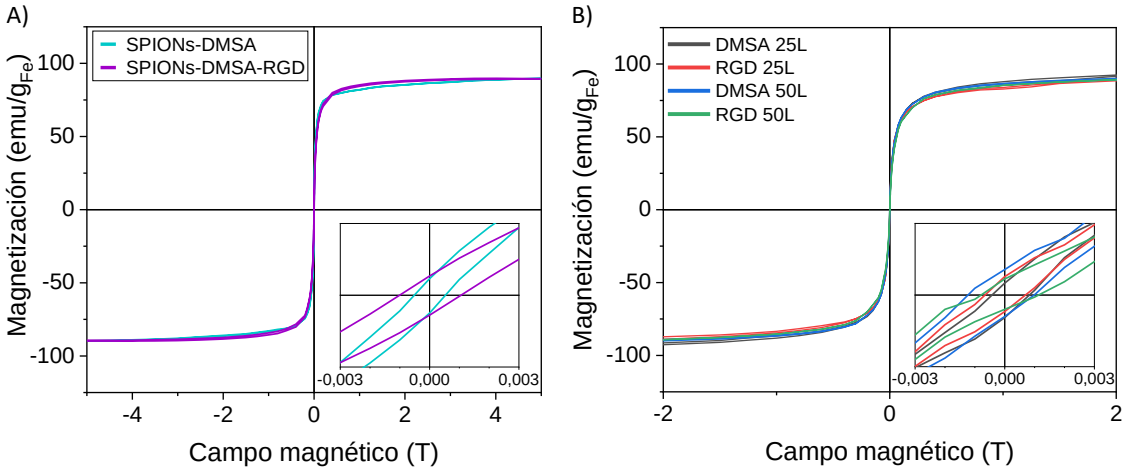


Figura 3.3.6. Curvas de magnetización de las muestras SPIONs-DMSA y SPIONs-DMSA-RGD (A) y de los andamios con SPIONs en la superficie (B) normalizadas a la masa de hierro. La ampliación de las curvas de magnetización cerca del origen se muestra como recuadro.

3.3.3.4. Citocompatibilidad

La adhesión, viabilidad y proliferación celular son parámetros biológicos importantes para evaluar la biocompatibilidad o citotoxicidad de cualquier biomaterial. La adhesión celular a los biomateriales es crucial para que se produzcan los procesos celulares posteriores. La proliferación celular, el proceso por el que una célula crece y se divide en dos células hijas, refleja la capacidad de crecimiento de las células en contacto con los materiales que se van a probar. La viabilidad celular es un parámetro relacionado con la integridad de la membrana celular. Así pues, una adhesión celular adecuada acompañada del mantenimiento de la viabilidad celular y que permita la proliferación celular es un resultado deseado para validar un biomaterial con potencial para la regeneración tisular. La proliferación de hBM-MSCs en contacto con la superficie de los andamios se estudió a los 7 y 14 días (**Figura 3.3.7.A**). Los resultados a los 7 días de cultivo mostraron una mayor proliferación celular en el andamio control (andamio sin SPIONs, denominado SC) en comparación con los andamios con SPIONs en la superficie. Sin embargo, a los 14 días, no se observaron diferencias en la proliferación celular entre el andamio control y los andamios con SPIONs. Estos resultados indican una mayor tasa de proliferación desde los 7 hasta los 14 días para todos los andamios con SPIONs en comparación con el control. En cuanto a la viabilidad de las hBM-MSCs (**Figura 3.3.7.B**), los resultados indicaron porcentajes de viabilidad muy elevados en todos los casos estudiados (SC, DMSA 25L, RGD 25L, DMSA 50L y RGD 50L), sin diferencias significativas entre ellos (viabilidad ≥ 95 %).

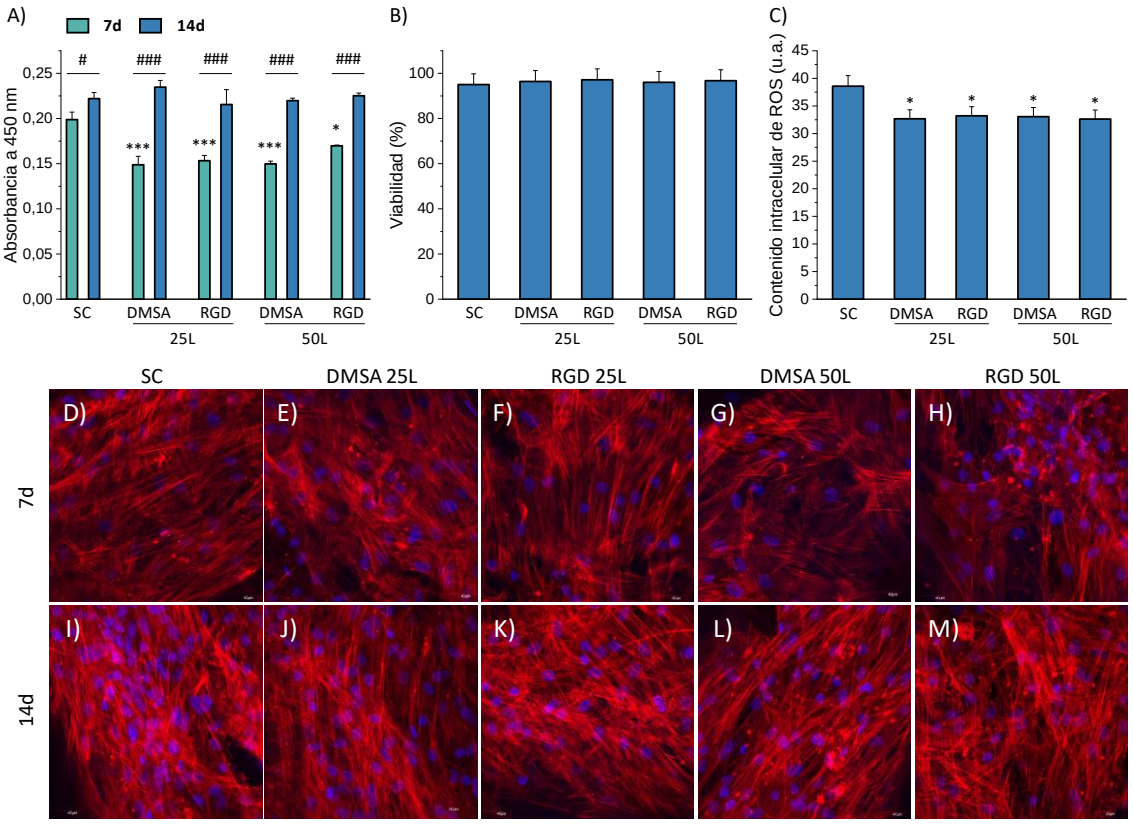


Figura 3.3.7. Proliferación a los 7 y 14 días (A), viabilidad a los 14 días (B) y contenido intracelular de ROS a los 14 días (C) de hBM-MSCs cultivadas en SC, DMSA 25L, RGD 25L, DMSA 50L y RGD 50L. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a SC (* valor p < 0,05 *** valor p < 0,005). Las almohadillas indican diferencias significativas con respecto a 7d (# valor p < 0,05 ### valor p < 0,005). Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de hBM-MSCs cultivadas en los diferentes andamios a los 7 y 14 días (D-M). En rojo pueden verse los filamentos de actina del citoesqueleto marcados con faloidina y en azul los núcleos marcados con DAPI.

Varios estudios han propuesto el estrés oxidativo como un mecanismo clave implicado en la toxicidad de los nanomateriales [45,46]. La sobreproducción de ROS conduce a múltiples efectos biológicos adversos como la peroxidación lipídica de la membrana, la desnaturalización de proteínas, la disfunción mitocondrial, la fuga de lactato deshidrogenasa y el daño del ADN y el ARN, limitando la capacidad celular para mantener las funciones fisiológicas normales reguladas por redox [47]. A su vez, varios estudios han resaltado la importancia de medir la producción celular de ROS en respuesta a las superficies de los biomateriales para evaluar su biocompatibilidad [48-50]. Para estudiar el posible estrés oxidativo en las hBM-MSCs tras la interacción con la superficie de los andamios, se evaluó el contenido intracelular de ROS tras 14 días de cultivo (**Figura 3.3.7.C**). Se observó una disminución del contenido intracelular de ROS en las células cultivadas en la superficie de los andamios con depósitos de SPIONs en

comparación con el andamio control. Estos resultados concuerdan con otros estudios que analizan el efecto de las SPIONs sobre las hBM-MSCs [38,51], en los que el contacto con las SPIONs también disminuye el contenido intracelular de ROS.

La adhesión, colonización y morfología celular de las hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios se evaluaron mediante microscopía confocal de fluorescencia de barrido láser (**Figura 3.3.7.D-M**). Se escanearon diferentes partes de los andamios tras 7 y 14 días de cultivo, utilizando faloidina-Atto 565 como sonda de fluorescencia para los microfilamentos de F-actina y DAPI para los núcleos. Las imágenes mostraron que las hBM-MSCs presentaban su típica morfología fusiforme, se adherían perfectamente a la superficie de los andamios y colonizaban toda la superficie sin dejar huecos. No se observaron diferencias entre los andamios con SPIONs y el andamio control, ni entre el tipo de SPIONs (DMSA o RGD) depositados, ni en el número de capas de impresión (25L o 50L). Además, se aprecia un mayor número de células en las imágenes de 14 días en comparación con las de 7 días, lo que concuerda con los resultados de proliferación celular. Los resultados mostraron una colonización completa formando un entramado celular adecuado independientemente de la presencia de SPIONs.

En conjunto, los adecuados resultados de citocompatibilidad de este trabajo en términos de viabilidad, proliferación y adhesión celular concuerdan con los resultados proporcionados por los autores de diferentes estudios con otros tipos de andamios que también incorporan SPIONs en su composición [15,52,53].

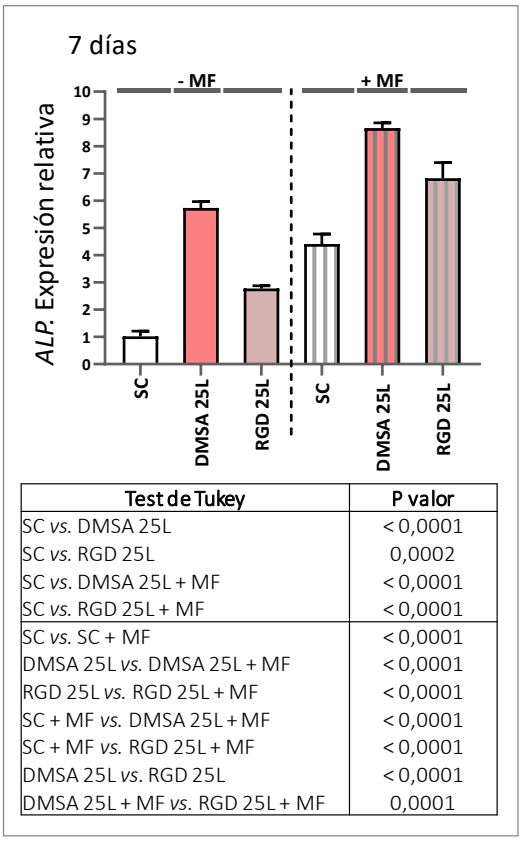
3.3.3.5. Efecto osteogénico

La glicoproteína ALP de la superficie celular hidroliza el inhibidor de la mineralización pirofosfato a fosfato, lo que promueve la deposición mineral en las fibras de colágeno de la matriz extracelular [54-58]. Dado que la ALP potencia la mineralización de la matriz extracelular, la cuantificación de la ALP tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína (actividad enzimática) se ha utilizado para describir la diferenciación de los osteoblastos [59]. Además, como la mineralización de la matriz representa el último paso de la diferenciación, el estudio de este parámetro es un resultado muy importante para determinar la eficacia de la diferenciación de los osteoblastos en la investigación ósea [60-62]. Aquí, la diferenciación osteogénica de las hBM-MSCs se evaluó midiendo el nivel de expresión de *ALP*, la actividad de ALP y el proceso de mineralización. Estos marcadores se midieron en las células cultivadas en la superficie de los andamios con 25 capas de SPIONs impresas, tanto en presencia como en ausencia del campo magnético. Nuestros resultados revelaron que 7 días de cultivo celular en la superficie de ambos tipos de andamios con depósitos de SPIONs (DMSA 25L y RGD 25L) promovieron un aumento significativo de la expresión de *ALP* tanto en presencia como en ausencia del campo magnético (MF), en comparación con las células cultivadas en los andamios sin nanopartículas (SC y SC + MF respectivamente). Tras la exposición de las

células al MF, la expresión del gen *ALP* aumentó significativamente en todas las condiciones en comparación con las células no expuestas (**Figura 3.3.8.A**). Así, se produjo un aumento de la expresión de *ALP* asociado exclusivamente al material (SPIONs depositadas en la superficie del andamio), un aumento asociado exclusivamente al campo magnético (condición SC + MF) y un aumento mayor asociado a la combinación de ambos (SPIONs depositadas en la superficie y + MF). Siguiendo la tendencia de la expresión génica a los 7 días, se observó un aumento significativo de la actividad ALP en las células cultivadas sobre los andamios DMSA 25L y RGD 25L en comparación con las células cultivadas sobre los andamios control (SC y SC + MF respectivamente), tanto aplicando como sin aplicar MF. Tras la exposición de las células a MF, la actividad ALP aumentó significativamente en todas las condiciones en comparación con las células no expuestas (**Figura 3.3.9.A**). De nuevo, estos resultados revelan un incremento atribuido a la presencia de SPIONs, otro relacionado con el MF, y el mayor incremento cuando las SPIONs son activados por el MF. Los resultados sugieren que ambos tipos de andamios combinados con el campo magnético promueven una diferenciación eficiente hacia el linaje osteogénico de las células madre mesenquimales humanas utilizadas en este estudio, ya que la expresión de *ALP* se ha descrito en preosteoblastos [59] y osteoblastos maduros [63]. Nuestros datos concuerdan con estudios previos que han demostrado que las SPIONs, los campos magnéticos estáticos y la combinación de ambos promueven la diferenciación osteogénica [64]. Dado que la ALP potencia la mineralización de la matriz extracelular [59], que es otro signo de diferenciación osteogénica, evaluamos este proceso en nuestro modelo. La **Figura 3.3.10.A** muestra los resultados tras 7 días de cultivo: a pesar de ser un tiempo muy temprano para evaluar un marcador de diferenciación osteogénica como es la mineralización, se observó un aumento significativo de la absorbancia en las condiciones DMSA 25L + MF y RGD 25L + MF en comparación con SC y SC + MF. Esto podría sugerir que en los andamios DMSA 25L + MF y RGD 25L + MF las células comienzan el proceso de mineralización antes que en el resto de condiciones, de modo que en poco tiempo (7 días) puede observarse el efecto de la diferenciación osteogénica a través del proceso de mecanotransducción (SPIONs activadas por MF). Además, entre los múltiples factores de transcripción que regulan la diferenciación osteoblástica, RUNX2 es un factor de transcripción maestro en la diferenciación de MSCs a osteoblastos [65]. Por lo tanto, la expresión de RUNX2 se utiliza habitualmente como marcador de la diferenciación osteogénica de las MSCs. RUNX2 se considera el interruptor maestro para el inicio de la osteogénesis, ya que RUNX2 se expresa en las MSCs y se regula al alza en los preosteoblastos, mientras que en los osteoblastos maduros, la expresión de RUNX2 se regula a la baja [66-71]. En este estudio también medimos el nivel de expresión de *Runx2* a los 7 días. Los resultados muestran una disminución significativa de la expresión de *Runx2* en las condiciones DMSA 25L + MF y RGD 25L + MF en comparación con las condiciones no estimuladas (DMSA 25L y RGD 25L respectivamente) (**Figura 3.3.11.**). Además, los valores más bajos de expresión de *Runx2*

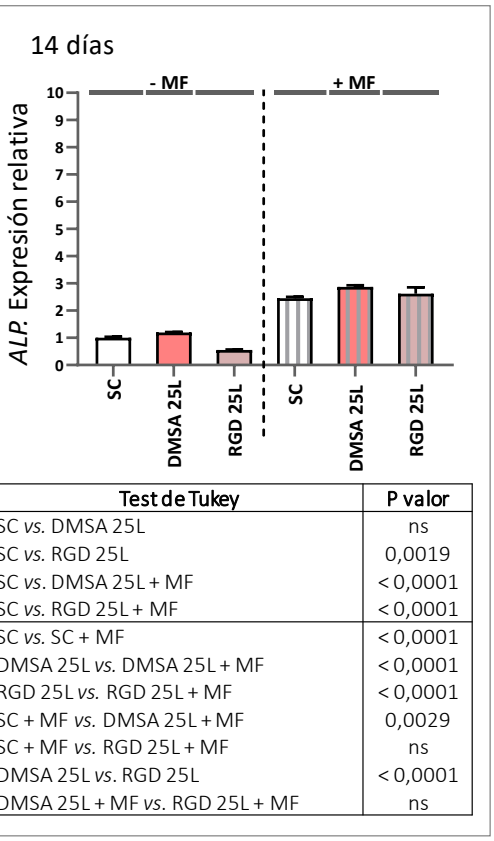
se dan en las condiciones de estimulación por campo magnético (+ MF) coincidiendo con las condiciones con los valores más altos de expresión de *ALP*, actividad enzimática de ALP y mineralización. Estos resultados podrían sugerir que las células cultivadas en la superficie de andamios con depósitos de SPIONs y sometidas a estímulos magnéticos (DMSA 25L + MF y RGD 25L + MF) se diferencian en osteoblastos e inician la fase de mineralización antes que en las demás condiciones estudiadas.

A)



Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L	0,0002
SC *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC + MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	< 0,0001
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	0,0001

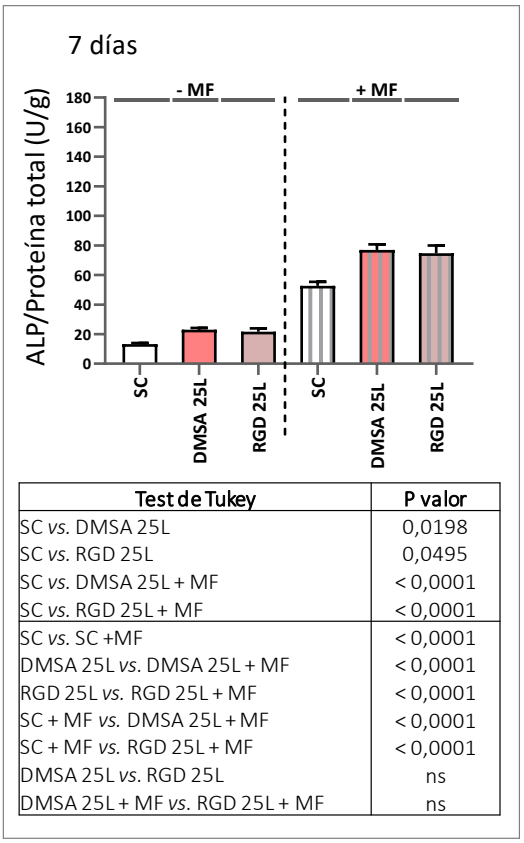
B)



Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	ns
SC *vs.* RGD 25L	0,0019
SC *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC + MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	0,0029
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	< 0,0001
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns

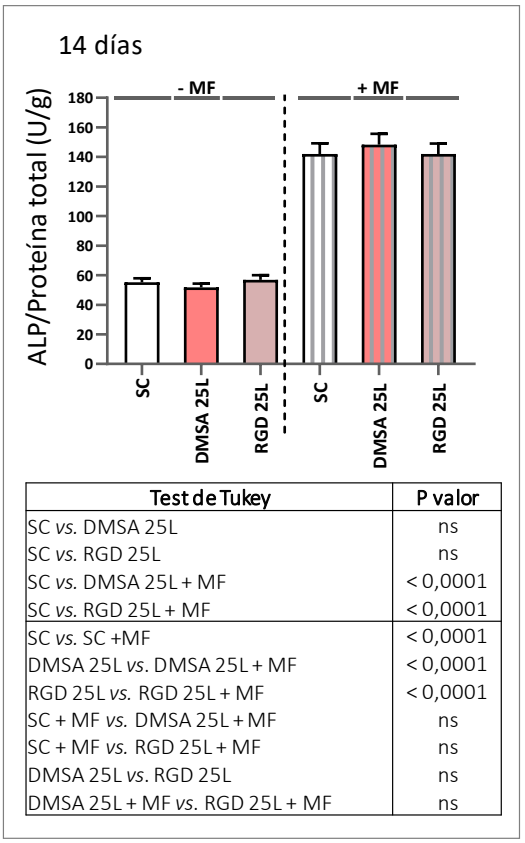
Figura 3.3.8. Evaluación de la expresión del gen *ALP* en hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios SC, DMSA 25L y RGD 25L aplicando (+ MF) y sin aplicar (- MF) un campo magnético externo de 1 Hz de frecuencia durante 1 h al día. La expresión se midió a los 7 días (A) y a los 14 días (B). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey.

A)



Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	0,0198
SC *vs.* RGD 25L	0,0495
SC *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC +MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	ns
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns

B)



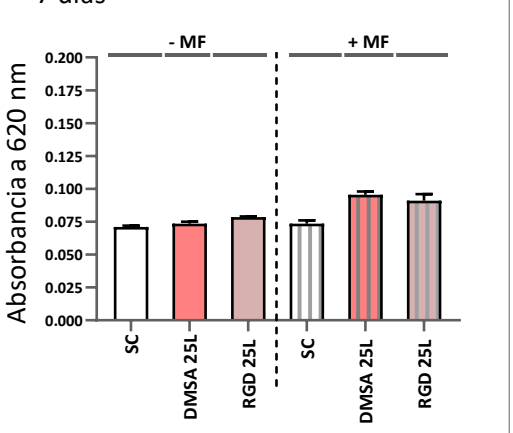
Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	ns
SC *vs.* RGD 25L	ns
SC *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC +MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	ns
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	ns
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns

Figura 3.3.9. Evaluación de la actividad ALP en hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios SC, DMSA 25L y RGD 25L aplicando (+ MF) y sin aplicar (- MF) un campo magnético externo de 1 Hz de frecuencia durante 1 h al día. La expresión se midió a los 7 días (A) y a los 14 días (B). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey.

Considerando 14 días de cultivo celular en ausencia de MF, la expresión del gen *ALP* se mantuvo en el andamio DMSA 25L, es decir, no se detectaron diferencias significativas en comparación con la condición SC. Sin embargo, se detectó una disminución significativa de la expresión génica en el andamio RGD 25L en comparación con las células cultivadas en SC. De nuevo, en presencia de MF, la expresión génica aumentó significativamente en todas las condiciones en comparación con las células no expuestas. Los resultados sugieren que a corto plazo (7 días) es posible detectar el efecto de mecanotransducción, ya que el aumento de la expresión génica de *ALP* en las condiciones DMSA 25L + MF y RGD 25L + MF es significativamente superior al aumento en la condición SC + MF. Sin embargo, a tiempos largos (14 días) dicho efecto no es tan evidente, ya que no se observan diferencias entre las condiciones SC + MF y RGD 25L + MF, aunque se sigue observando un aumento significativo en la condición DMSA 25L + MF con respecto a SC + MF. Los resultados se muestran en la **Figura 3.3.8.A** y **3.3.8.B.** A los 14 días (**Figura 3.3.9.B**), no se observaron diferencias significativas en la actividad de

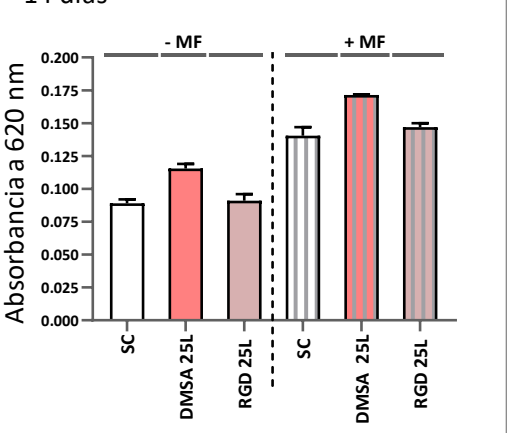
la fosfatasa alcalina entre las condiciones DMSA 25L y RGD 25L con respecto a SC, ya fuera aplicando o sin aplicar MF. Tras la exposición de las células a MF, la actividad ALP aumentó significativamente en todas las condiciones en comparación con las células no expuestas. De nuevo, este resultado se asemeja al obtenido en el análisis de expresión génica de 14 días. Se observa un aumento de la actividad ALP asociado al campo magnético, pero no se observan diferencias entre los andamios con SPIONs y los andamios control. Esto podría deberse a que tanto el efecto osteogénico producido por el medio de diferenciación (factores osteogénicos) como el efecto osteogénico producido por el medio de diferenciación más el campo magnético, durante un tiempo prolongado (14 días), son muy superiores al efecto asociado a las SPIONs y al efecto asociado a las SPIONs activados por el MF. Por lo tanto, el efecto del medio de diferenciación a largo plazo (14 días) podría estar enmascarando el efecto debido a la mecanotransducción, pero a corto plazo (7 días) es evidente. Por último, a los 14 días (**Figura 3.3.10.B**), se observó un aumento de la mineralización en las células cultivadas en el andamio DMSA 25L en comparación con las células del andamio sin SPIONs, tanto con la aplicación del campo magnético como sin ella. Además, en presencia de MF, la mineralización aumentó significativamente en todas las condiciones en comparación con las células no expuestas. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional ($P < 0,001$) y la prueba de Tukey.

A)



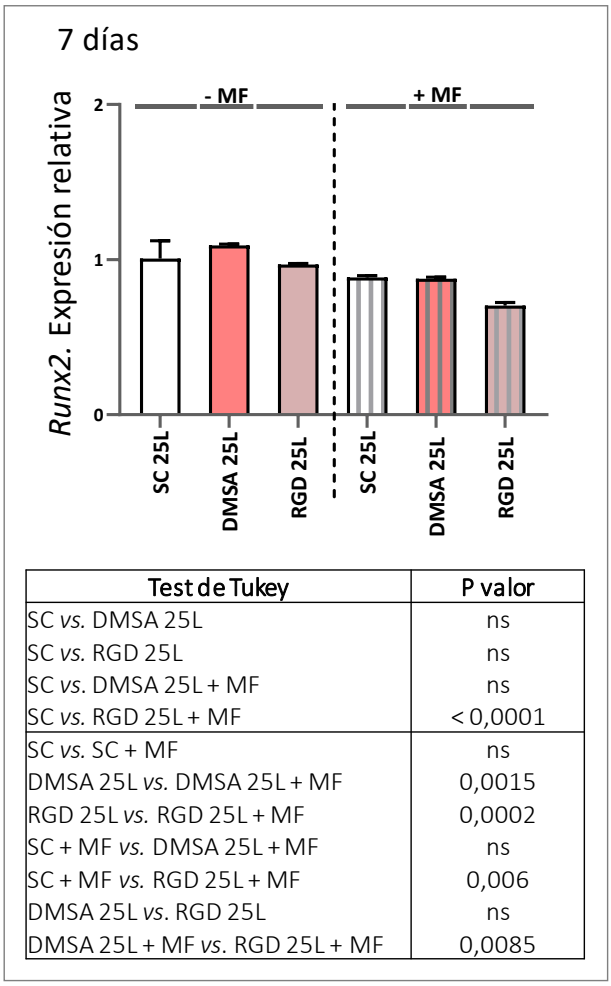
Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	ns
SC *vs.* RGD 25L	0,0385
SC *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC + MF	ns
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	0,0008
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	ns
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns

B)



Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L	ns
SC *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC + MF	< 0,0001
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	< 0,0001
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	ns
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	< 0,0001
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001

Figura 3.3.10. Evaluación del proceso de mineralización en hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios SC, DMSA 25L y RGD 25L aplicando (+ MF) y sin aplicar (- MF) un campo magnético externo de 1 Hz de frecuencia durante 1 h al día. La expresión se midió a los 7 días (A) y a los 14 días (B). Los depósitos de calcio teñidos con rojo de alizarina se cuantificaron midiendo la absorbancia a 620 nm. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey.



Test de Tukey	P valor
SC *vs.* DMSA 25L	ns
SC *vs.* RGD 25L	ns
SC *vs.* DMSA 25L + MF	ns
SC *vs.* RGD 25L + MF	< 0,0001
SC *vs.* SC + MF	ns
DMSA 25L *vs.* DMSA 25L + MF	0,0015
RGD 25L *vs.* RGD 25L + MF	0,0002
SC + MF *vs.* DMSA 25L + MF	ns
SC + MF *vs.* RGD 25L + MF	0,006
DMSA 25L *vs.* RGD 25L	ns
DMSA 25L + MF *vs.* RGD 25L + MF	0,0085

Figura 3.3.11. Evaluación de la expresión del gen *Runx2* en hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios SC, DMSA 25L y RGD 25L aplicando (+ MF) y sin aplicar (- MF) un campo magnético externo de 1 Hz de frecuencia durante 1 h al día. La expresión se midió a los 7 días. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey.

Hu *et al.* [72] demostraron una mayor regeneración ósea *in vivo* en ratas utilizando una esponja de gelatina (GS) cargada con SPIONs como andamio (SPIONs-GS). Los resultados aseguraron que las SPIONs inducían una osteogénesis activa sin utilizar un campo magnético externo. Lu *et al.* [73] recubrieron andamios impresos en 3D con SPIONs y los utilizaron para la regeneración ósea del paladar en un modelo de rata. Los resultados demostraron que los andamios recubiertos con SPIONs pueden utilizarse para tratar defectos del paladar. Además, varios estudios han revelado que los campos magnéticos estáticos pueden regular la proliferación, diferenciación y función de las células del tejido óseo, incluidas las hBM-MSCs, los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos. Asimismo, un gran número de experimentos con animales y estudios clínicos han demostrado que los campos magnéticos estáticos tienen efectos terapéuticos eficaces en enfermedades relacionadas con los huesos, como las fracturas que no

cicatrizan, la no unión de implantes óseos, la osteoporosis y la artrosis [74]. En los últimos años ha aumentado la investigación sobre la combinación de campos magnéticos estáticos con materiales regenerativos óseos, especialmente materiales magnéticos [64]. Zhang *et al.* también han demostrado que el campo magnético estimula la diferenciación osteogénica de las MSCs sobre andamios magnéticos [75]. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, ellos no detectan el efecto osteogénico a corto plazo (7 días) y sí en el cultivo de 14 días. Esto sugiere que, en sus materiales, las partículas magnéticas acopladas al campo magnético podrían promover la osteogénesis, pero se necesita un mayor tiempo de exposición.

En cuanto a la presencia o ausencia del péptido RGD en las SPIONs depositados en la superficie de los andamios, tras 7 días de cultivo no se observaron diferencias significativas ni en la actividad de la fosfatasa alcalina ni en la mineralización, independientemente de que se aplicara o no un campo magnético (DMSA 25L frente a RGD 25L y DMSA 25L + MF frente a RGD 25L + MF). Tras 14 días de cultivo, tampoco hubo diferencias entre la presencia o ausencia del péptido RGD en la actividad de la fosfatasa alcalina de las células. La funcionalización de las SPIONs con el péptido RGD se llevó a cabo con el objetivo de favorecer las interacciones entre las SPIONs y las integrinas celulares, que pueden actuar como mecanosensores celulares [76-78]. Un estudio reciente del grupo [38] demuestra que la funcionalización de este tipo de SPIONs con el péptido RGD potencia la diferenciación osteogénica de hBM-MSCs cuando se añaden en solución acuosa sobre las células y se aplica el campo magnético tras los primeros 30 minutos desde su incorporación. Sin embargo, en la presente estrategia las SPIONs se encuentran en forma de depósitos sobre la superficie del andamio, "atrapadas" entre la superficie del andamio y la superficie de la monocapa celular. En consecuencia, las SPIONs están en contacto con la superficie celular, estén o no funcionalizadas con el péptido RGD (como puede verse en las imágenes de microscopía confocal). Asimismo, además de las integrinas, las células presentan otras proteínas superficiales y estructuras de membrana como canales de calcio de tipo piezoeléctrico, uniones gap o cilios primarios, que desempeñan un papel crucial en el mecanosensado de los estímulos mecánicos [79-80]. Así pues, cuando se aplica el campo magnético para generar un estímulo mecánico a través de las SPIONs, las células poseen varias vías para detectar dicho estímulo mecánico. Por lo tanto, este hecho podría explicar por qué no se observa un aumento de la diferenciación en la condición de andamios con SPIONs funcionalizadas con RGD con respecto a la condición de andamios con SPIONs sin RGD.

Sin embargo, después de 7 días de cultivo, se observó un aumento de la expresión de *ALP* en la condición DMSA 25L en comparación con la condición RGD 25L en ambos casos aplicando y sin aplicar campo magnético. Este hecho también se observó a los 14 días de cultivo en los resultados de expresión de *ALP* sin campo magnético y mineralización a los 14 días de cultivo.

3.3.4. Conclusiones

En este trabajo se han obtenido con éxito andamios magnéticos 3D mediante la combinación del modelado por deposición fundida de un filamento polimérico mezcla de tres polímeros (PLLA/PCL/PHBV, 90/5/5 % masa respectivamente) y la impresión por inyección térmica de tinta por goteo a demanda de suspensiones de SPIONs en la superficie de los andamios previamente elaborados. Para ello, se han utilizado suspensiones de SPIONs preparadas por descomposición térmica, estabilizadas en medio acuoso mediante intercambio de ligandos y funcionalizadas con un péptido RGD. Las SPIONs se han incorporado en la superficie de los andamios en forma de depósitos de aproximadamente 100 µm de diámetro siguiendo con fidelidad el patrón 2D diseñado. Las diferentes cantidades de Fe en los andamios, evaluadas por ICP-AES, demostraron la precisión y versatilidad de la técnica de producción, así como la estabilidad de las muestras tras 7 días en condiciones fisiológicas. Además, la caracterización magnética indicó que las propiedades superparamagnéticas de las SPIONs se conservan tras su incorporación en la superficie de los andamios poliméricos.

La evaluación biológica reveló una alta viabilidad, adhesión y proliferación de las hBM-MSCs en contacto con los diferentes andamios desarrollados, demostrando su la alta biocompatibilidad para las aplicaciones biomédicas previstas. Por su parte, los estudios de diferenciación osteogénica aplicando un campo magnético externo de 250 mT y 1 Hz de frecuencia durante 1 h al día mostraron un aumento significativo de la expresión del gen *ALP*, de la actividad enzimática ALP y del proceso de mineralización en las hBM-MSCs. Asimismo, se puede distinguir un incremento atribuido a la presencia de SPIONs, otro relacionado con la aplicación del campo magnético, y el mayor incremento cuando las SPIONs se combinan con el campo magnético externo. Por último, los andamios con SPIONs funcionalizadas con el péptido RGD, incorporadas para favorecer la interacción con las integrinas celulares, no mejoran el efecto osteogénico observado con los andamios con SPIONs sin funcionalizar, a diferencia de lo observado cuando se administran en suspensión [38]. El conjunto de resultados hace de los andamios magnéticos 3D desarrollados herramientas muy prometedoras para tratamientos avanzados y personalizados de regeneración ósea.

Referencias bibliográficas

[1] Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *40*(5).

[2] O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, *14*(3), 88-95.

[3] Pearce, H. A., Kim, Y. S., Diaz-Gomez, L., & Mikos, A. G. (2020). Tissue engineering scaffolds. In *Biomaterials Science* (pp. 1317-1334). Academic Press.

[4] Kim, Y. S., & Mikos, A. G. (2021). Emerging strategies in reprogramming and enhancing the fate of mesenchymal stem cells for bone and cartilage tissue engineering. *Journal of controlled release*, *330*, 565-574.

[5] Alonzo, M., Primo, F. A., Kumar, S. A., Mudloff, J. A., Dominguez, E., Fregoso, G., Ortiz, N., Weiss, W. M., & Joddar, B. (2021). Bone tissue engineering techniques, advances, and scaffolds for treatment of bone defects. *Current opinion in biomedical engineering*, *17*, 100248.

[6] Bonatti, A. F., Chiesa, I., Micalizzi, S., Vozzi, G., & De Maria, C. (2021). Bioprinting for bone tissue engineering. *Minerva Orthopedics*, *72*(4), 376-394.

[7] Peltola, S. M., Melchels, F. P., Grijpma, D. W., & Kellomäki, M. (2008). A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of medicine*, *40*(4), 268-280.

[8] Madrid, A. P. M., Vrech, S. M., Sanchez, M. A., & Rodriguez, A. P. (2019). Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, *100*, 631-644.

[9] Kosorn, W., Sakulsumbat, M., Uppanan, P., Kaewkong, P., Chantaweroad, S., Jitsaard, J., Sitthiseripratip, K., & Janvikul, W. (2017). PCL/PHBV blended three dimensional scaffolds fabricated by fused deposition modeling and responses of chondrocytes to the scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials*, *105*(5), 1141-1150.

[10] Kontogianni, G. I., Loukelis, K., Bonatti, A. F., Batoni, E., De Maria, C., Naseem, R., Dalgarno, K., Vozzi, G., MacManus, D. B., Mondal, S., Dunne, N., Vitale-Brovarone, C., & Chatzinikolaidou, M. (2023). Effect of uniaxial compression frequency on osteogenic cell responses in dynamic 3D cultures. *Bioengineering*, *10*(5), 532.

[11] Kontogianni, G. I., Bonatti, A. F., De Maria, C., Naseem, R., Melo, P., Coelho, C., Vozzi, G., Dalgarno, K., Quadros, P., Vitale-Brovarone, C., & Chatzinikolaidou, M. (2023). Promotion of in vitro osteogenic activity by melt extrusion-based plla/pcl/phbv scaffolds enriched with nano-hydroxyapatite and strontium substituted nano-hydroxyapatite. *Polymers*, *15*(4), 1052.

[12] Sahmani, S., Khandan, A., Esmaeili, S., Saber-Samandari, S., Nejad, M. G., & Aghdam, M. M. (2020). Calcium phosphate-PLA scaffolds fabricated by fused deposition modeling technique for bone tissue applications: fabrication, characterization and simulation. *Ceramics International*, *46*(2), 2447-2456.

[13] Zhao, Y. Z., Chen, R., Xue, P. P., Luo, L. Z., Zhong, B., Tong, M. Q., Chen, B., Yao, Q., Yuan, J. D., & Xu, H. L. (2021). Magnetic PLGA microspheres loaded with SPIONs promoted the reconstruction of bone defects through regulating the bone mesenchymal

stem cells under an external magnetic field. *Materials Science and Engineering: C*, *122*, 111877.

[14] Li, Z., Xue, L., Wang, P., Ren, X., Zhang, Y., Wang, C., & Sun, J. (2023). Biological scaffolds assembled with magnetic nanoparticles for bone tissue engineering: a review. *Materials*, *16*(4), 1429.

[15] Marovič, N., Ban, I., Maver, U., & Maver, T. (2023). Magnetic nanoparticles in 3D-printed scaffolds for biomedical applications. *Nanotechnology Reviews*, *12*(1), 20220570.

[16] Samal, S. K., Dash, M., Shelyakova, T., Declercq, H. A., Uhlarz, M., Bañobre-López, M., Dubruel, P., Cornelissen, M., Herrmannsdörfer, T., Rivas, J., Padeletti, G., De Smedt, S., Braeckmans, K., Kaplan, D. L., & Dediu, V. A. (2015). Biomimetic magnetic silk scaffolds. *ACS applied materials & interfaces*, *7*(11), 6282-6292.

[17] Estévez, M., Montalbano, G., Gallo-Cordova, A., Ovejero, J. G., Izquierdo-Barba, I., González, B., Tomasina, C., Moroni, L., Vallet-Regí, M., Vitale-Brovarone, C., & Fiorilli, S. (2022). Incorporation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles into collagen formulation for 3D electrospun scaffolds. *Nanomaterials*, *12*(2), 181.

[18] Tanasa, E., Zaharia, C., Hudita, A., Radu, I. C., Costache, M., & Galateanu, B. (2020). Impact of the magnetic field on 3T3-E1 preosteoblasts inside SMART silk fibroin-based scaffolds decorated with magnetic nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, *110*, 110714.

[19] He, J., Hu, H., Zeng, X., Lan, F., Wu, F., & Wu, Y. (2017). A magnetic hydroxyapatite composite scaffold-based magnetic therapy for bone repair: an experimental study in canis lupus familiaris. *Regenerative Biomaterials*, *4*(2), 97-103.

[20] Zhang, J., Zhao, S., Zhu, M., Zhu, Y., Zhang, Y., Liu, Z., & Zhang, C. (2014). 3D-printed magnetic Fe 3 O 4/MBG/PCL composite scaffolds with multifunctionality of bone regeneration, local anticancer drug delivery and hyperthermia. *Journal of materials chemistry B*, *2*(43), 7583-7595.

[21] Das, B., Girigoswami, A., Dutta, A., Pal, P., Dutta, J., Dadhich, P., Srivas, P. K., & Dhara, S. (2019). Carbon nanodots doped super-paramagnetic iron oxide nanoparticles for multimodal bioimaging and osteochondral tissue regeneration via external magnetic actuation. *ACS biomaterials Science & engineering*, *5*(7), 3549-3560.

[22] Shokouhimehr, M., Theus, A. S., Kamalakar, A., Ning, L., Cao, C., Tomov, M. L., Kaiser, J. M., Goudy, S., Willett, N. J., Jang, H. W., LaRock, C. N., Hanna, P., Lechtig, A., Yousef, M., Da Silva-Martins, J., Nazarian, A., Harris, M. B., Mahmoudi, M., & Serpooshan, V. (2021). 3D bioprinted bacteriostatic hyperelastic bone scaffold for damage-specific bone regeneration. *Polymers*, *13*(7), 1099.

[23] Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D. W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., Jüngst, T., Malda, J., Mironov, V. A., & Woodfield, T. B. F. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, *11*(1), 013001.

[24] Spangenberg, J., Kilian, D., Czichy, C., Ahlfeld, T., Lode, A., Günther, S., Odenbach, S., & Gelinsky, M. (2021). Bioprinting of magnetically deformable scaffolds. *ACS biomaterials science & engineering*, *7*(2), 648-662.

[25] Rotherham, M., Nahar, T., Broomhall, T. J., Telling, N. D., & El Haj, A. J. (2022). Remote magnetic actuation of cell signalling for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, *24*, 100410.

[26] Kavand, H., Rahaie, M., Haghighipour, N., Bonakdar, S., & Koohsorkhi, J. (2018). Magneto-mechanical stimulation of bone marrow mesenchymal stromal cells for chondrogenic differentiation studies. *Journal of Computational Applied Mechanics*, *49*(2), 386-394.

[27] Henstock, J. R., Rotherham, M., Rashidi, H., Shakesheff, K. M., & El Haj, A. J. (2014). Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy. *Stem cells translational medicine*, *3*(11), 1363-1374.

[28] Hughes, S., Dobson, J., & El Haj, A. J. (2007). Magnetic targeting of mechanosensors in bone cells for tissue engineering applications. *Journal of biomechanics*, *40*, S96-S104.

[29] Chakraborty, J., Fernandez-Perez, J., Ghahfarokhi, M. T., van Kampen, K. A., ten Brink, T., Ramis, J., Kalogeropoulou, M., Cabassi, R., de Julián-Fernández, C., Albertini, F., Mota, C., Ghosh, S., & Moroni, L. (2024). Development of 4D-bioprinted shape-morphing magnetic constructs for cartilage regeneration using a silk fibroin-gelatin bioink. *Cell Reports Physical Science*.

[30] Xu, Z., Zhang, Y., Zheng, L., Cai, H., Yang, X., Xue, Y., Wan, Q., Chen, J., & Li, Y. (2024). Magnetic scaffold constructing by micro-injection for bone tissue engineering under static magnetic field. *Journal of Materials Research and Technology*.

[31] Hao, L., Li, L., Wang, P., Wang, Z., Shi, X., Guo, M., & Zhang, P. (2019). Synergistic osteogenesis promoted by magnetically actuated nano-mechanical stimuli. *Nanoscale*, *11*(48), 23423-23437.

[32] Li, X., Liu, B., Pei, B., Chen, J., Zhou, D., Peng, J., Zhang, X., Jia, W., & Xu, T. (2020). Inkjet bioprinting of biomaterials. *Chemical Reviews*, *120*(19), 10793-10833.

[33] Suntornnond, R., Ng, W. L., Huang, X., Yeow, C. H. E., & Yeong, W. Y. (2022). Improving printability of hydrogel-based bio-inks for thermal inkjet bioprinting applications via saponification and heat treatment processes. *Journal of Materials Chemistry B*, *10*(31), 5989-6000.

[34] Derby, B. (2010). Inkjet printing of functional and structural materials: fluid property requirements, feature stability, and resolution. *Annual Review of Materials Research*, *40*, 395-414.

[35] Chou, W. H., Gamboa, A., & Morales, J. O. (2021). Inkjet printing of small molecules, biologics, and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *600*, 120462.

[36] Naseem, R., Montalbano, G., German, M. J., Ferreira, A. M., Gentile, P., & Dalgarno, K. (2022). Influence of pcl and phbv on plla thermal and mechanical properties in binary and ternary polymer blends. *Molecules*, *27*(21), 7633.

[37] Salas, G., Casado, C., Teran, F. J., Miranda, R., Serna, C. J., & Morales, M. P. (2012). Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, *22*(39), 21065-21075.

[38] Estévez, M., Cicuéndez, M., Colilla, M., Vallet-Regí, M., González, B., & Izquierdo-Barba, I. (2024). Magnetic colloidal nanoformulations to remotely trigger mechanotransduction for osteogenic differentiation. *Journal of Colloid and Interface Science*. *664*, 454-468.

[39] Fortunato, G. M., Batoni, E., Bonatti, A. F., Vozzi, G., & De Maria, C. (2022). Surface reconstruction and tissue recognition for robotic-based in situ bioprinting. *Bioprinting*, *26*, e00195.

[40] Staroveški, T., Brezak, D., & Udiljak, T. (2013). LINUXCNC--THE ENHANCED MACHINE CONTROLLER: APPLICATION AND AN OVERVIEW. *Tehnicki vjesnik/Technical Gazette*, *20*(6).

[41] Bonatti, A. F., Fortunato, G. M., Lapomarda, A., De Acutis, A., De Maria, C., Brovarone, C. V., & Vozzi, G. (2020). Advanced Firmware and Hardware for Multiscale and Multimaterial Bioprinting. In *Convegno Nazionale di Bioingegneria* (pp. 240-243). Patron Editore Srl.

[42] Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Pascua, I., de Juan, C., Head, J., Gómez, A., Hernando, F., Jarabo, J. R., Díaz-Rubio, E., Torres, A. J., Rouleau, M., Benito, M., & Iniesta, P. (2014). Poly (ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a potential repressor of telomerase activity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *33*, 1-8.

[43] Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and technology of advanced materials*, *16*(2), 023501.

[44] Vyavahare, S., Kumar, S., & Panghal, D. (2020). Experimental study of surface roughness, dimensional accuracy and time of fabrication of parts produced by fused deposition modelling. *Rapid Prototyping Journal*, *26*(9), 1535-1554.

[45] Zhang, Y., Hai, Y., Miao, Y., Qi, X., Xue, W., Luo, Y., Fan, H., & Yue, T. (2021). The toxicity mechanism of different sized iron nanoparticles on human breast cancer (MCF7) cells. *Food chemistry*, *341*, 128263.

[46] Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., & Li, P. (2020). Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale research letters*, *15*(1), 115.

[47] Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (57), e3357.

[48] Tyagi, N., Gambhir, K., Kumar, S., Gangenahalli, G., & Verma, Y. K. (2021). Interplay of reactive oxygen species (ROS) and tissue engineering: a review on clinical aspects of ROS-responsive biomaterials. *Journal of Materials Science*, *56*(30), 16790-16823.

[49] Liu, J., Han, X., Zhang, T., Tian, K., Li, Z., & Luo, F. (2023). Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: From mechanism to therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, *16*(1), 116.

[50] Liu, W. F., Ma, M., Bratlie, K. M., Dang, T. T., Langer, R., & Anderson, D. G. (2011). Real-time in vivo detection of biomaterial-induced reactive oxygen species. *Biomaterials*, *32*(7), 1796-1801.

[51] Estévez, M., Cicuéndez, M., Crespo, J., Serrano-López, J., Colilla, M., Fernández-Acevedo, C., Oroz-Mateo, T., Rada-Leza, A., González, B., Izquierdo-Barba, I., & Vallet-Regí, M. (2023). Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: In vitro biological evaluation for biomedical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, *650*, 560-572.

[52] Petretta, M., Gambardella, A., Desando, G., Cavallo, C., Bartolotti, I., Shelyakova, T., Goranov, V., Brucale, M., Dediu, V. A., Fini, M., & Grigolo, B. (2021). Multifunctional 3D-printed magnetic polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*, *13*(21), 3825.

[53] Khalili, M., Keshvari, H., Imani, R., Sohi, A. N., Esmaeili, E., & Tajabadi, M. (2022). Study of osteogenic potential of electrospun PCL incorporated by dendrimerized superparamagnetic nanoparticles as a bone tissue engineering scaffold. *Polymers for Advanced Technologies*, *33*(3), 782-794.

[54] Murshed, M. (2018). Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *8*(12), a031229.

[55] Hessle, L., Johnson, K. A., Anderson, H. C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J. W., Terkeltaub, R., & Millán, J. L. (2002). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(14), 9445-9449.

[56] Murshed, M., Harmey, D., Millán, J. L., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & development*, *19*(9), 1093-1104.

[57] Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry*, *29*, 269-278.

[58] Marom, R., Shur, I., Solomon, R., & Benayahu, D. (2005). Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. *Journal of cellular physiology*, *202*(1), 41-48.

[59] Granéli, C., Thorfve, A., Ruetschi, U., Brisby, H., Thomsen, P., Lindahl, A., & Karlsson, C. (2014). Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem cell research*, *12*(1), 153-165.

[60] Serguienko, A., Wang, M. Y., & Myklebost, O. (2018). Real-time vital mineralization detection and quantification during in vitro osteoblast differentiation. *Biological procedures online*, *20*, 1-5.

[61] Moester, M. J., Schoeman, M. A., Oudshoorn, I. B., van Beusekom, M. M., Mol, I. M., Kaijzel, E. L., Löwik, C. W. G. M., & de Rooij, K. E. (2014). Validation of a simple and fast method to quantify in vitro mineralization with fluorescent probes used in molecular imaging of bone. *Biochemical and biophysical research communications*, *443*(1), 80-85.

[62] Koblenzer, M., Weiler, M., Fragoulis, A., Rütten, S., Pufe, T., & Jahr, H. (2022). Physiological mineralization during in vitro osteogenesis in a biomimetic spheroid culture model. *Cells*, *11*(17), 2702.

[63] Amarasekara, D. S., Kim, S., & Rho, J. (2021). Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks. *International journal of molecular sciences*, *22*(6), 2851.

[64] Yang, J., Wu, J., Guo, Z., Zhang, G., & Zhang, H. (2022). Iron Oxide Nanoparticles Combined with Static Magnetic Fields in Bone Remodeling. *Cells*, *11*(20), 3298.

[65] Zhang, M., Ma, T., Hu, B., & Xiang, W. (2022). FOXP1 promotes osteoblast differentiation via regulation of TGF-β/ALK-5 pathway. *ScienceAsia*, *48*(4).

[66] Liu, Z., Wang, Q., Zhang, J., Qi, S., Duan, Y., & Li, C. (2023). The Mechanotransduction Signaling Pathways in the Regulation of Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 14326.

[67] Arboleya, L., & Castañeda, S. (2013). Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatología Clínica (English Edition)*, *9*(5), 303-315.

[68] Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. In *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and skeletal systems II* (pp. 43-49). Springer US.

[69] Maruyama, Z., Yoshida, C. A., Furuichi, T., Amizuka, N., Ito, M., Fukuyama, R., Miyazaki, T., Kitaura, H., Nakamura, K., Fujita, T., Kanatani, N., Moriishi, T., Yamana, K., Liu, W., Kawaguchi, H., Nakamura, K., & Komori, T. (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *236*(7), 1876-1890.

[70] Qin, X., Jiang, Q., Miyazaki, T., & Komori, T. (2019). Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells. *Human Molecular Genetics*, *28*(6), 896-911.

[71] Komori, T. (2019). Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *International journal of molecular sciences*, *20*(7), 1694.

[72] Hu, S., Zhou, Y., Zhao, Y., Xu, Y., Zhang, F., Gu, N., Ma, J., Reynolds, M. A., Xia, Y., & Xu, H. H. (2018). Enhanced bone regeneration and visual monitoring via superparamagnetic iron oxide nanoparticle scaffold in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *12*(4), e2085-e2098.

[73] Jia, L., Yang, Z., Sun, L., Zhang, Q., Guo, Y., Chen, Y., Dai, Y., & Xia, Y. (2021). A three-dimensional-printed SPION/PLGA scaffold for enhanced palate-bone regeneration and concurrent alteration of the oral microbiota in rats. *Materials Science and Engineering: C*, *126*, 112173.

[74] Yang, J., Feng, Y., Li, Q., & Zeng, Y. (2023). Evidence of the static magnetic field effects on bone-related diseases and bone cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *177*, 168-180.

[75] Zhang, J., He, X., Chen, X., Wu, Y., Dong, L., Cheng, K., Lin, J., Wang, H., & Weng, W. (2020). Enhancing osteogenic differentiation of BMSCs on high magnetoelectric response films. *Materials Science and Engineering: C*, *113*, 110970.

[76] Kechagia, J. Z., Ivaska, J., & Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature reviews Molecular cell biology*, *20*(8), 457-473.

[77] Qin, L., Liu, W., Cao, H., & Xiao, G. (2020). Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone research*, *8*(1), 23.

[78] Weber, G. F., Bjerke, M. A., & DeSimone, D. W. (2011). Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *Journal of cell science*, *124*(8), 1183-1193.

[79] Choi, J. U. A., Kijas, A. W., Lauko, J., & Rowan, A. E. (2022). The mechanosensory role of osteocytes and implications for bone health and disease states. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 770143.

[80] Wang, L., You, X., Zhang, L., Zhang, C., & Zou, W. (2022). Mechanical regulation of bone remodeling. *Bone Research*, *10*(1), 16.

3.4. Escalabilidad: SPIONs sintetizadas mediante pirolisis por pulverización en llama

3.4.1. Introducción y resumen

Las propiedades únicas y el importante potencial biomédico de las SPIONs han despertado un gran interés por el desarrollo de nuevas estrategias para sintetizar SPIONs dispersables en fase acuosa [1]. Sin embargo, para promover aún más el desarrollo y la traslación clínica de estas nanopartículas, es muy conveniente reducir las variaciones no deseadas entre lotes de nanopartículas, ya que caracterizar y refinar cada lote es costoso, requiere mucho esfuerzo y, por lo tanto, no es productivo. Así, la síntesis a gran escala es una vía sencilla y económica para minimizar este problema [2,3].

Existe una gran variedad de métodos de síntesis descritos para las SPIONs [3], muchos de ellos han sido estudiados para optimizar la producción de las nanopartículas a gran escala [2]. Se ha demostrado que los métodos de descomposición térmica pueden dar lugar a la producción de SPIONs a gran escala (multigramo) [4,5]. Otros autores han descrito una producción de SPIONs por descomposición térmica de hasta 40 g/reactor, pudiendo obtener kilogramos si se emplean varios reactores en paralelo [6]. En otro estudio, la producción de SPIONs dispersables en agua mediante descomposición térmica asistida por microondas se escaló desde los 22 mg de Fe_2O_3 en la reacción de laboratorio hasta una producción de 2,61 g/lote de Fe_2O_3 con una unidad de microondas multimodo [7]. Incluso se ha investigado el escalado del proceso de transferencia de fase orgánica a fase acuosa de SPIONs sintetizadas mediante descomposición térmica [8].

Por su parte, la tecnología FSP, de probada escalabilidad y reproducibilidad [9,10], es una técnica de nanofabricación sencilla y en un solo paso. Permite la fabricación continua de nanopartículas de óxidos metálicos con altas tasas de producción (hasta 10 kg/h), alto rendimiento y bajos costes de fabricación [9-14]. A pesar de ello, las SPIONs sintetizadas mediante esta metodología han sido muy poco estudiadas para aplicaciones biomédicas. En este sentido, SPIONs dopadas y no dopadas producidas por FSP [15,16], se estudiaron para inducir la amorfización *in situ* de un fármaco en comprimidos destinados a la administración oral utilizando la hipertermia magnética, además, se evaluó su citotoxicidad en células intestinales Caco-2 humanas [17]. En otro estudio, se demostró que las nanopartículas de γ-Fe_2O_3 preparadas mediante pirólisis por pulverización en llama y recubiertas de poli-L-lisina pueden utilizarse como agente de contraste de imágenes por resonancia magnética (MRI) para el marcaje celular a largo plazo [18]. También se han evaluado otras nanopartículas de óxido de hierro producidas mediante pirolisis por pulverización en llama como adhesivos tisulares bioactivos para la cicatrización deficiente de heridas dentro de un trabajo en el que se estudiaron otros cinco óxidos metálicos diferentes [19].

Por otro lado, para una aplicabilidad industrial real, especialmente en el caso de las aplicaciones biomédicas, es necesario superar una serie de dificultades como la

tendencia a la agregación y la estabilidad coloidal en un medio acuoso a largo plazo. El tratamiento ácido de la superficie de las SPIONs ha sido utilizado como método para mejorar las propiedades coloidales y disminuir el tamaño de los agregados en medios acuosos aumentando las densidades de carga superficial [20,21]. Este protocolo químico es consistente con una reducción del desorden superficial de las nanopartículas inducida por un mecanismo de disolución-recristalización. Asimismo, la modificación superficial de nanopartículas de óxido de hierro mediante un proceso de sustitución del ligando con DMSA suele realizarse con muy buenos resultados para transferir a un medio acuoso SPIONs hidrofóbicas obtenidas por métodos de descomposición térmica. En estos casos, el recubrimiento con DMSA produce nanopartículas hidrofílicas muy estables en dispersiones acuosas que conservan sus propiedades superparamagnéticas [22] y proporciona grupos reactivos que permiten el anclaje de otras moléculas [23].

Además, las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas exigen modificar su superficie para hacerlas no tóxicas, biocompatibles, no agregables y estables [24]. La funcionalización superficial de partículas inorgánicas con DMSA se considera una estrategia favorable para aumentar la biocompatibilidad [25,26]. Aun así, es de vital importancia evaluar la biocompatibilidad de las nanopartículas de estudio, ya que sólo garantizando la seguridad y eficacia podrá mejorarse aún más su aplicación en la investigación biomédica y la clínica [27]. En relación con lo anterior, diversas aplicaciones médicas de las nanopartículas requieren un contacto directo con el tejido sano y la sangre, por ello, la hemocompatibilidad de las nanopartículas en contacto con la sangre es uno de los criterios más importantes para determinar el valor traslacional clínico. Por tanto, antes de proceder a su aplicación clínica es necesario realizar análisis *in vitro* exhaustivos [28-30].

Los resultados descritos en los apartados anteriores de la tesis doctoral demuestran el potencial que presentan las SPIONs sintetizadas por descomposición térmica para su aplicación en la ingeniería del tejido óseo, tanto en dispersión como incorporadas en un dispositivo. Sin embargo, otros procesos de síntesis de SPIONs a gran escala, en un solo paso y que conduzcan a la producción de nanopartículas utilizables para aplicaciones biomédicas serían muy apreciables [31]; no solo por facilitar el posible desarrollo industrial de las SPIONs o el dispositivo que las contenga, sino también porque con un lote de producción se dispone de una cantidad suficiente de material para realizar una investigación completa utilizando siempre la misma composición (caracterización, incorporación sin límite en dispositivos, pruebas *in vitro*, pruebas *in vivo*, etc.).

A pesar del gran número de metodologías de síntesis descritas para las SPIONs, la producción a gran escala para su uso generalizado en aplicaciones biomédicas sigue siendo un gran reto. La pirolisis por pulverización en llama podría ser la solución para resolver esta limitación, ya que permite la fabricación de nanopartículas de óxidos metálicos con un alto rendimiento de producción y bajos costes de fabricación. Sin

embargo, por lo que sabemos, hasta la fecha este método de fabricación no se ha estudiado en profundidad con fines biomédicos. En el siguiente trabajo se han fabricado SPIONs mediante FSP y se ha tratado su superficie para recubrirla posteriormente con DMSA con el fin de mejorar su estabilidad coloidal en medios acuosos (**Figura 3.4.**). El material final presenta una alta calidad en términos de tamaño de las nanopartículas, distribución homogénea del tamaño, estabilidad coloidal a largo plazo y propiedades magnéticas. Se ha realizado una exhaustiva validación *in vitro* con células de sangre periférica y hBM-MSCs. En concreto, los estudios de hemocompatibilidad muestran que estas nanopartículas recubiertas FSP-SPIONs-DMSA no causan agregación plaquetaria ni alteran la función basal de los monocitos. Además, los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* muestran una captación celular dependiente de la dosis, al tiempo que mantienen valores elevados de viabilidad celular y progresión del ciclo celular sin causar estrés oxidativo celular. En conjunto, los resultados sugieren que las FSP-SPIONs-DMSA optimizadas en este trabajo podrían ser una alternativa digna con el beneficio de una producción a gran escala dirigida a la industrialización para aplicaciones biomédicas.

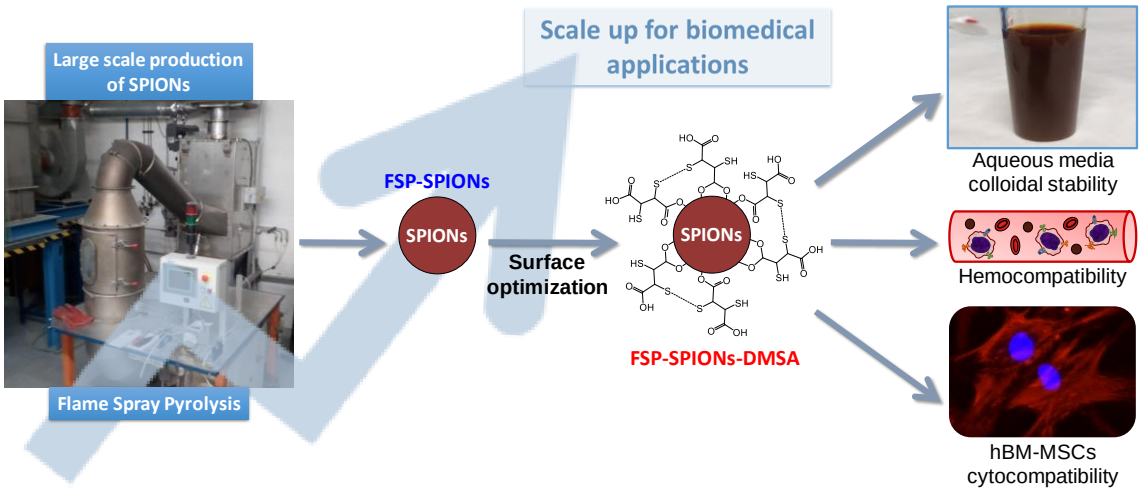


Figura 3.4. Representación esquemática resumida del presente trabajo (producción a gran escala de SPIONs mediante FSP, recubrimiento con DMSA y propiedades resultantes más destacables del producto final). Reproducido de la referencia [32].

Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con la empresa TECNAN (Tecnología Navarra de Nanoproductos S.L.) y el Centro Tecnológico Lurederra de Los Arcos (Navarra), donde se realizó la síntesis de las nanopartículas de partida; y con Juana Serrano López, del Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz, donde se realizaron los ensayos de hemocompatibilidad. En la Universidad Complutense de Madrid se desarrollaron el resto de tareas (modificación de la superficie de las SPIONs, caracterización de las mismas y ensayos *in vitro* con hBM-MSCs).

Referencias bibliográficas

[1] Weerathunge, P., Pooja, D., Singh, M., Kulhari, H., Mayes, E. L., Bansal, V., & Ramanathan, R. (2019). Transferrin-conjugated quasi-cubic SPIONs for cellular receptor profiling and detection of brain cancer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *297*, 126737.

[2] Kwon, H. J., Shin, K., Soh, M., Chang, H., Kim, J., Lee, J., Ko, G., Kim, B. H., Kim, D., & Hyeon, T. (2018). Large-scale synthesis and medical applications of uniform-sized metal oxide nanoparticles. *Advanced Materials*, *30*(42), 1704290.

[3] Samrot, A. V., Sahithya, C. S., Selvarani, J., Purayil, S. K., & Ponnaiah, P. (2021). A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, *4*, 100042.

[4] Fokina, V., Wilke, M., Dulle, M., Ehlert, S., & Förster, S. (2022). Size control of iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition methods. *The Journal of Physical Chemistry C*, *126*(50), 21356-21367.

[5] Kim, B. H., Lee, N., Kim, H., An, K., Park, Y. I., Choi, Y., Shin, K., Lee, Y., Kwon, S. G., Na, H. B., Park, J. G., Ahn, T. Y., Kim, Y. W., Moon, W. K., Choi, S. H., & Hyeon, T. (2011). Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T 1 magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(32), 12624-12631.

[6] Park, J., An, K., Hwang, Y., Park, J. G., Noh, H. J., Kim, J. Y., Park, J. H., Hwang, N. M., & Hyeon, T. (2004). Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature materials*, *3*(12), 891-895.

[7] Gonzalez-Moragas, L., Yu, S. M., Murillo-Cremaes, N., Laromaine, A., & Roig, A. (2015). Scale-up synthesis of iron oxide nanoparticles by microwave-assisted thermal decomposition. *Chemical Engineering Journal*, *281*, 87-95.

[8] Cai, J., Miao, Y. Q., Yu, B. Z., Ma, P., Li, L., & Fan, H. M. (2017). Large-scale, facile transfer of oleic acid-stabilized iron oxide nanoparticles to the aqueous phase for biological applications. *Langmuir*, *33*(7), 1662-1669.

[9] Mueller, R., Mädler, L., & Pratsinis, S. E. (2003). Nanoparticle synthesis at high production rates by flame spray pyrolysis. *Chemical Engineering Science*, *58*(10), 1969-1976.

[10] Strobel, R., & Pratsinis, S. E. (2007). Flame aerosol synthesis of smart nanostructured materials. *Journal of Materials Chemistry*, *17*(45), 4743-4756.

[11] Meierhofer, F., & Fritsching, U. (2021). Synthesis of metal oxide nanoparticles in flame sprays: review on process technology, modeling, and diagnostics. *Energy & Fuels*, *35*(7), 5495-5537.

[12] Teoh, W. Y., Amal, R., & Mädler, L. (2010). Flame spray pyrolysis: An enabling technology for nanoparticles design and fabrication. *Nanoscale*, *2*(8), 1324-1347.

[13] Suciu, M., Ionescu, C. M., Ciorita, A., Tripon, S. C., Nica, D., Al-Salami, H., & Barbu-Tudoran, L. (2020). Applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in drug and therapeutic delivery, and biotechnological advancements. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *11*(1), 1092-1109.

[14] Grimm, S., Schultz, M., Barth, S., & Muller, R. (1997). Flame pyrolysis–a preparation route for ultrafine pure γ-Fe2O3 powders and the control of their particle size and properties. *Journal of materials science*, *32*(4), 1083-1092.

[15] Starsich, F. H., Eberhardt, C., Boss, A., Hirt, A. M., & Pratsinis, S. E. (2018). Coercivity determines magnetic particle heating. *Advanced healthcare materials*, *7*(19), 1800287.

[16] Starsich, F. H., Sotiriou, G. A., Wurnig, M. C., Eberhardt, C., Hirt, A. M., Boss, A., & Pratsinis, S. E. (2016). Silica-Coated Nonstoichiometric Nano Zn-Ferrites for Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment. *Advanced Healthcare Materials*, *5*(20), 2698-2706.

[17] Ansari, S. R., Hempel, N. J., Asad, S., Svedlindh, P., Bergström, C. A., Löbmann, K., & Teleki, A. (2022). Hyperthermia-induced in situ drug amorphization by superparamagnetic nanoparticles in oral dosage forms. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *14*(19), 21978-21988.

[18] Fabry, B., Blank, F., West, A., Black, G., Woodward, R., Carroll, M., Hallam, E., Shaw, J., Murphy, J., Teoh, W. Y., Amal, R., House, M., & Pierre, T. S. (2009). Labeling of cancer cell with magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7-12, 2009, Munich, Germany: Vol. 25/2 Diagnostic Imaging* (pp. 368-371). Springer Berlin Heidelberg.

[19] Matter, M. T., Starsich, F., Galli, M., Hilber, M., Schlegel, A. A., Bertazzo, S., Pratsinis, S., & Herrmann, I. K. (2017). Developing a tissue glue by engineering the adhesive and hemostatic properties of metal oxide nanoparticles. *Nanoscale*, *9*(24), 8418-8426.

[20] Costo, R., Bello, V., Robic, C., Port, M., Marco, J. F., Puerto Morales, M., & Veintemillas-Verdaguer, S. (2012). Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir*, *28*(1), 178-185.

[21] Bee, A., Massart, R., & Neveu, S. (1995). Synthesis of very fine maghemite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *149*(1-2), 6-9.

[22] Salas, G., Casado, C., Teran, F. J., Miranda, R., Serna, C. J., & Morales, M. P. (2012). Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, *22*(39), 21065-21075.

[23] Del Sol-Fernández, S., Portilla-Tundidor, Y., Gutiérrez, L., Odio, O. F., Reguera, E., Barber, D. F., & Morales, M. P. (2019). Flower-like Mn-doped magnetic nanoparticles functionalized with α v β3-integrin-ligand to efficiently induce intracellular heat after alternating magnetic field exposition, triggering glioma cell death. *ACS applied materials & interfaces*, *11*(30), 26648-26663.

[24] Barrow, M., Taylor, A., Murray, P., Rosseinsky, M. J., & Adams, D. J. (2015). Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI. *Chemical Society Reviews*, *44*(19), 6733-6748.

[25] Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-lefranc, J. L., Botta, A., Wiesner, M. R., & Bottero, J. Y. (2006). In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxical study. *Environmental science & technology*, *40*(14), 4367-4373.

[26] Wang, Y., Wang, Y., Wang, L., Che, Y., Li, Z., & Kong, D. (2011). Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles for cell labeling. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *11*(5), 3749-3756.

[27] Chen, Y., & Hou, S. (2023). Recent progress in the effect of magnetic iron oxide nanoparticles on cells and extracellular vesicles. *Cell Death Discovery*, *9*(1), 195.

[28] Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., & Avci-Adali, M. (2018). Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *6*, 99.

[29] Janko, C., Zaloga, J., Pöttler, M., Dürr, S., Eberbeck, D., Tietze, R., Lyer, S., & Alexiou, C. (2017). Strategies to optimize the biocompatibility of iron oxide nanoparticles–"SPIONs safe by design". *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *431*, 281-284.

[30] Malehmir, S., Esmaili, M. A., Mahabady, M. K., Sobhani-Nasab, A., Atapour, A., Ganjali, M. R., Ghasemi, A., & Hasan-Abad, A. M. (2023). A review: hemocompatibility of magnetic nanoparticles and their regenerative medicine, cancer therapy, drug delivery, and bioimaging applications. *Frontiers in Chemistry*, *11*.

[31] Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W. S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and technology of advanced materials*, *16*(2), 023501.

[32] Estévez, M., Cicuéndez, M., Crespo, J., Serrano-López, J., Colilla, M., Fernández-Acevedo, C., Oroz-Mateo, T., Rada-Leza, A., González, B., Izquierdo-Barba, I., & Vallet-

Regí, M. (2023). Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: In vitro biological evaluation for biomedical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, *650*, 560-572.

Journal of Colloid and Interface Science 650 (2023) 560–572

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid And Interface Science

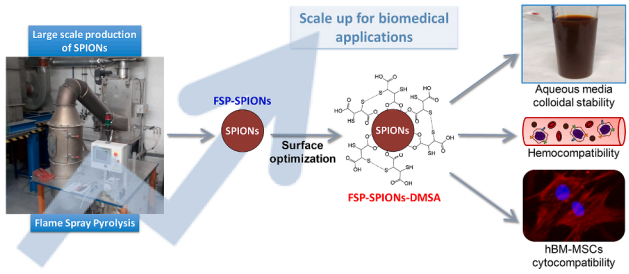
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: *In vitro* biological evaluation for biomedical applications

Manuel Estévez [a,1], Mónica Cicuéndez [b,1], Julián Crespo [c], Juana Serrano-López [d], Montserrat Colilla [a,e], Claudio Fernández-Acevedo [f], Tamara Oroz-Mateo [f], Amaia Rada-Leza [f], Blanca González [a,e,*], Isabel Izquierdo-Barba [a,e,*], María Vallet-Regí [a,e,*]

[a] *Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain*
[b] *Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain*
[c] *Tecnología Navarra de Nanoproductos S.L. (TECNAN), área industrial PERGUITA, C/A, N° 1, 31210 Los Arcos (Navarra), Spain*
[d] *Experimental Hematology Lab, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid 28040, Spain*
[e] *Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain*
[f] *Centro Tecnológico ÚLurederra, área industrial PERGUITA, C/A, N° 1, 31210 Los Arcos (Navarra), Spain*

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
Flame spray pyrolysis
Large-scale production
Biocompatibility
Hemocompatibility

ABSTRACT

Despite the large number of synthesis methodologies described for superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), the search for their large-scale production for their widespread use in biomedical applications remains a mayor challenge. Flame Spray Pyrolysis (FSP) could be the solution to solve this limitation, since it allows the fabrication of metal oxide nanoparticles with high production yield and low manufacture costs. However, to our knowledge, to date such fabrication method has not been upgraded for biomedical purposes. Herein, SPIONs

* Corresponding authors at: Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail addresses: manestev@ucm.es (M. Estévez), mcicuendez@ucm.es (M. Cicuéndez), julian.crespo@tecnan-nanomat.es (J. Crespo), juana.serrano@quironsalud.es (J. Serrano-López), mcolilla@ucm.es (M. Colilla), claudio.fernandez@lurederra.es (C. Fernández-Acevedo), tamara.oroz@lurederra.es (T. Oroz-Mateo), amaia.rada@lurederra.es (A. Rada-Leza), blancaortiz@ucm.es (B. González), ibarba@ucm.es (I. Izquierdo-Barba), vallet@ucm.es (M. Vallet-Regí).

[1] Both authors contributed equally to the manuscript.

https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.07.009
Received 29 March 2023; Received in revised form 21 June 2023; Accepted 3 July 2023
Available online 4 July 2023
0021-9797/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Human mesenchymal stem cells
Biomedical applications

have been fabricated by FSP and their surface has been treated to be subsequently coated with dimercaptosuccinic acid (DMSA) to enhance their colloidal stability in aqueous media. The final material presents high quality in terms of nanoparticle size, homogeneous size distribution, long-term colloidal stability and magnetic properties. A thorough *in vitro* validation has been performed with peripheral blood cells and mesenchymal stem cells (hBM-MSCs). Specifically, hemocompatibility studies show that these functionalized FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles do not cause platelet aggregation or impair basal monocyte function. Moreover, *in vitro* biocompatibility assays show a dose-dependent cellular uptake while maintaining high cell viability values and cell cycle progression without causing cellular oxidative stress. Taken together, the results suggest that the FSP-SPIONs-DMSA optimized in this work could be a worthy alternative with the benefit of a large-scale production aimed at industrialization for biomedical applications.

1. Introduction

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have been extensively studied and used for medical and biotechnological applications, such as magnetic resonance imaging, tissue repair, cell separation and detection, magnetic hyperthermia, and drug delivery due to their small size, excellent magnetic properties, biocompatibility, and low toxicity [1–9]. Such applications mainly require a precise size and chemical control, good stability in physiological environments, and defined surface properties according to their functionality [7,10,11]. To date, numerous efforts are focusing on the development and optimization of different lines of research to produce SPIONs employing wet chemical routes such as co-precipitation, thermal decomposition in non-aqueous liquids and microemulsions, sol–gel, among other techniques [12–15], but also particle formation in the gas phase such as thermal decomposition in hot-wall reactors. These technologies allow to better control the particle size, shape, and polydispersity; to obtain populations of small nanoparticles with a narrow size distribution and desired crystalline properties to enhance their magnetic behavior. However, despite the great projection of these technologies in clinical applications, one of the main limitations is the need for large production runs for their industrialization [16,17]. Among the different existing methods to synthesize SPIONs, a bottom-up nanomanufacturing technique with proven scalability and reproducibility [18,19] such as Flame Spray Pyrolysis (FSP) could be the solution to overcome this limitation. FSP technology permits the continuous manufacture of metal oxide nanoparticles with high production yields and low production costs at high production rates in a simple and reproducible one-step process on a large scale (up to 10 Kg/h). Furthermore, current studies assess the overall environmental impact of novel optimized FSP technologies to evaluate its potential for pharmaceutical and biotechnological applications. In addition, the versatility of FSP enables the production of metal oxide nanoparticles, such as mixed and doped oxides, complex nanomaterials such as core–shell structures [18–23]. In more detail, FSP technology is based on the preparation of a liquid precursor mixture constituted by organometallic precursors and organic solvents, which is atomized in a nozzle just prior to passing through a flame. In this process all organic matter is burned, and particle nucleation and growth occurs. Because this period is very short, the particles remain in the nanometric range. In addition, since the process occurs at high temperature (2000 °C), obtained nanoparticles present a great purity, low agglomeration rate, high thermal resistance, and high specific surface area. Furthermore, the variation of key process parameters (composition of precursor mixture, concentrations, oxidative conditions of the flame, feeding flow rate, etc.) allow to exert a high control of particle size, shape and crystalline phase [24] of the nanoparticles, key aspects for their clinical use [25]. Regarding the production of SPIONs by FSP, such technology has been also employed to produce superparamagnetic nanomaterials [26–31]. It is worth mentioning that the oxidative conditions of the flame result in obtaining metals in their highest oxidation state and maghemite materials are obtained. Nevertheless, Pratsinis *et al.* [32] have demonstrated the versatility of the technology by being able to modify key process parameters to control iron oxidation and to produce different batches of maghemite, magnetite and even wustite nanoparticles. In this sense, although FSP technology presents great advantages for the production on an industrial scale of this type of superparamagnetic nanomaterials, to date only small production processes have been carried out at laboratory research scale and only Teleki *et al.* in 2022 [33] have been involved in the production of undoped and doped SPIONs using FSP technology [34,35] to induce amorphization of a poorly aqueous soluble crystalline drug (celecoxib) in tablets for oral administration.

In this work, we demonstrate the suitability of large-scale production by FSP technique of SPIONs appropriate for biomedical applications in terms of narrow size distribution, superparamagnetic properties, colloidal stability, hemocompatibility and cytotoxicity. Thus, in a first stage, the key parameters of FSP to produce small nanoparticles of about 15 nm with high homogeneous size distribution were optimized since this is one of the main challenges for the implementation of the FSP nanoparticle production method in the pharmaceutical industry. Then, the obtained FSP-SPIONs were further processed via an acid treatment to clean and activate their surface, followed by a coating with dimercaptosuccinic acid (DMSA) to obtain stable aqueous colloidal solutions. The surface optimization demonstrated in this work specifically with SPIONs becomes the starting point for other more complex compositions of nanoparticles prepared also by FSP technology. Hence, properties such as morphology, size, composition, magnetism, colloidal stability and *in vitro* validation with peripheral blood cells and human bone marrow-mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) were evaluated, endorsing the future use of these nanoparticles for biomedical applications.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Iron (III) acetylacetonate 97%, iron (III) naphtenate < 99.9%, ethylhexanoic acid 99%, xylene 78%, dimercaptosuccinic acid (DMSA) 98% and 12 kDa cellulose dialysis bags were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). *Tert*-butyl acetate 99% was purchased from Cymit Química S.L. (Barcelona, Spain). $Fe(NO_3)_3{\cdot}9H_2O$ 98% and absolute ethanol were purchased from PanReac (Barcelona, Spain). All other chemicals (KOH, NaOH, HNO_3 65%, HCl 37%, etc.) were of the highest quality commercially available and were used as received. Milli-Q water (resistivity 18.2 MΩ·cm at 25 °C) was used in all experiments.

Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and trypsin/EDTA 0.25% were purchased from Lonza and Gibco, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA. NH_4Cl to make erythrocytes lysis buffer was obtained from Sigma-Aldrich. Mesenchymal stem cell basal medium (MSCBM), mesenchymal cell growth supplement (MCGS), L-glutamine 200 mM and gentamicin sulphate and amphotericin-B (GA-1000) were purchased from Lonza, Bioscience (Switzerland). Propidium iodide 1.0 mg/mL solution in water was purchased from life technologies molecular probes (Thermo Fisher Scientific). 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was purchased from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). RNAse was purchased by molecular biology (Thermo Scientific GeneJET).

2.2. Characterization

The analytical methods used to characterize the synthesized materials were as follows: nitrogen sorption, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES), powder X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA) and chemical microanalysis, vibrating sample magnetometry, electrophoretic mobility measurements to calculate the values of zeta-potential (ζ-potential), dynamic light scattering (DLS). The equipment and conditions used are described in the Supporting Information.

2.3. Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles have been synthesized by TECNAN and Lurederra Technological Centre employing the one-step Liquid Flame Spray Pyrolysis (FSP) technology. The liquid precursor mixture consists of a two-precursor system, based on two solutions that were prepared by dissolving, on the one hand, iron (III) acetylacetonate in xylene and, on the other hand, iron (III) naphthenate in 1:2 mixture of xylene and 2-ethylhexanoic acid, to obtain a final iron concentration of 0.6 and 0.5 M, respectively. Once prepared, both solutions were mixed under vigorous stirring. If needed, thinners such as *tert*-butyl-acetate were used as additives for an optimum droplet atomization in the FSP nozzle. The precursor mixture was employed to feed the equipment with a feeding flow rate 15–25 mL/min. Oxygen was selected as dispersion gas and set at 30–40 mL/min. The ratio of methane to oxygen gas flow rate was 3–6 L/h to form a self-maintaining main core flame. Finally, the produced nanoparticles were collected in a specific sleeve filter system.

SPIONs with a narrow size distribution were produced using the same FSP technique under the following conditions: the solutions for the precursor mixture were 0.35 M iron (III) acetylacetonate in xylene and 0.23 M iron (III) naphthenate in xylene/2-ethylhexanoic acid (1:2); precursor feeding flow rate was established in the range of 10–30 mL/min; O_2 flow was set at 20–30 mL/min; the ratio of methane to oxygen gas flow rate was 4–8 L/h. The resulting sample was denoted as FSP-SPIONs. Table S1 summarizes the FSP process parameters used in both synthesis (see Supporting Information).

2.4. Surface activation and DMSA coating of as-synthetized SPIONs

2.4.1. Surface activation

75 mL of 2 M HNO_3 were added to 1 g of as-synthetized SPIONs in a 250 mL one-neck round bottom flask equipped with mechanical stirring (stirrer shaft) and the mixture was vigorously stirred for 15 min. The nitric acid solution was then removed by magnetic decantation. Subsequently, 20 mL of 1 M $Fe(NO_3)_3$ and 33 mL of Milli-Q water were added to the nanoparticles and the mixture was refluxed under stirring for 30 min. The suspension was then cooled down to room temperature. Then, the supernatant was replaced with 75 mL of 2 M HNO_3 by magnetic decantation and stirred for 15 min. The resulting product was washed three times with water and dried in the oven at 70 °C. The resulting nanoparticles were denoted as FSP-SPIONs*.

2.4.2. DMSA coating

A solution of 14.7 mg of DMSA 98% in 10 mL of distilled water was added to a suspension of the surface activated SPIONs in 20 mL of distilled water at pH 3, to achieve a final iron concentration of 3 mg/mL. The mixture was gently shaken and the pH was adjusted to 11 with KOH. Then, the sample was sonicated for 20 min and dialyzed using a 12 kDa dialysis membrane against 5 L of distilled water for 48 h changing the water twice a day. Finally, the pH was adjusted to 7 and filtered through 0.22 μm, affording FSP-SPIONs-DMSA.

2.5. In vitro hemocompatibility tests

Peripheral blood (PB) samples were collected from 3 healthy volunteers (sodium citrate 3.8% tubes, 0.129 M, BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and processed within 3 h post extraction. SPIONs were sonicated for 20 min and diluted to the final concentration in PBS pH 7.4.

2.5.1. Monocyte activation assay

PB samples were incubated with SPIONs at 50 and 100 μg/mL at 37 °C for 2 h. NH_4Cl was then added into each tube and incubated for 20 min at 37 °C, followed by 5 min centrifugation at 1500 rpm and 2x PBS wash. Cells in the pellet were resuspended in 100 μL of PBS and stained with 5 μL of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD16 (clon 3G8), phycoerythrin dye-(PE) conjugated anti-CD14 (clon M5E2) and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD11B (clon ICRF44) (BD, Biosciences) for 15 min. Cells were analyzed by Flow Cytometry in FACSCanto II cytometer equipped with FACSDIVA™ software (BD, Biosciences) for further multiparameter analysis of the data.

2.5.2. Platelet aggregation assay

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 200 g for 10 min at room temperature. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation for 15 min at 2500 g at room temperature. Platelets aggregation was measured using a TA-4 V/8V Aggregometer (Stago, Saint-Ouen-l'Aumône, France) linked to Thrombosoft 1.6. software. First, a volume of 270 μL of PPP was used to calibrate the aggregometer channels. Second, 270 μL of PRP were incubated for 3 min in aggregometer channels and then measured for calibration, following industry recommendations with minor modifications. After this process, 30 μL of SPIONs at 50 and 100 μg/mL were added in the different PRP-containing cuvettes and incubated for 20 min at 37 °C. Positive controls were performed by adding of 30 μL of 5 μM epinephrine (*EPI*), (25 μM, Stago, Asnières sur Seine, France) and 50 μM thrombin-like peptides (TRAP), (50 μM, Stago) as soluble agonists for platelet activation. The effect of the different conditions was recorded in real-time to study the ability of NPs to stimulate platelet aggregation.

2.6. In vitro cytocompatibility tests

Human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) (Lonza, donor 38157, passage 5) were cultured in MSCBM supplemented with MCGS, GA-1000 and L-glutamine. The cells were washed with PBS and then trypsinized with 3 mL of trypsin/EDTA 0.25%. Cells were then centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The resulting pellet was suspended in 1 mL of culture medium, measured for cell number, and seeded into 24-well plates (1×10^5 cells/well) with a final volume of 1 mL of medium per well. The cells were then incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 24 h. Afterwards, SPIONs (25 and 50 μg/mL FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles) were added and kept in contact with the cells for 24 h. After this, the cells were washed with 1 × PBS, harvested with trypsin/EDTA 0.25% and processed for flow cytometry analysis. As a control, cells were cultured at the same cell density but in the absence of SPIONs. Moreover, the authors note that the doses studied (25 and 50 μg/mL) are within the range usually tested for nanoparticles with diverse biological applications [36].

2.6.1. Evaluation of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles uptake by hBM-MSCs through flow cytometry and confocal microscopy

Flow cytometry. The flow cytometer is an excellent instrument for investigations of cellular and molecular biochemistry. Most beneficial is the high-speed analysis of each cell, e.g., tens of thousands of cells can be analyzed in a second. In flow cytometry, light scattering at 90° dispersion angle is called side-scatter light (SSC) and reflects the intracellular complexity. Specifically, the SSC intensity is proportional to the complexity of intracellular structures such as the cellular cytoplasm,

mitochondria, and pinocytic vesicles, among other [37]. For example, when apoptotic cell death is induced, which is one pattern of cell death, the intensity of SSC increases significantly because the cells shrink and intracellular density rises [38]. Thus, in our study, the incorporation of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles by hBM-MSCs after 24 h of treatment was evaluated by flow cytometry analyzing the SSC intensity because it is a simple method to evaluate the uptake of nanomaterials by mammalian cells when nanomaterials are not labelled with any fluorochrome [39,40]. Flow cytometric quantification of SSC also underrepresents the particle amount because aggregates of detached particle were gated out and apoptotic and necrotic cells, which may contain large amounts of particles, were excluded from SSC determination to avoid including the increased SSC of dying cells. Data acquisition and analysis conditions were established with negative and positive controls using the CellQuest Program of Becton Dickinson, and these conditions were maintained in all the experiments. Each experiment was performed in triplicate, and single representative experiments were displayed. For statistical significance, at least 10,000 cells were analyzed by flow cytometry in each sample. A FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer was used (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Confocal microscopy. Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in PBS for 10 min, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) for 5 min. The samples were then washed with PBS and preincubated with PBS containing 1% BSA (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) for 30 min to prevent non-specific binding. Samples were incubated for 20 min with Phalloidin-Atto 550 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) 1:40 (100 μL) to stain the F-actin filaments. Samples were then washed with PBS and the cell nuclei were stained with 4′,6-diamidine-2′-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) 1:1000 for 5 min. The samples were examined in an OLYMPUS FV1200 Confocal Laser Scanning Microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan). The fluorescence Phalloidin-Atto was excited at 550 nm and the emitted fluorescence was measured at 565–675 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

2.6.2. Cell viability

Cell viability was measured by adding 0.005% (wt/vol) propidium iodide (PI) in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) into the samples to stain the dead cells. The PI exclusion indicates the plasma membrane integrity. PI fluorescence was detected in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm.

2.6.3. Intracellular reactive oxygen species (ROS) content

After exposure to the FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles for 24 h, hBM-MSCs were incubated with 10 μM of 2′,7′-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCF-H2-DA, Serva, Heidelberg, Germany) during 45 min at 37 °C. The non-fluorescent DCF-H2-DA is converted into 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF) after hydrolysis by cellular esterases and oxidation by ROS. When DCF is excited at 488 nm emission wavelengths, green fluorescence is emitted that can be detected at 525 nm. DCF fluorescence was measured in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm.

2.6.4. Cell-cycle analysis

Cells in 0.5 mL of PBS were mixed with 4.5 mL of ethanol 70% and maintained at 4 °C overnight. The cell suspensions were then centrifuged for 10 min at 1500 rpm and resuspended in 0.5 mL of RNAse solution containing 0.1% Triton X-100, 20 μg/mL of IP and 0.2 mg/mL of RNAse (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 30 min of incubation at 37 °C, PI fluorescence was detected in a FACScan Becton Dickinson flow cytometer with a 585/42 filter, exciting the sample at 488 nm. The CellQuest Program from Becton Dickinson was used to calculate the percentage of cells in each cycle phase: G0/G1 (growth), S (DNA synthesis) and G2/M (growth and mitosis).

2.6.5. Gene expression PCR

hBM-MSCs were seeded in 6-well plates and incubated for 4 and 7 days (n = 3) in osteogenic differentiation medium. Total RNA was isolated from the cells using a standard procedure (Trizol, Invitrogen, Groningen, The Netherlands), and cDNA synthesis was performed using a high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Gene expression was analyzed by real-time PCR using a QuantStudio 5 Real-Time PCR System. Unlabelled human-specific primers for Runx2 and ALP, and TaqMan™ MGB Probe (Applied Biosystems) were used to perform qRT-PCR assay. The mRNA copy numbers were calculated for each sample by using the cycle threshold (Ct) value. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) rRNA (a housekeeping gene) was amplified in parallel with tested genes. The relative gene expression was represented as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{target gene}} - \Delta Ct_{GAPDH}$.

2.7. Statistical analysis

Data were expressed as means ± standard deviations of a representative of three experiments carried out in triplicate. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 22. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA). Scheffé test was used for post-hoc evaluations of differences among groups. In all the statistical evaluations, $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were synthesized by TECNAN and Lurederra Technological Centre employing the one-step Liquid Flame Spray Pyrolysis (FSP) technology (Fig. 1A). To do so, an FSP pilot plant, developed by themselves, with a production capacity of 100 g/h was used and optimized to produce FSP-SPIONs (Fig. 1B). More in detail, a liquid precursor mixture constituted by different iron coordination complexes, featuring organic ligands, and organic solvents are introduced into a high temperature flame through an atomizer. This precursor mixture must be homogeneous and stable, being necessary to pay special attention to the miscibility of the solvents and solubility of the iron precursors, avoiding possible precipitations or secondary reactions that may affect the SPION by varying the iron concentration, viscosity or heat capacity, that vary the characteristics of the final product. During the production process, in addition to the parameters related to the precursor mixture, the precursor feed rate, the flow rate of the dispersion gas and the spraying conditions, including pressure, etc. also have a direct consequence on the final properties of the produced nanoparticles. So the main difficulty is to find the balance between an adequate production speed and obtaining a population with a narrow size distribution and a high specific surface area [18–20,24]. These characteristics must be optimized when the nanoparticles are aimed at biomedical applications [6].

The first attempt to obtain FSP-SPIONs was made by using a liquid precursor mixture composed of iron (III) acetylacetonate in xylene and iron (III) naphthenate in a mixture 1:2 of xylene and 2-ethylhexanoic acid, with iron concentration of 0.6 and 0.5 M, respectively. The feeding flow rate of the precursor mixture into the equipment was 15–25 mL/min using O_2 as dispersion gas with a flow set at 30–40 L/min and a methane to oxygen gas flow rate of 3–6 L/h to form a self-maintaining main core flame. These operating conditions led to a sample of SPIONs exhibiting heterogeneous particle sizes ranging from *ca.* 5 to 35 nm, as shown in the TEM images (see Fig. S1 in Supporting Information).

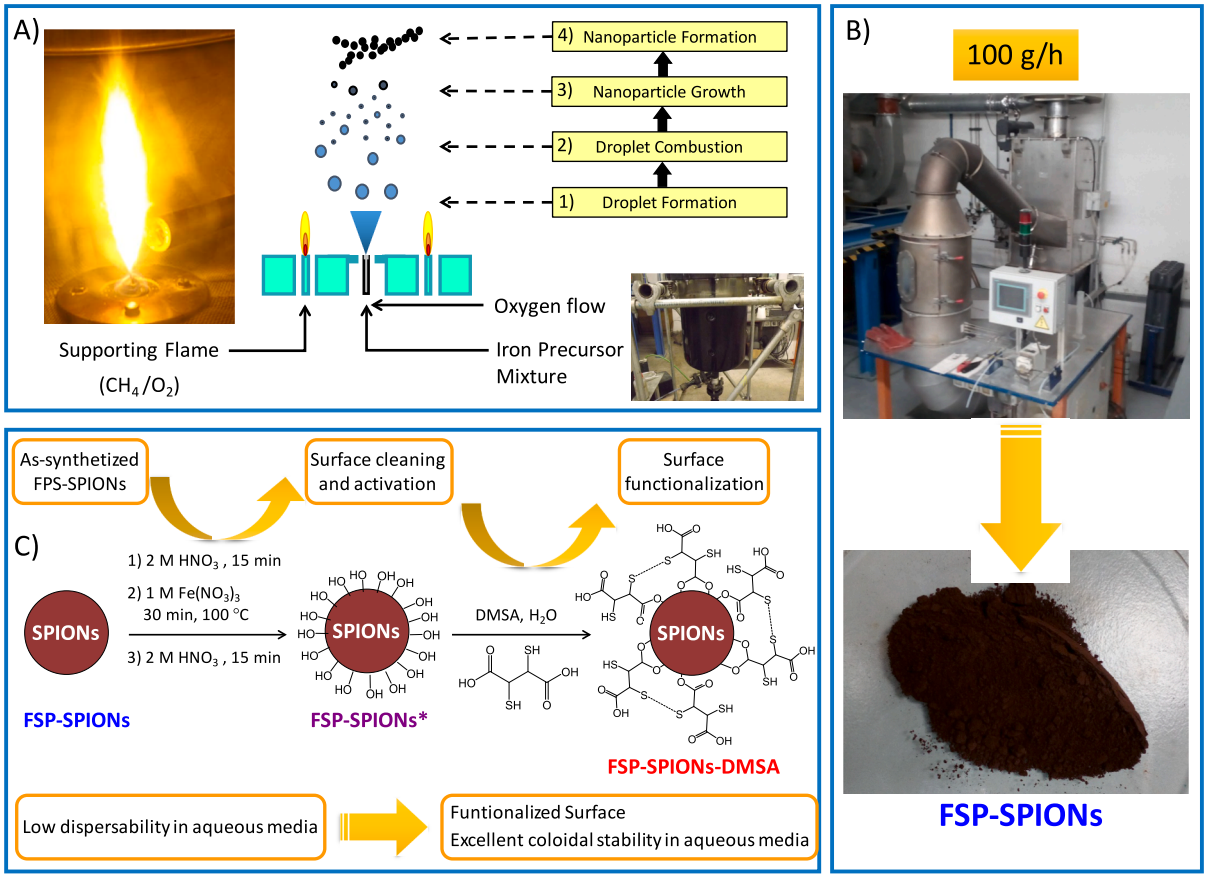


Fig. 1. A) Scheme of synthesis of SPIONs employing flame spray pyrolysis technology. B) Photography of the pilot FSP plant at the TECNAN and Lurederra Technological Centre facilities for the synthesis of FSP-SPIONs. C) Surface activation of as-synthetized FSP-SPIONs and subsequent DMSA coating.

In order to ensure the production of a single population of small nanoparticles while avoiding the growth of larger nanoparticles certain parameters were adjusted (see section 2.3). An exhaustive control was exerted in the production process with the aim to ensure suitable flame properties as temperature, morphology, size and/or oxidative conditions. More specifically, with the aim to reduce the particle contact in the flame that leads to agglomeration and nanoparticle size growth, the iron content in both initial precursor mixtures was reduced to 0.35 and 0.23 M, respectively. Also, with the aim to reduce the residence time of the mixture inside the flame, a wider feeding flow rate (10–30 mL/min) was studied, revealing that the use of smaller fluxes results in smaller flames, therefore implying smaller areas for particle growth and/or agglomeration, and favoring the production of smaller nanoparticles. Additionally, the oxygen dispersion gas flow was reduced to 20–30 L/min in order to exert an extra control in the reaction through a more stable temperature of the flame, avoiding potential cooling of this parameter and potential temperature ramps. Complementary to this adjustment, support flame gases flow was increased using a higher methane and oxygen flow (4–8 L/h) to maintain more stable flame morphology of the flame more stable, as well as the conditions of the specific zone where the nanoparticles are generated. TEM images of the obtained sample show FSP-SPIONs exhibiting pseudo-spherical nanoparticle morphologies with sizes between *ca.* 10 and 20 nm. The statistical treatment of size diameters reveals a single population being 12.5 nm the most abundant size (Fig. S2).

The N_2 sorption analysis of samples was used to estimate the particle size of FSP-SPIONs by using Equation (1) [41], where d is the particle diameter in nm; *SSA* the specific surface area in m^2/g and ρ the density (4.9 g/mL). From the N_2 adsorption–desorption analysis, a specific surface area of 75 m^2/g and 92 m^2/g is calculated for both samples, respectively, revealing an average particle size of approximately 10–18 nm for the sample obtained with optimized parameters, which completely correlates with particle size observed in the TEM images.

$$d = \frac{6000}{SSA \times \rho} \quad (1)$$

Therefore, the optimized operating conditions produced SPIONs that were suitable in size and homogeneity and hence selected for the further bioanalytical characterization. These nanoparticles will be denoted as FSP-SPIONs onwards in the manuscript.

3.2. *Surface modification of as-synthetized FSP-SPIONs*

Maintaining the stability of SPIONs over time in aqueous media without agglomeration or precipitation is a crucial requirement with regard to biomedical applications. Aiming at translation into the clinic there is a great advantage in the large-scale production of SPIONs by FSP, although the aqueous stability of these superparamagnetic nanoparticles is an important issue to be resolved. In this work, the produced FSP-SPIONs were further processed by exploiting a treatment based on nitric acid and iron (III) nitrate to activate their surface, followed by a DMSA coating to obtain stable aqueous colloidal solutions (Fig. 1C). Magnetite nanoparticles obtained by coprecipitation methods are usually subjected to a surface treatment and stabilization procedure to improve their colloidal stability in water. In a first stage, dispersion in nitric acid creates positive surface charges that provide sufficient electrostatic repulsion between the particles since the surface hydroxyl groups are protonated in the acidic medium. Subsequently, to prevent the gradual dissolution of the nanoparticles, oxidation to maghemite by iron (III) nitrate is performed to obtain the aqueous ferrofluids [42–44].

As well, iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis were obtained with a significant enhancement of colloidal properties through an optimized acid treatment. This chemical protocol is consistent with a reduction of nanoparticle surface disorder induced by a dissolution–recrystallization mechanism [45]. On the other hand, the surface modification of iron oxide nanoparticles through a ligand substitution process with *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) is usually performed with very good results to transfer hydrophobic SPIONs obtained through thermal decompositions methods to water. In these cases, DMSA coating yields hydrophilic nanoparticles very stable in water dispersions that preserve their superparamagnetic properties [46]. Furthermore, DMSA-coated SPIONs were assessed in terms of biocompatibility with human mesenchymal stem cells and studied in numerous biomedical applications confirming promising clinical use [47–52]. To the best of our knowledge, this combination of treatments has not been further applied to SPIONs obtained at a large scale by the FSP technique to increase their colloidal stability in aqueous media and therefore enable their use for biomedical applications. Before undertaking the bioanalytical study of our FSP-SPIONS-DMSA nanoparticles, a comprehensive physicochemical characterization of the as-synthetized and the DMSA-coated FSP-SPIONs was performed and it is detailed in the following paragraphs.

The XRD patterns of both FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles (Fig. 2A, left graph) show six maxima that are indexed as (220), (311), (400), (422), (511) and (440) of a cubic spinel structure. The lattice parameters calculated from the (311) reflection were 8.39 Å for the as-synthetized nanoparticles and 8.34 Å for the acid nitric treated and subsequently functionalized with DMSA nanoparticles. These values lie between that of magnetite (Fe_3O_4, $a = 8.40$ Å) and maghemite (γ-Fe_2O_3, $a = 8.35$ Å), according to JCPDS cards numbers 19–629 and 39–1346, respectively. These results point to our iron oxide nanoparticles consisting in a mixture of both phases. Therefore, to estimate the relative amount of each phase, we applied the peak deconvolution routine for (511) reflection (Fig. 2A, right), as described by Kim *et al.* [53]. The results revealed that as-synthetized FSP-SPIONs contained 84 wt% of Fe_3O_4 and 16 wt% of γ-Fe_2O_3, therefore being magnetite the most abundant phase. On the other hand, FSP-SPIONs-DMSA sample corresponds to a mixture consisting in 17 wt% of Fe_3O_4 and 83 wt% of γ-Fe_2O_3, which necessarily implies that partial oxidation of magnetite to maghemite has taken place during the nitric acid treatment previous to the DMSA coating.

The magnetic properties of iron oxide nanoparticles were investigated by vibrating sample magnetometry. The magnetization curves normalized to the mass of iron are displayed in Fig. 2B, showing similar shape and coercivity for both FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA. The as-synthetized FSP-SPIONs exhibit superparamagnetic properties, which are preserved after surface activation and functionalization with DMSA. This characteristic superparamagnetic behavior is indicated by coercivity values lower than 3 mT registered in both cases, which can be considered as absence of a hysteresis loop on the magnetization curve, *i.e.*, coercivity and remanence close to zero. Moreover, the initial slopes show a rapid approach to saturation, suggesting a high magnetic susceptibility.

The saturation magnetization values (M) at 5 T resulted to be consistent, being 97 and 90 emu/g_{Fe} for the as-synthetized and the DMSA-coated nanoparticles, respectively. The value for as-synthetized FSP-SPIONs is close to the value for bulk magnetite (~100 emu/g_{Fe}) [54], while the value for FSP-SPIONs-DMSA is somehow lower. This decrease in the saturation magnetization to 90 emu/g_{Fe} can be attributed to the partial oxidation of magnetite to maghemite that takes place during the surface activation treatment, as also evidenced in the crystallographic analysis by XRD (*vide supra*). Therefore, this value is still higher than that of bulk maghemite (74–80 emu/g_{Fe}) [55,56], which is consistent with the presence of the maghemite/magnetite mixture in the FSP-SPIONs-DMSA composition identified by XRD.

The efficient DMSA coating of the SPIONs was confirmed by FTIR spectroscopy, TGA, elemental chemical analysis and DLS measurements. FTIR spectra of FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA (Fig. 2C) display a broad band in the 3000–3500 cm^{-1} region, which can be attributed to the overlapping of the O—H stretching bands of hydrogen-bonded water molecules (H—O—H) and surface FeO-H groups. The bands at *ca.* 533 and 400 cm^{-1} correspond to the two fundamental modes for the spinel structure of magnetite [57]. The many extra signals at 694, 623, 582 and

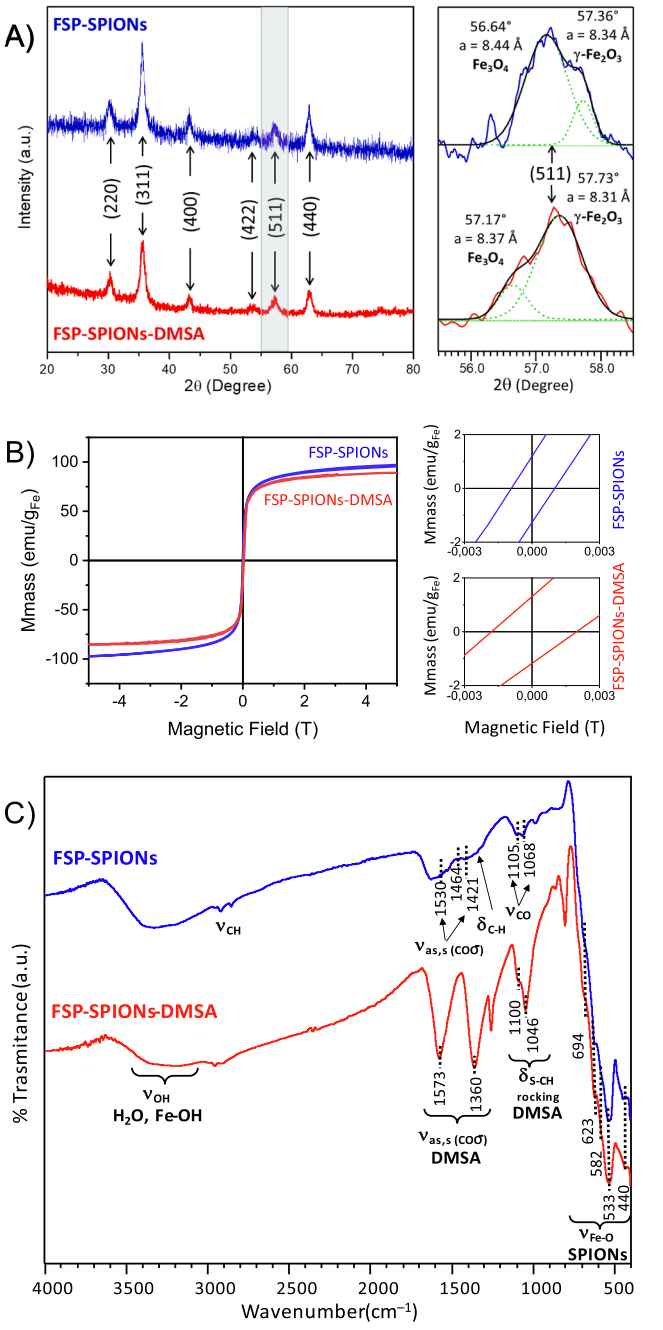


Fig. 2. A) Powder XRD patterns of FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA (left). Smoothed step scan patterns of (511) reflection for both FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA samples (right). The maximum corresponding to (511) reflection for each sample is deconvolutioned into magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (γ-Fe_2O_3) and the lattice parameters, *a*, are also displayed. B) Magnetization curves of FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA samples measured by vibrating sample magnetometry. The magnification of the magnetization curves near the origin are shown in the right side. C) FTIR spectra of as-synthesized (FSP-SPIONs) and surface-activated plus DMSA-coated (FSP-SPIONs-DMSA) nanoparticles.

440 cm^{-1}, were explained by assuming a tetragonal symmetry derived from the ordering of the vacancies produced in the partial oxidation of magnetite to maghemite. This is in good agreement with XRD studies, which revealed the coexistence of both crystalline phases in pristine and DMSA-coated FSP-SPIONs. FTIR spectrum of as-prepared FSP-SPIONs exhibits vibration bands attributed to asymmetric and symmetric C—H stretching vibrations (2960, 2924, 2881 and 2855 cm^{-1}). In the 1550 to 1000 cm^{-1} range, the measured absorption bands can be attributed to the asymmetric and symmetric O–C═O stretches (1530 and 1421 cm^{-1}) and asymmetric and symmetric deformation of C—H groups (1464, 1358 and 1311 cm^{-1}). The bands at 1105 and 1068 cm^{-1} were assigned to C—O stretching vibrations. All these bands exhibit rather similar patterns to those of FTIR spectra reported by Alkan *et al.*, [58] suggesting that they probably arise from remaining acetate and carboxylate groups from the precursor solutions used in the flame spray synthesis. The FTIR spectrum of FSP-SPIONs-DMSA presents additional broad bands at 1573 and 1360 cm^{-1} attributable to asymmetric and symmetric stretching vibrations of coordinated carboxylate groups of DMSA, respectively. The presence of such bands suggests that DMSA molecules were coordinating to iron ions located in the surface of SPIONs via $–COO^-$ groups. According to reported studies [52], the large splitting between the $–COO^-$ bands ($\Delta\nu$ = 213 cm^{-1}) points to the carboxylate groups bounded to SPIONs through a monodentate interaction, where one iron ion is bound to one carboxylic oxygen atom. Nonetheless, the possible presence of bridging bidentate structures should not be overruled (see Fig. 2C). Besides, broad absorption bands appeared at 1100 and 1046 cm^{-1} (S–CH bond rocking vibrations) due to DMSA. The absence of sharp peaks in the 2500–2600 cm^{-1} region in the spectrum of the DMSA coated SPIONs, which could be originated from the vibrations of the thiol groups (S—H) from DMSA (see Fig. S3 in Supporting Information), could be explained due to partial oxidation of the thiol groups into disulfide (S—S) during the ligand exchange process, as previously reported by Fauconnier *et al.* [59] However, the disulfide vibration bands at 500–540 cm^{-1} could not be appreciated in the FTIR analysis due to the overlapping with Fe-O bands.

The weight loss and elemental composition of as-synthetized, surface activated and DMSA-functionalized FSP-SPIONs were analyzed by TGA and elemental chemical analysis (Table 1). A slight decrease in weight loss as well as in the percentage of C in sample FSP-SPIONs* was observed comparing FSP-SPIONs with surface activated FSP-SPIONs*. It may be attributed to the presence of carbon residues and organic compounds on the surface of the nanoparticles, as evidenced by FTIR. These residues, from the synthetic FSP procedure, would be partially removed during the treatment with nitric acid and ferric nitrate.

Comparing FSP-SPIONs-DMSA with both the preceding sample (FSP-SPIONs*) and the as-synthetized FSP-SPIONs, a marked increase in the percentage of weight loss of *ca.* 7%, as well as in the percentage of C, *ca.* 3.5%, was observed. This increase, together with the presence of S, *ca.* 3%, in FSP-SPIONs-DMSA, is attributed to the organic matter gained after DMSA coating.

After confirming the successful DMSA coating of the nanoparticles, FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA samples were analyzed by TEM, finding no significant differences in either the morphology or size of the nanoparticles (Fig. 3A and 3B, respectively).

The DLS measurements of the resulting aqueous suspensions displayed monomodal hydrodynamic size distributions centered at 61.4 nm for FSP-SPIONs and at 30.9 nm for FSP-SPIONs-DMSA (Fig. 3C and 3D, respectively). Since the size of the inorganic nanoparticle is not affected after functionalization, according to TEM images, this shift in the maximum of the hydrodynamic size distribution indicates that coating of SPIONs with DMSA causes a decrease in the size of the nanoparticle aggregates, reflecting a marked improvement of dispersion in water. Indeed, a change in the appearance of the aqueous suspensions before and after coating was observed (Fig. 3E and 3F respectively) reflecting the enhanced colloidal stability after DMSA coating, since FSP-SPIONs-DMSA in aqueous media showed brighter appearance and greater stability over time than FSP-SPIONs. Moreover, ζ-potential values measured in water shift to more negative after DMSA coating, from − 15.8 mV for FSP-SPIONs to − 30.9 mV for FSP-SPIONs-DMSA (Fig. S4). The more negative ζ-potential value in the DMSA-coated nanoparticles compared to pristine ones indicates the presence of the carboxylate groups at the surface of the nanoparticles which are undergoing their acid-base equilibrium in the aqueous medium ($–COOH + H_2O \rightleftharpoons –COO^- + H_3O^+$). All these facts suggest that the colloidal stability in water of the FSP-SPIONs-DMSA can be ascribed to the electrostatic repulsion among $–COO^-$ groups, in addition to the steric stabilization provided by the DMSA molecules themselves on the surface of the nanoparticles.

Moreover, the visual appearance of water suspensions of unmodified FSP-SPIONs and DMSA-functionalized FSP-SPIONs and their evolution with time, at short times (t = 0, 1 and 24 h) has been compared. The as-synthetized unmodified FSP-SPIONs start to sediment within an hour after dispersion in water, and have completely settled by 24 h. However, the DMSA-functionalized FSP-SPIONs remain in colloidal suspension at the same times (Fig. S5 and Video V1 in supporting Information). The hydrodynamic size distribution obtained by dynamic light scattering of a sample of FSP-SPIONs-DMSA which has been kept in aqueous suspension eleven months after synthesis shows that the SPIONs do not undergo aggregation since a narrow single-modal distribution, in the range from about 20 to 80 nm, is preserved (Fig. S6). Moreover, the maximum of the hydrodynamic size distribution barely shifts from 30.9 nm for the newly synthesized sample to 32.8 nm for the long-term sample in aqueous suspension. Both facts indicate long-term stability of FSP-SPIONs-DMSA, which is a critical requirement for biomedical applications.

Regarding biomedical applications, the effect of a high ionic strength on the colloidal stability of the nanoparticles has been evaluated in PBS buffer, a medium which represents the conditions where the bioanalytical characterization is performed. The hydrodynamic size distribution of the nanoparticles was measured by DLS in PBS 1x (Fig. S7 in Supporting Information). The hydrodynamic size distribution for FSP-SPIONs shows a bimodal pattern with the maxima centered at *ca.* 223 and 1461 nm, clearly indicating that the increase of ionic strength produces large aggregates. However, the monomodal hydrodynamic size distributions centered at 23.3 nm of FSP-SPIONs-DMSA clearly rules out particle aggregation in PBS.

3.3. Nanoparticles impact on formed components of blood

To determine the clinical translational value of SPIONs produced by FSP technique, it is mandatory to evaluate the effects of close contact between the formed elements of blood and the nanomaterial [60]. The blood has two main components, the blood cells and the plasma, *i.e.*, the

Table 1
Organic content and elemental composition from thermogravimetric and chemical analyses (atomic percentages) of as-synthesized (FSP-SPIONs), surface-activated (FSP-SPIONs*) and DMSA-coated (FSP-SPIONs-DMSA) nanoparticles.

Sample	Weight loss (%) [a]	%C	%N	%S
FSP-SPIONs	2.70 ± 0.13	1.24 ± 0.06	0.11 ± 0.01	–
FSP-SPIONs*	2.50 ± 0.12	0.82 ± 0.04	0.24 ± 0.01	–
FSP-SPIONs-DMSA	9.75 ± 0.49	4.57 ± 0.22	0.95 ± 0.05	2.95 ± 0.15

[a] Weight loss (wt%) is determined from the TGA excluding the weight loss due to the desorption of water (up to 125 °C).

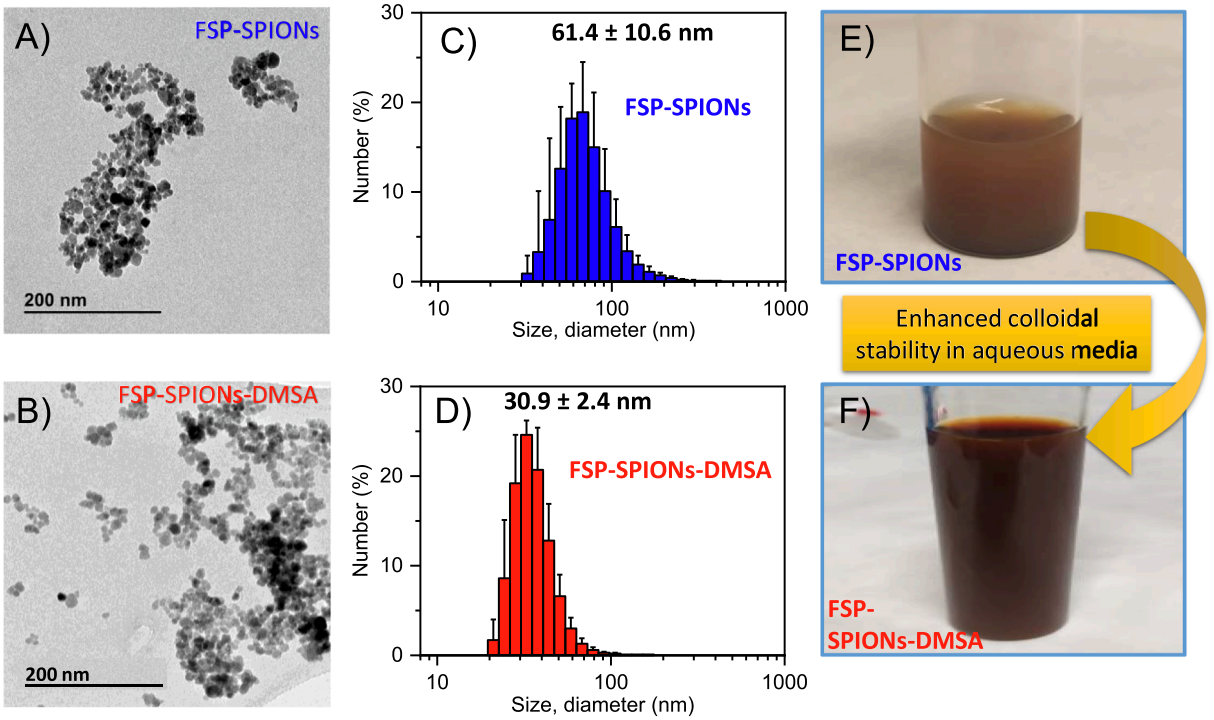


Fig. 3. TEM images of as-synthetized FSP-SPIONs (A) and functionalized FSP-SPIONs-DMSA (B). Hydrodynamic size distributions obtained by dynamic light scattering of FSP-SPIONs (C) and FSP-SPIONs-DMSA (D). Photographs of the aqueous suspensions of the FSP-SPIONs before (E) and after (F) DMSA coating.

fluid phase of the blood [61]. Among the blood cells, myeloid compartment instead lymphoid compartment is supporting primary immune responses (PIR) and also plays a critical role in the regulation of hemostasis [62]. One of the main participants in the PIR are monocytes, with a normal count in blood of 2.5–8.5%. They are highly phagocytic and the main source of tissue-resident macrophages [62]. Platelets or also called thrombocytes are the smallest anucleate formed elements of blood, full of granules and highly sensitive to clotting factors [62,63]. Herein, we focus on testing the hemocompatibility of monocytes and platelets (Fig. 4).

To determine the activating effect on classical circulating monocyte population ($CD14^{+}CD16^{+}$), we analyzed the expression of CD11B by flow cytometry [64] (Fig. 4A). CD11B is an integrin member family which is expressed on the surface of many leukocytes and regulates adhesion and migration of these types of cells in an inflammatory response [65,66]. The presence of both FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA at 100 μg/mL resulted in overexpression of CD11B when compared to basal CD11B expression. These data suggest an *in vitro* activation of classical monocytes in presence of both iron oxide nanomaterials. Interestingly, FSP-SPIONs-DMSA (in red) attenuates CD11B up-regulation compared to the bare FSP-SPIONs (in blue). The functionalized FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles have shown to down-regulate CD11B at doses of 50 and 100 μg/mL, reporting a reduction up to 40% in CD11B expression compared to FSP-SPIONs without statistical differences though (Fig. 4B). In other hand, the incubation of unwashed PRP with both FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA NPs at 50 and 100 μg/mL resulted in negligible platelet aggregation (less than ± 5% sedimentation rate). As expected, positive controls with platelets agonists led to platelet aggregation up to 85%, demonstrating that donor platelets responded in a normal manner and that FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA do not affect the platelet aggregation process (Fig. 4C). Furthermore, there is no difference neither between the two materials nor between the two doses used as<5% of sedimentation is produced in all conditions [67].

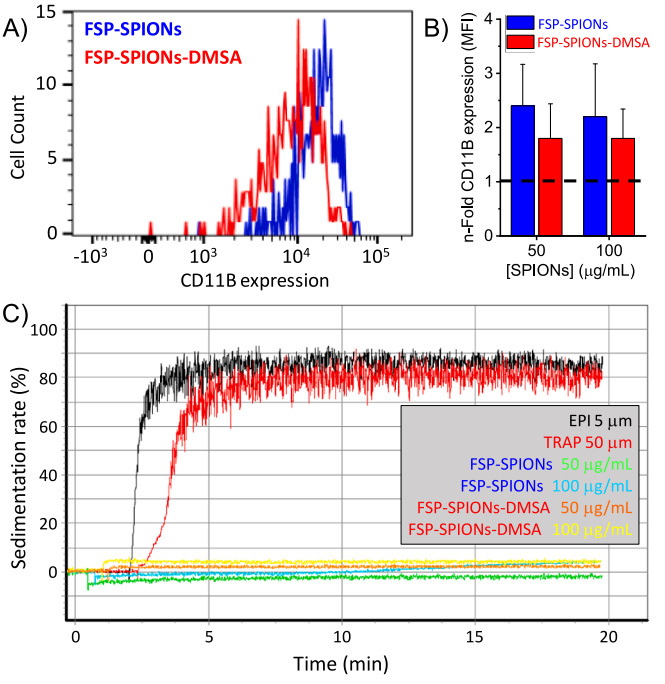


Fig. 4. A) Representative unidimensional histogram of CD11B expression on monocyte in presence of 100 μg/mL of bare FSP-SPIONs (blue) or functionalized FSP-SPIONs-DMSA (red). B) *N*-fold increase of CD11B expression (Mean Fluorescent Intensity) on monocyte surface in presence of FSP-SPIONs (in blue) and FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles (in red) compared to basal monocyte expression. N = 3. C) Representative platelet aggregation chart in platelet-rich plasma in presence of agonists *EPI* (black) and TRAP (red), FSP-SPIONs (green and blue), and FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles (orange and yellow). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. In vitro cytocompatibility assays

Generally, *in vitro* screening assays with nanomaterials/nanoparticles can be classified into three general categories, all of them being covered in this research: *(i)* uptake analysis; *(ii)* viability assays and *(iii)* functional assays to evaluate the effects of nanomaterials on various cellular processes [68]. Specifically, we have evaluated the impact of FSP-SPIONs-DMSA, selected for their colloidal stability in water media and to their hemocompatible response, on the cellular incorporation process, cell viability, reactive oxygen species (ROS) intracellular content, cell-cycle progression, and gene expression of human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs).

3.4.1. Cell uptake and viability of hBM-MSCs exposed to FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles

A key factor when considering the potential biological applications of a specific nanoparticle is its ability to internalize into cells [69–72]. In many cases, the interaction of nanoparticles, including SPIONs, with cell membranes lipids is considered to be one of the major causes of cytotoxicity, as this interaction can lead to cell death [73]. Generally, the SPIONs cell uptake can occur after just 1 to 4 h of incubation. However, higher uptake by mammalian cells is normally observed in prolonged incubation times of around 24 h. In fact, Lee *et al* found that more than 90% of the cells internalized SPIONs after incubating at 1 μg/mL for 1 h, but the maximum incorporation was observed at 24 h of exposure [74]. Herein, we studied the viability of hBM-MSCs to assess whether the nano-biointerface interactions with the SPIONs during their incorporation provokes the loss of cellular plasma membrane integrity. Moreover, to guarantee the incorporation of these SPIONs by hBM-MSCs and determine their effects on cell, 24 h were chosen as the exposure time. Fig. 5A displays the cell uptake of FSP-SPIONs-DMSA by hBM-MSCs when exposed to 25 and 50 μg/mL and Fig. 5B shows their cell viability after 24 h of exposure. The results of cellular incorporation, through changes in the side-scatter intensity, indicate that the internal cellular complexity (SSC) of hBM-MSCs significantly increases ≈ twofold and ≈ threefold compared to that of control cells when exposed to 25 and 50 μg/mL of SPIONs for 24 h, respectively. Furthermore, there is a significant increase in the SSC parameter of these cells at the highest concentration (50 μg/mL). Specifically, the SSC significantly increased ≈ 43%, compared to the lowest concentration of nanoparticles. Regarding the cell viability, hBM-MSCs exposed to both concentrations of nanoparticles, 25 and 50 μg/mL, showed high cell viability (≥95%), without significant differences with respect to control cells cultured in the absence of nanoparticles (98%). These results highlight that the FSP-SPIONs-DMSA are incorporated by hBM-MSCs in a dose-dependent manner and that such cellular uptake process does not cause the loss of cellular plasma membrane integrity, in the tested conditions. These results are in agreement with literature regarding MSs cells exposed to DMSA-coated SPIONs synthetized by other methodologies [47].

Cell morphology is one of the powerful indicators of cell health, which is very important for understanding cell behavior, including the tracking of intracellular molecules/organelles and the cell deformation after nanomaterial incorporation. It is known that the presence of nanoparticles, including SPIONs, inside cell could cause damage to the cytoskeletal structure (F-actin filaments). Thus, in this study, the cellular morphology of hBM-MSCs after FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles uptake as well as their intracellular localization was evaluated after 24 h by confocal microscopy (Fig. 5C), since these filaments are essential elements in maintaining cellular and structural morphology. Confocal images allowed us to observe the characteristic morphology of hBM-MSCs in all conditions of the culture tested [75]. In addition, the staining of the F-actin filaments revealed the correct cytoskeletal assembly on spreading hBM-MSCs exposed to both concentrations (25 and 50 μg/mL) similar to control cells. Finally, the confocal images also show that these nanoparticles have been preferentially incorporated and localized in the perinuclear area, clearly outside of the nucleus and without obvious signs of nuclear shrinkage (pyknosis), as indicated by the white arrows.

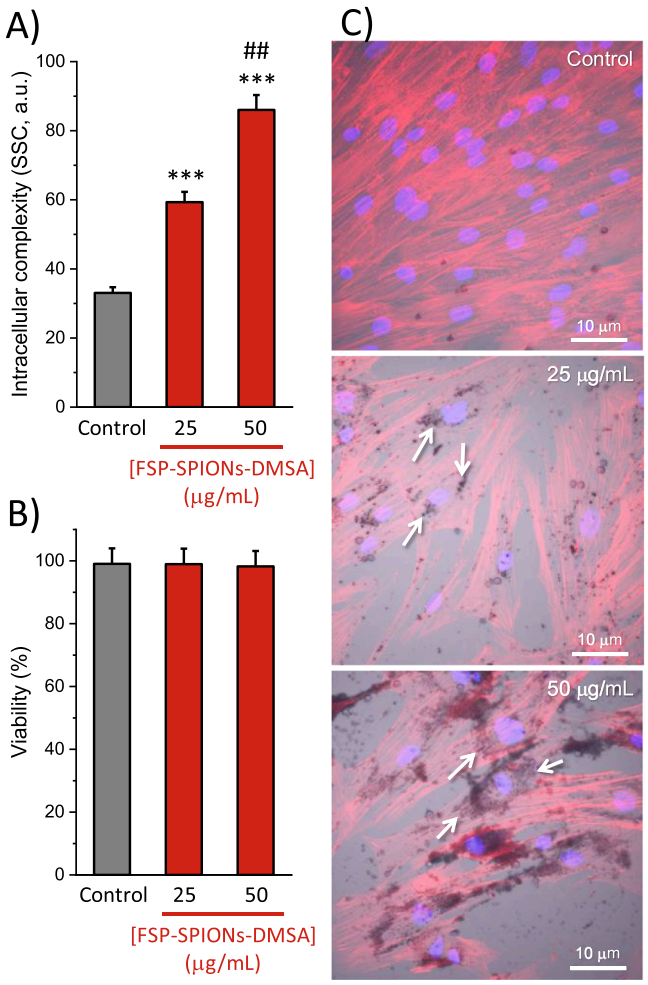


Fig. 5. Cell uptake of FSP-SPIONs-DMSA by hBM-MSCs (A) and cell viability of hBM-MSCs exposed to FSP-SPIONs-DMSA (B), evaluated by flow cytometry after 24 h of exposure. Cell uptake is shown through intracellular complexity, side angle scatter (SSC-A), where the bars represent the geometric mean of SSC data as mean ± SD. Cell viability was evaluated through propidium iodide exclusion assay. Statistical significance: ***$p < 0.005$ (*vs* Control). ##$p < 0.01$ (*vs* 25 μg/mL). C) Morphology evaluation by confocal microscopy of hBM-MSCs after 24 h of culture with FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles. Cells were stained with DAPI for the visualization of the cell nuclei in blue and rhodamine-phalloidin for the visualization of cytoplasmic F-actin filaments in red. FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles appear as black deposits (transmission) inside the cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4.2. Intracellular ROS content in hBM-MSCs exposed to FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles

According to the literature, several studies have proposed oxidative stress as a key mechanism involved in the nanoparticle's toxicity [76,77]. Nanoparticles enter to the intracellular environment and interact with the proteins, organelles, and even DNA, inducing overproduction of ROS. This overproduction limits the cellular capacity to maintain the normal physiological redox-regulated functions, leading to adverse biological effects such as membrane lipid peroxidation, protein denaturation, mitochondrial dysfunction, formation of apoptotic bodies, leakage of lactate dehydrogenase and DNA and RNA damage [78]. The reactive molecules contain oxygen and include H_2O_2 (hydrogen peroxide), NO (nitric oxide), O_2^- (superoxide anion), peroxynitrite ($ONOO^-$), hypochlorous acid (HOCl) and the radical hydroxyl ($HO^{\bullet-}$). In this study, the ROS intracellular content of hBM-MSCs after exposure

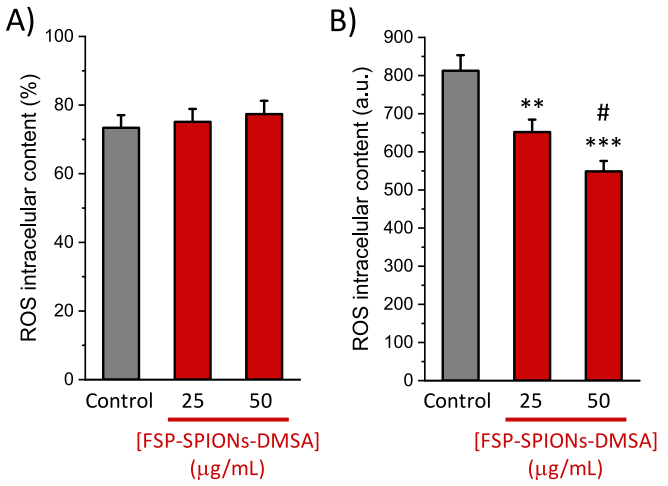


Fig. 6. ROS intracellular content of hBM-MSCs evaluated by flow cytometry after 24 h of exposure to FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles. Data expressed in percentage (A) and fluorescence intensity (B). Statistical significance: **p < 0.01, ***p < 0.005 (*vs* Control). $^{\#}$p < 0.01 (*vs* 25 μg/mL).

to 25 and 50 μg/mL of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles for 24 h was investigated (Fig. 6A and 6B).

The obtained results regarding the percentage of the ROS intracellular content show no significant differences when the cells were cultured with both concentrations compared to control cells. Furthermore, the results of fluorescence intensity showed a significant decrease of ROS intracellular content of hBM-MSCs exposed to both concentrations with respect to control, being this decrease being dose-dependent. This indicates the low or no cytotoxicity of SPIONs, which means that the ROS produced by the SPIONs labelled cells are maintained in a controllable range [79–81]. Recent studies have suggested an effective reduction of ROS through an up-regulation of the cell's antioxidant defense after the initial ROS production induced by SPIONs treatment in cells. Such studies evaluated glutathione and superoxide dismutase (SOD) as oxidative stress markers to evaluate the damage of SPIONs to the intracellular antioxidant system. Moreover, Gao *et al.* attributed it to intact iron oxide particles, but not to iron leaching, an intrinsic peroxidase-like activity capable of catalyzing the breakdown of H_2O_2. Therefore, one of the potential mechanisms involved in the stimulation of hBM-MSCs growth could be the diminishing of intracellular H_2O_2 [82]. These preliminary assays give information on the biosafety of FSP-SPIONs-DMSA, which indeed do not impede the inherent protective antioxidative mechanisms of hBM-MSCs while maintaining low levels of cytotoxicity.

3.4.3. *Effect of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles on cell cycle of hBM-MSCs*

Cell cycle is defined as the ordered set of events that leads to cell growth. The cell cycle in eukaryote cells comprises four consecutive stages, the most important of which is the DNA replication phase known as the synthesis (S) phase. The cell cycle phases are defined as G_0/G_1 phase (Quiescence/Gap 1), S phase (Synthesis) and finally to the G_2/M phase (Gap 2 and Mitosis). A cell can be in the state of non-division or interphase, where it performs its specific functions or in state of division, called M phase. During G_1 phase, cell doubles its size and mass due to the continuous synthesis of protein and RNA. The second cycle stage, S phase, is characterized by the DNA replication. During G_2 phase continues the synthesis of proteins and RNA. Finally, M phase encompasses mitosis (distribution of nuclear genetic material) and cytokinesis (division of the cytoplasm). The cell cycle is mediated by different factors, the most important of which are perhaps cycle-dependent kinases (CDKs) [83].

Fig. 7 shows the cell cycle phases of hBM-MSCs exposed at 25 and 50

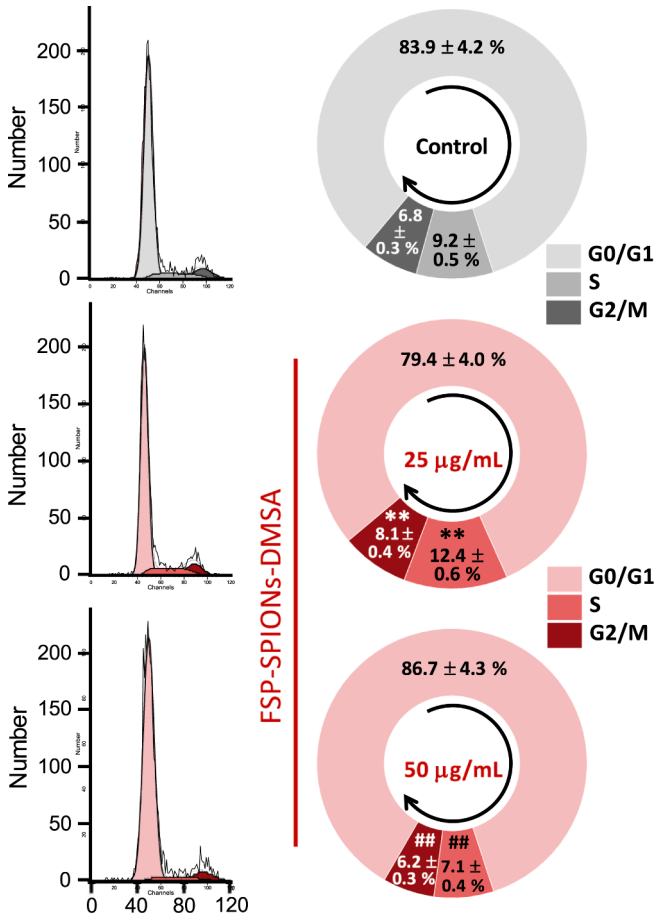


Fig. 7. Cell cycle phases of hBM-MSCs after 24 h of exposure to FSP-SPIONs-DMSA evaluated by flow cytometry. Up to down: control, 25 and 50 μg/mL. Statistical significance: **p < 0.01 (*vs* Control); $^{\#\#}$p < 0.01 (*vs* 25 μg/mL).

μg/mL FSP-SPIONs-DMSA for 24 h. Results highlight that there is a significant increase of the S and G2/M phases in the cells exposed to 25 μg/mL FSP-SPIONs-DMSA compared to the phases showed by hBM-MSCs cultured in absence of nanoparticles. In addition, when hBM-MSCs are cultured with 50 μg/mL FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles for 24 h, the S phase experienced a slight decrease, while the G_0/G_1 and G_2/M phases are kept practically constant with respect to the control. These results evidence the no cytotoxicity of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles, and indeed the slight increase in cell growth for 25 μg/mL can be explained due to the FSP-SPIONs-DMSA ability to diminish intracellular ROS content through intrinsic peroxidase-like activity, also found by other authors [84]. In this regard, it is worth noting that this increase in cell proliferation is a required phase for mesenchymal stem cells prior to differentiation into another cell lineage [85].

Considering this increase in proliferation of hBM-MSCs, and to verify their ability to differentiate as inherent property of these cells, a preliminary differentiation assay by Runx2 and ALP gene expression have been carried out [86,87]. Fig. 8 shows the Runx2 and ALP gene expression, as bone osteogenic markers, of hBM-MSCs exposed to 25 μg/mL of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles quantitatively evaluated by PCR. No significant differences in Runx2 gene expression were observed compared to that shown by cells in absence of SPIONs after 4 and 7 days of exposure. On the other hand, osteogenic marker ALP expression was significantly increased both 4 and 7 days compared to cells cultured in absence of nanoparticles (control). Therefore, results highlight that the FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles do not block the expression of early markers of osteogenic differentiation in human bone marrow derived mesenchymal stem cells, keeping their cell functionality.

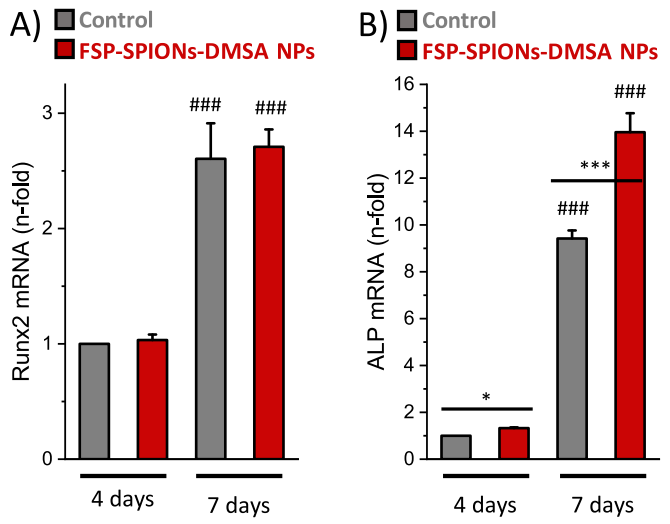


Fig. 8. *In vitro* gene expression evaluation (measured by qRT-PCR) in human bone marrow derived mesenchymal stem cells at 4 and 7 days of culture. Runx2 (A) and alkaline phosphatase (ALP) (B) expression in presence of 25 μg/mL of FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles. Statistical significance: $^{###}p < 0.01$ (4 days *vs* 7 days). *p < 0.05, ***p < 0.005 (Control *vs* FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles).

4. Conclusions

In this work, large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) by flame spray pyrolysis (FSP) technique was accomplished for biomedical applications. This bottom-up nanomanufacturing technique has recognized scalability and reproducibility, enabling the production of metal oxide nanoparticles with high yields and low production costs [18–23]. The novelty of this manuscript lies fundamentally in the validation of SPIONs synthesized by FSP methodology for medical applications. For this purpose, a thorough characterization was carried out in terms of superparamagnetic properties, colloidal stability, hemocompatibility and cytotoxicity. First, very homogeneous SPIONs with a particle size of *ca.* 12 nm and a yield of 100 g/h have been obtained by FSP. Then, as-synthetized FSP-SPIONs were further processed via an acid treatment to clean and activate their surface, followed by a coating with dimercaptosuccinic acid (DMSA) to obtain stable aqueous colloidal solutions [46,49]. The final product shows high quality in terms of nanoparticle size, homogeneous size distribution, long-term colloidal stability and magnetic properties. Hemocompatibility studies with monocytes and platelets demonstrate that functionalized FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles allow normal basal monocyte function and do not cause platelet aggregation. Moreover, *in vitro* biocompatibility assays with mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) show a dose-dependent cellular uptake while maintaining high values of cell viability and cell cycle progression, without producing cellular oxidative stress, which could be an added value in SPIONs synthetized by FSP. The successful *in vitro* biological validation of the FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles produced in this work, which benefit from large-scale production, constitutes a significant advance in the challenging race towards the industrial development of SPIONs for biomedical applications. In this sense, we are currently conducting further studies on the anti-oxidative mechanisms [84] as well as the cellular internalization pathways of these nanoparticles to stablish their most suitable clinical applications.

Funding

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement No 814410 (GIOTTO) and ERC-2015-AdG (VERDI) Proposal No. 694160. This study was also supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) PID2020-117091RB-I00 grant.

CRediT authorship contribution statement

Manuel Estévez: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Mónica Cicuéndez:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Julián Crespo:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Juana Serrano-López:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Montserrat Colilla:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Claudio Fernández-Acevedo:** Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Tamara Oroz-Mateo:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Amaia Rada-Leza:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft. **Blanca González:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration. **Isabel Izquierdo-Barba:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **María Vallet-Regí:** Writing – review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank the Materials for Medicine and Biotechnology Group (María del Puerto Morales, Alvaro Gallo-Cordova) for advice and assistance in the characterization in the analysis services of the ICMM-CSIC for the characterization of the magnetic properties. We are grateful to Prof. María del Puerto Morales (ICMM/CSIC) for her support and valuable scientific discussions on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, as well as for her collaborative vision of science progress. We also thank the ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (UCM).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.07.009.

References

[1] N.Ž. Knežević, E. Ruiz-Hernández, W.E. Hennink, M. Vallet-Regí, Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications, RSC Adv. 3 (2013) 9584–9593, https://doi.org/10.1039/c3ra23127e.
[2] Y. Xiao, J. Du, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications, J. Mater. Chem. B 8 (2020) 354–367, https://doi.org/10.1039/C9TB01955C.
[3] V.F. Cardoso, A. Francesko, C. Ribeiro, M. Bañobre-López, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications, Adv. Healthc. Mater. 7 (2018) 1700845, https://doi.org/10.1002/adhm.201700845.
[4] A. Ruiz, P.C. Morais, R. Bentes de Azevedo, Z.G.M. Lacava, A. Villanueva, M. del Puerto Morales, Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid:

development, characterization, and application in biomedicine, J. Nanoparticle Res. 16 (2014) 2589, https://doi.org/10.1007/s11051-014-2589-6.
[5] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic: An update, Bioeng. Transl. Med. 4 (2019), e10143, https://doi.org/10.1002/btm2.10143.
[6] A. Wahajuddin, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers, Int. J. Nanomedicine 7 (2012) 3445, https://doi.org/10.2147/IJN.S30320.
[7] X. Li, J. Wei, K.E. Aifantis, Y. Fan, Q. Feng, F.-Z. Cui, F. Watari, Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 104 (2016) 1285–1296, https://doi.org/10.1002/jbm.a.35654.
[8] E. Álvarez, M. Estévez, A. Gallo-Cordova, B. González, R.R. Castillo, M.D. P. Morales, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Decorated Mesoporous Silica Nanosystem for Combined Antibiofilm Therapy, Pharmaceutics 14 (2022) 163, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010163.
[9] Y. Bian, D. Song, Z. Fu, C. Jiang, C. Xu, L. Zhang, K. Wang, S. Wang, D. Sun, Carboxyl PEGylation of magnetic nanoparticles as antithrombotic and thrombolytic agents by calcium binding, J. Colloid Interface Sci. 638 (2023) 672–685, https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.01.129.
[10] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, Biomaterials 26 (2005) 3995–4021, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
[11] C. Xu, S. Sun, Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications, Polym. Int. 56 (2007) 821–826, https://doi.org/10.1002/pi.2251.
[12] C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, Academic Press, 2013.
[13] C.M. Sorensen, Magnetism, in: K.J. Klabunde (Ed.), Nanoscale Materials in Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 2001, pp. 169–221.
[14] L. Machala, R. Zboril, A. Gedanken, Amorphous Iron(III) Oxide - A Review, J. Phys. Chem. B 111 (2007) 4003–4018, https://doi.org/10.1021/jp064992s.
[15] A.-H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth, Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application, Angew. Chemie Int. Ed. 46 (2007) 1222–1244, https://doi.org/10.1002/anie.200602866.
[16] J. Lodhia, G. Mandarano, N. Ferris, P. Eu, S. Cowell, Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI, Biomed. Imaging Interv. J. 6 (2010) e12.
[17] L. Yan, A. Amirshaghaghi, D. Huang, J. Miller, J.M. Stein, T.M. Busch, Z. Cheng, A. Tsourkas, Protoporphyrin IX (PpIX)-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Nanoclusters for Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy, Adv. Funct. Mater. 28 (2018) 1707030, https://doi.org/10.1002/adfm.201707030.
[18] R. Strobel, S.E. Pratsinis, Flame aerosol synthesis of smart nanostructured materials, J. Mater. Chem. 17 (2007) 4743–4753, https://doi.org/10.1039/b711652g.
[19] R. Mueller, L. Mädler, S.E. Pratsinis, Nanoparticle synthesis at high production rates by flame spray pyrolysis, Chem. Eng. Sci. 58 (2003) 1969–1976, https://doi.org/10.1016/S0009-2509(03)00022-8.
[20] R. Strobel, A. Baiker, S.E. Pratsinis, Aerosol flame synthesis of catalysts, Adv. Powder Technol. 17 (2006) 457–480, https://doi.org/10.1163/156855206778440525.
[21] W.Y. Teoh, R. Amala, L. Mädler, Flame spray pyrolysis: An enabling technology for nanoparticles design and fabrication, Nanoscale 2 (2010) 1324–1347, https://doi.org/10.1039/C0NR00017E.
[22] S. Li, Y. Ren, P. Biswas, S.D. Tse, Flame aerosol synthesis of nanostructured materials and functional devices: Processing, modeling, and diagnostics, Prog. Energy Combust. Sci. 55 (2016) 1–59, https://doi.org/10.1016/j.pecs.2016.04.002.
[23] P. Weyell, H.-D. Kurland, T. Hülser, J. Grabow, F.A. Müller, D. Kralisch, Risk and life cycle assessment of nanoparticles for medical applications prepared using safe- and benign-by-design gas-phase syntheses, Green Chem. 22 (2020) 814–827, https://doi.org/10.1039/C9GC02436K.
[24] J. Karthikeyan, C.C. Berndt, J. Tikkanen, J.Y. Wang, A.H. King, H. Herman, Nanomaterial powders and deposits prepared by flame spray processing of liquid precursors, Nanostructured Mater. 8 (1997) 61–74, https://doi.org/10.1016/S0965-9773(97)00066-4.
[25] M. Suciu, C.M. Ionescu, A. Ciorita, S.C. Tripon, D. Nica, H. Al-Salami, L. Barbu-Tudoran, Applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in drug and therapeutic delivery, and biotechnological advancements, Beilstein J. Nanotechnol. 11 (2020) 1092–1109, https://doi.org/10.3762/BJNANO.11.94.
[26] C. Janzen, P. Roth, Formation and characteristics of Fe2O3 nano-particles in doped low pressure H2/O2/Ar flames, Combust. Flame 125 (2001) 1150–1161, https://doi.org/10.1016/S0010-2180(01)00235-8.
[27] S. Grimm, M. Schultz, S. Barth, R. Müller, Flame pyrolysis - A preparation route for ultrafine pure γ-Fe2O3 powders and the control of their particle size and properties, J. Mater. Sci. 32 (1997) 1083–1092, https://doi.org/10.1023/A:1018598927041.
[28] D. Li, W.Y. Teoh, C. Selomulya, R.C. Woodward, R. Amal, B. Rosche, Flame-sprayed superparamagnetic bare and silica-coated maghemite nanoparticles: Synthesis, characterization, and protein adsorption-desorption, Chem. Mater. 18 (2006) 6403–6413, https://doi.org/10.1021/cm061861v.
[29] D. Li, W.Y. Teoh, C. Selomulya, R.C. Woodward, P. Munroe, R. Amal, Insight into microstructural and magnetic properties of flame-made γ-Fe2O3 nanoparticles, J. Mater. Chem. 17 (2007) 4876–4884, https://doi.org/10.1039/b711705a.
[30] S. Rajput, L.P. Singh, C.U. Pittman, D. Mohan, Lead (Pb^{2+}) and copper (Cu^{2+}) remediation from water using superparamagnetic maghemite (γ-Fe_2O_3) nanoparticles synthesized by Flame Spray Pyrolysis (FSP), J. Colloid Interface Sci. 492 (2017) 176–190, https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.095.
[31] M.F.B. Stodt, C. Liu, S. Li, L. Mädler, U. Fritsching, J. Kiefer, Phase-selective laser-induced breakdown spectroscopy in flame spray pyrolysis for iron oxide nanoparticle synthesis, Proc. Combust. Inst. 38 (2021) 1711–1718, https://doi.org/10.1016/j.proci.2020.06.092.
[32] R. Strobel, S.E. Pratsinis, Direct synthesis of maghemite, magnetite and wustite nanoparticles by flame spray pyrolysis, Adv. Powder Technol. 20 (2009) 190–194, https://doi.org/10.1016/j.apt.2008.08.002.
[33] S.R. Ansari, N.J. Hempel, S. Asad, P. Svedlindh, C.A.S. Bergström, K. Löbmann, A. Teleki, Hyperthermia-Induced in Situ Drug Amorphization by Superparamagnetic Nanoparticles in Oral Dosage Forms, ACS Appl. Mater. Interfaces. 14 (2022) 21978–21988, https://doi.org/10.1021/acsami.2c03556.
[34] F.H.L. Starsich, C. Eberhardt, A. Boss, A.M. Hirt, S.E. Pratsinis, Coercivity Determines Magnetic Particle Heating, Adv. Healthc. Mater. 7 (2018) 1800287, https://doi.org/10.1002/adhm.201800287.
[35] F.H.L. Starsich, G.A. Sotiriou, M.C. Wurnig, C. Eberhardt, A.M. Hirt, A. Boss, S. E. Pratsinis, Silica-Coated Nonstoichiometric Nano Zn-Ferrites for Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment, Adv. Healthc. Mater. 5 (2016) 2698–2706, https://doi.org/10.1002/adhm.201600725.
[36] N. Singh, G.J.S. Jenkins, R. Asadi, S.H. Doak, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), Nano Rev. 1 (2010) 5358, https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358.
[37] J.N. Udall, R.A. Moscicki, F.I. Preffer, P.D. Ariniello, E.A. Carter, A.K. Bhan, K.J. Bloch, Flow cytometry: a new approach to the isolation and characterization of Kupffer cells., in: J. Mestecky, J.R. McGhee, J. Bienenstock, P.L. Ogra (Eds.), Adv. Exp. Med. Biol., Springer US, Boston, MA, 1987: pp. 821–827. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5344-7_95.
[38] L. Zamai, E. Falcieri, G. Zauli, A. Cataldi, M. Vitale, Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology, Cytometry 14 (1993) 891–897, https://doi.org/10.1002/cyto.990140807.
[39] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, M. Köller, Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells, Acta Biomater. 7 (2011) 347–354, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.003.
[40] H. Suzuki, T. Toyooka, Y. Ibuki, Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 3018–3024, https://doi.org/10.1021/es0625632.
[41] R. Serrano-Bayona, C. Chu, P. Liu, W.L. Roberts, Flame Synthesis of Carbon and Metal-Oxide Nanoparticles: Flame Types, Effects of Combustion Parameters on Properties and Measurement Methods, Materials 16 (3) (2023) 1192.
[42] D. Zins, V. Cabuil, R. Massart, New aqueous magnetic fluids, J. Mol. Liq. 83 (1999) 217–232, https://doi.org/10.1016/S0167-7322(99)00087-2.
[43] R. Massart, Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media, IEEE Trans. Magn. 17 (1981) 1247–1248, https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188.
[44] B. González, E. Ruiz-Hernández, M.J. Feito, C. López De Laorden, D. Arcos, C. Ramírez-Santillán, C. Matesanz, M.T. Portolés, M. Vallet-Regí, Covalently bonded dendrimer-maghemite nanosystems: Nonviral vectors for in vitro gene magnetofection, J. Mater. Chem. 21 (2011) 4598–4604, https://doi.org/10.1039/c0jm03526b.
[45] R. Costo, V. Bello, C. Robic, M. Port, J.F. Marco, M. Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: Improving the colloidal and magnetic properties, Langmuir 28 (2012) 178–185, https://doi.org/10.1021/la203428z.
[46] G. Salas, C. Casado, F.J. Teran, R. Miranda, C.J. Serna, M.P. Morales, Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications, J. Mater. Chem. 22 (2012) 21065–21075, https://doi.org/10.1039/c2jm34402e.
[47] L.H.A. Silva, J.R. Silva, G.A. Ferreira, R.C. Silva, E.C.D. Lima, R.B. Azevedo, D. M. Oliveira, Labeling mesenchymal cells with DMSA-coated gold and iron oxide nanoparticles: Assessment of biocompatibility and potential applications, J. Nanobiotechnology 14 (2016) 59, https://doi.org/10.1186/s12951-016-0213-x.
[48] C.R.A. Valois, J.M. Braz, E.S. Nunes, M.A.R. Vinolo, E.C.D. Lima, R. Curi, W. M. Kuebler, R.B. Azevedo, The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a β2 integrin-dependent pathway, Biomaterials 31 (2010) 366–374, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.053.
[49] R. Mejías, S. Pérez-Yagüe, L. Gutiérrez, L.I. Cabrera, R. Spada, P. Acedo, C.J. Serna, F.J. Lázaro, Á. Villanueva, M. del P. Morales, D.F. Barber, Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy, Biomaterials 32 (2011) 2938–2952, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.008.
[50] V. Monge-Fuentes, M.P. Garcia, M.C.H. Tavares, C.R.A. Valois, E.C.D. Lima, D. S. Teixeira, P.C. Morais, C. Tomaz, R.B. Azevedo, Biodistribution and biocompatibility of DMSA-stabilized maghemite magnetic nanoparticles in nonhuman primates (Cebus spp.), Nanomedicine 6 (2011) 1529–1544, https://doi.org/10.2217/nnm.11.47.
[51] R. Mejías, L. Gutiérrez, G. Salas, S. Pérez-Yagüe, T.M. Zotes, F.J. Lázaro, M. P. Morales, D.F. Barber, Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications, J. Control. Release 171 (2013) 225–233, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.07.019.
[52] S. Çitoğlu, Ö.D. Coşkun, L.D. Tung, M.A. Onur, N.T.K. Thanh, DMSA-coated cubic iron oxide nanoparticles as potential therapeutic agents, Nanomedicine 16 (2021) 925–941, https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0467.

[53] W. Kim, C.Y. Suh, S.W. Cho, K.M. Roh, H. Kwon, K. Song, I.J. Shon, A new method for the identification and quantification of magnetite-maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique, Talanta 94 (2012) 348–352, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.001.

[54] J.M.D. Coey, ed., Magnetic materials, in: Magn. Magn. Mater., Cambridge University Press, Cambridge, 2001: pp. 374–438. https://doi.org/10.1017/CBO9780511845000.012.

[55] R.M. Cornell, U. Schwertmann. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, Wiley-VCH, 2003, Second Edition. DOI:10.1002/3527602097.

[56] H. Shokrollahi, A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite, J. Magn. Magn. Mater. 426 (2017) 74–81, https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.033.

[57] A.G. Roca, J.F. Marco, M. Del Puerto Morales, C.J. Serna, Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles, J. Phys. Chem. C. 111 (2007) 18577–18584, https://doi.org/10.1021/jp075133m.

[58] B. Alkan, S. Cychy, S. Varhade, M. Muhler, C. Schulz, W. Schuhmann, H. Wiggers, C. Andronescu, Spray-Flame-Synthesized $LaCo_{1-x}Fe_xO_3$ Perovskite Nanoparticles as Electrocatalysts for Water and Ethanol Oxidation, ChemElectroChem 6 (2019) 4266–4274, https://doi.org/10.1002/celc.201900168.

[59] N. Fauconnier, J.N. Pons, J. Roger, A. Bee, Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid, J. Colloid Interface Sci. 194 (1997) 427–433, https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5125.

[60] M. Weber, H. Steinle, S. Golombek, L. Hann, C. Schlensak, H.P. Wendel, M. Avci-Adali, Blood-Contacting Biomaterials. In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility, Front. Bioeng. Biotechnol. 6 (2018) 99, https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00099.

[61] W.F. Boron, E.L. Boulpaep, Medical Physiology, 3rd ed., Elsevier, Philadelphia, 2017, p. 434.

[62] K. Bassler, J. Schulte-Schrepping, S. Warnat-Herresthal, A.C. Aschenbrenner, J. L. Schultze, The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell, Annu. Rev. Immunol. 37 (2019) 269–293, https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041728.

[63] Y. Sang, M. Roest, B. de Laat, P.G. de Groot, D. Huskens, Interplay between platelets and coagulation, Blood Rev. 46 (2021), 100733, https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100733.

[64] M.B. Gorbet, E.L. Yeo, M.V. Sefton, Flow cytometric study of in vitro neutrophil activation by biomaterials, J. Biomed. Mater. Res. 44 (1999) 289–297, https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990305)44:3<289::AID-JBM7>3.0.CO;2-O.

[65] M. Arnaout, Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18, Blood 75 (1990) 1037–1050, https://doi.org/10.1182/blood.v75.5.1037.1037.

[66] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated, Nat. Rev. Immunol. 7 (2007) 678–689, https://doi.org/10.1038/nri2156.

[67] G. Aragoneses-Cazorla, J. Serrano-Lopez, I. Martinez-Alfonzo, M. Vallet-Regí, B. González, J.L. Luque-Garcia, A novel hemocompatible core@shell nanosystem for selective targeting and apoptosis induction in cancer cells, Inorg. Chem. Front. 8 (2021) 2697–2712, https://doi.org/10.1039/d1qi00143d.

[68] M. Milla, S.M. Yu, A. Laromaine, Parametrizing the exposure of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cell cultures at different in vitro environments, Chem. Eng. J. 340 (2018) 173–180, https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.070.

[69] J. Mosquera, I. García, L.M. Liz-Marzán, Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size, Acc. Chem. Res. 51 (2018) 2305–2313, https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00292.

[70] N.D. Donahue, H. Acar, S. Wilhelm, Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine, Adv. Drug Deliv. Rev. 143 (2019) 68–96, https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008.

[71] P. Rees, J.W. Wills, M.R. Brown, C.M. Barnes, H.D. Summers, The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells, Nat. Commun. 10 (2019) 2341, https://doi.org/10.1038/s41467-019-10112-4.

[72] M. Balk, T. Haus, J. Band, H. Unterweger, E. Schreiber, R.P. Friedrich, C. Alexiou, A.O. Gostian, Cellular spion uptake and toxicity in various head and neck cancer cell lines, Nanomaterials 11 (2021) 1–19, https://doi.org/10.3390/nano11030726.

[73] S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, M.A. Hamaly, M.Y. Alkawareek, E.C. Dreaden, D. Brown, A.M. Alkilany, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell, Chem. Soc. Rev. 46 (2017) 4218–4244, https://doi.org/10.1039/c6cs00636a.

[74] S.H. Lee, D.J. Park, W.S. Yun, J.E. Park, J.S. Choi, J. Key, Y.J. Seo, Endocytic trafficking of polymeric clustered superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mesenchymal stem cells, J. Control. Release. 326 (2020) 408–418, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.032.

[75] F. Haasters, W.C. Prall, D. Anz, C. Bourquin, C. Pautke, S. Endres, W. Mutschler, D. Docheva, M. Schieker, Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing, J. Anat. 214 (2009) 759–767, https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01065.x.

[76] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, Science 311 (2006) 622–627, https://doi.org/10.1126/science.1114397.

[77] Y. Zhang, Y. Hai, Y. Miao, X. Qi, W. Xue, Y. Luo, H. Fan, T. Yue, The toxicity mechanism of different sized iron nanoparticles on human breast cancer (MCF7) cells, Food Chem. 341 (2021), 128263, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128263.

[78] D. Wu, P. Yotnda, Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, J. Vis. Exp. (2011) e3357.

[79] I.M. Pongrac, I. Pavičić, M. Milić, L.B. Ahmed, M. Babič, D. Horák, I.V. Vrček, S. Gajović, Oxidative stress response in neural stem cells exposed to different superparamagnetic iron oxide nanoparticles, Int. J. Nanomedicine 11 (2016) 1701–1715, https://doi.org/10.2147/IJN.S102730.

[80] H. Wei, Y. Hu, J. Wang, X. Gao, X. Qian, M. Tang, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, metabolism, and cellular behavior in biomedicine applications, Int. J. Nanomedicine 16 (2021) 6097–6113, https://doi.org/10.2147/IJN.S321984.

[81] U.S. Patil, S. Adireddy, A. Jaiswal, S. Mandava, B.R. Lee, D.B. Chrisey, In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles, Int. J. Mol. Sci. 16 (2015) 24417–24450, https://doi.org/10.3390/ijms161024417.

[82] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan, Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, Nat. Nanotechnol. 2 (2007) 577–583, https://doi.org/10.1038/nnano.2007.260.

[83] J.A. Kim, C. Aberg, A. Salvati, K.A. Dawson, Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population, Nat. Nanotechnol. 7 (2012) 62–68, https://doi.org/10.1038/nnano.2011.191.

[84] D.M. Huang, J.K. Hsiao, Y.C. Chen, L.Y. Chien, M. Yao, Y.K. Chen, B.S. Ko, S. C. Hsu, L.A. Tai, H.Y. Cheng, S.W. Wang, C.S. Yang, Y.C. Chen, The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles, Biomaterials 30 (2009) 3645–3651, https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.032.

[85] A. Augello, C. De Bari, The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells, Hum. Gene Ther. 21 (2010) 1226–1238, https://doi.org/10.1089/hum.2010.173.

[86] M. Prince, C. Banerjee, A. Javed, J. Green, J.B. Lian, G.S. Stein, P.V.N. Bodine, B. S. Komm, Expression and regulation of RUNX2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts, J. Cell. Biochem. 80 (2001) 424–440, https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010301)80:3<424::AID-JCB160>3.0.CO;2-6.

[87] S. Vimalraj, Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization, Gene 754 (2020), 144855, https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855.

Journal of Colloid and Interface Science

Revised Manuscript

June 2023

Supporting Information

Large-scale Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by Flame Spray Pyrolysis: *In Vitro* Biological Evaluation for Biomedical Applications

Manuel Estévez [a,§], Mónica Cicuéndez [b,§], Julián Crespo [c], Juana Serrano-López [d], Montserrat Colilla [a,e], Claudio Fernández-Acevedo [f], Tamara Oroz-Mateo [f], Amaia Rada-Leza [f], Blanca González [a,e]*, Isabel Izquierdo-Barba [a,e]* and María Vallet-Regí [a,e]*

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; manestev@ucm.es (M.E.); mcolilla@ucm.es (M.C.); blancaortiz@ucm.es (B.G.); ibarba@farm.ucm.es (I.I.-B.); vallet@ucm.es (M.V.-R.)

[b] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040-Madrid, Spain. mcicuendez@farm.ucm.es (M.C.)

[c] Tecnología Navarra de Nanoproductos S.L. (TECNAN), área industrial PERGUITA, C/A, Nº 1, 31210, Los Arcos (Navarra), Spain; julian.crespo@tecnan-nanomat.es (J.C.)

[d] Experimental Hematology Lab, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, 28040, Spain; juana.serrano@quironsalud.es (J.S.-L.)

[e] Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain.

[f] Centro Tecnológico L´Urederra, área industrial PERGUITA, C/A, Nº 1, 31210, Los Arcos (Navarra), Spain; claudio.fernandez@lurederra.es (C.F.-A.); tamara.oroz@lurederra.es (T.O.-M.); amaia.rada@lurederra.es (A.R.-L.)

§ Both authors contributed equally to the manuscript

* Corresponding authors: blancaortiz@ucm.es; ibarba@ucm.es; vallet@ucm.es

Supporting information summary: Equipment; TEM images of as-synthetized FSP-SPIONs using initial FSP conditions (Figure S1); TEM images of as-synthetized FSP-SPIONs using optimized FSP conditions and nanoparticles size distribution (Figure S2); FTIR spectrum of DMSA (Figure S3); Zeta potential distributions obtained by DLS of FSP-SPIONs and FSP-SPIONs-DMSA in water media (Figure S4).

Equipment

The surface area of the FSP produced SPIONs was determined by N_2 adsorption (BET) in a Tristar II 3020 multi-sample.

The iron content of the different samples was determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in a Perkin Elmer Optima 2100 DV ICP apparatus. Prior to the analysis, samples were digested at 90 °C in HNO_3/HCl (1:3) and diluted with Milli-Q water.

The crystalline structure of the SPIONs was analyzed by X-ray diffraction (XRD) using a Philips X'Pert diffractometer with Bragg-Brentano geometry operating with CuKα radiation (λ = 1.5406 Å), (Philips Electronics NV, Eindhoven, Netherlands). XRD patterns were collected within 10 and 80 2θ degrees, with a step size of 0.04° and a contact time of 5 s per step.

Particle size and shape were determined by transmission electron microscopy (TEM) using JEOL JEM 1400 instrument operated at 120 kV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Sample preparation was performed by placing a drop of dilute suspension onto a carbon-coated copper grip.

Fourier transformed infrared (FTIR) spectra were collected in a Thermo Nicolet Nexus spectrometer equipped with a Goldengate attenuated total reflectance (ATR) device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Thermogravimetric analysis (TGA) and differential thermal analysis (DTA) were performed in a Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA analyzer (Perkin Elmer, California, USA) by placing approximately 5 mg of sample in a platinum crucible and heating at 800 °C at 5 °C /min under an air flow rate of 100 mL/min. Chemical microanalysis was performed using Perkin Elmer 2400 CHN and LECO CHNS-932 thermoanalyzers.

A MagLabVSM vibrating sample magnetometer (Oxford Instrument, High Wycombe, UK) was used to measure the magnetic properties of the nanoparticles. For the measurement of powders, the samples were accurately weighed and fitted in the sample holder. For the measurement of liquid samples, 100 µL of sample were placed on a piece of cotton wool, allowed to dry and pressed into a sample holder. The hysteresis loops were measured at 16.9 °C up to 5 T, and the magnetic saturation of the SPIONs was obtained by extrapolating to 1/H = 0 the high field of the magnetization curve.

Hydrodynamic size was measured by dynamic light scattering (DLS) from a dilute suspension of the sample in water at pH 7. Electrophoretic mobility measurements for the nanoparticles suspended in water were used to calculate the zeta-potential (ζ) value of the SPIONs. The measurements were performed in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom) equipped with a 633 nm "red" laser. Samples were measured in quintuplicate (n = 5).

Table S1. Process parameters used in the synthesis of SPIONs by Flame Spray pyrolysis.

FSP process parameters	**Preliminary production**	**Optimized production**
Precursor 1 (iron compound and solvent)	0.6 M iron (III) acetylacetonate in xylene	0.35 M iron (III) acetylacetonate in xylene
Precursor 2 (iron compound and solvent)	0.5 M iron (III) naphthenate in xylene:2-ethylhexanoic acid (1:2)	0.23 M iron (III) naphthenate in xylene:2-ethylhexanoic acid (1:2)
Feeding flow (mL/min)	15-25	10-30
Dispersion O_2 flow (L/min)	30-40	20-30
Support flame: methane to O_2 flow rate (L/h)	3-6	4-8

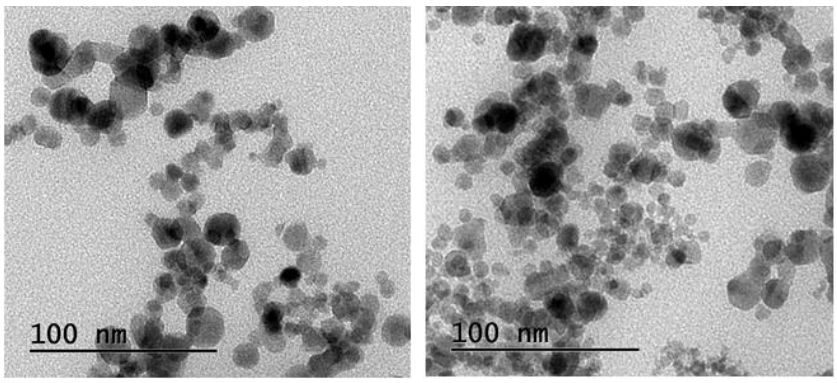


Figure S1. TEM images of as-synthetized FSP-SPIONs using the following conditions: 0.6 M iron (III) acetylacetonate in xylene and 0.5 M iron (III) naphthenate in a mixture 1:2 of xylene and 2-ethylhexanoic acid; feeding flow rate 15-25 mL/min; O_2 as dispersion gas at 30-40 mL/min; ratio of methane to oxygen gas flow rate was 3-6 L/h.

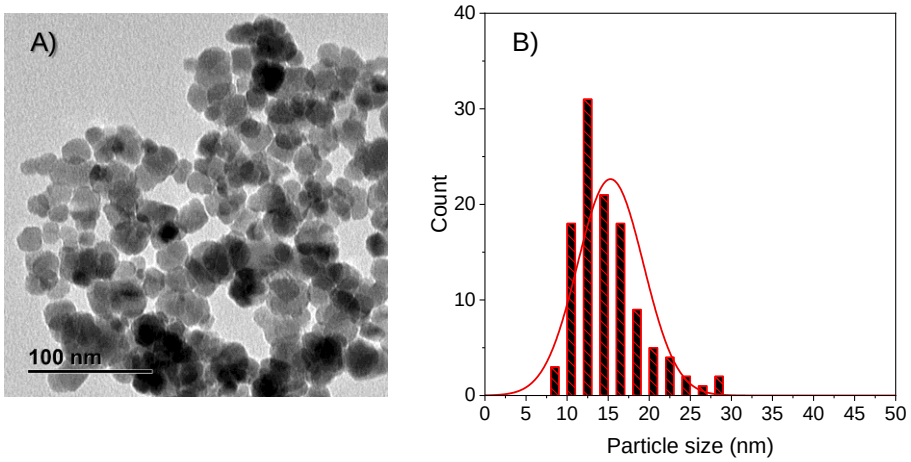


Figure S2. A) TEM image of as-synthetized FSP-SPIONs using the following conditions: 0.35 M iron (III) acetylacetonate in xylene and 0.23 M iron (III) naphthenate in a mixture 1:2 of xylene and 2-ethylhexanoic acid; feeding flow rate 10-30 mL/min; O_2 as dispersion gas at 20-30 mL/min; ratio of methane to oxygen gas flow rate was 4-8 L/h. B) Nanoparticles size distribution obtained by statistical treatment of different TEM images of as-synthetized FSP-SPIONs.

TEM analysis confirmed a fairly uniform nanoparticle size of FSP-SPIONs, with dimensions between *ca.* 10 and 20 nm, and quasi-spherical nanoparticle morphologies. Figure S2.B shows the histogram of nanoparticle diameters (n = 114) as measured in TEM images with the best-fit lognormal distribution superimposed. The mean size and the standard deviation from the statistical analysis resulted in being 15.28 ± 4.02 nm. The normality test using the Kolmogorov-Smirnov approximation indicates that the data are significantly drawn from a normally distributed population. The dispersity value, or polydispersity index, of 0.26 was calculated as the ratio between the standard deviation and the mean of the particle diameter distribution, confirming that the size distribution of FSP-SPIONs prepared with the optimized conditions presents a homogeneous population, as indicated by values lower than 0.3 [1].

[1] Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics 2018, 10, 57. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057

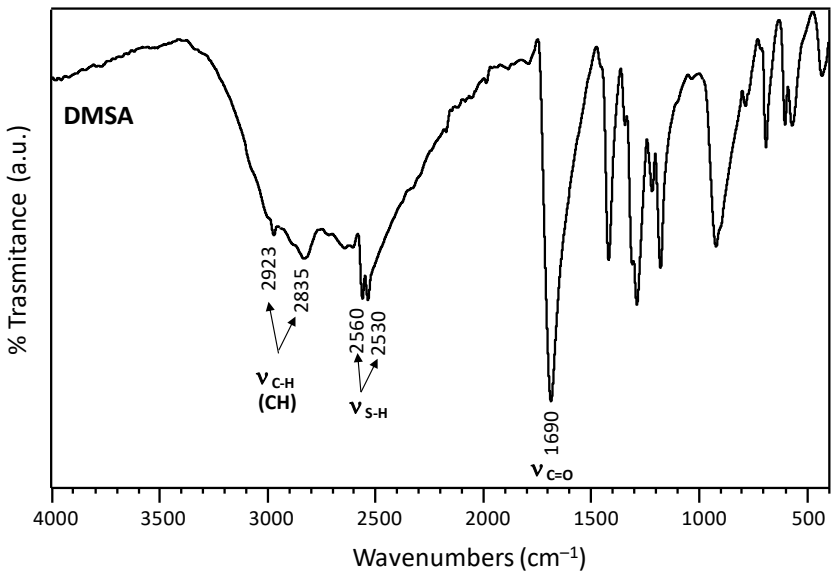


Figure S3. Fourier transform infrared (FTIR) spectrum of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA).

Figure S3 shows the FTIR spectrum of pure DMSA. It is worth of mention the intense signal at 1690 cm^{-1}, which is attributed to the symmetric stretching of the carbonyl group C=O [2]. Moreover, the sharp peaks at 2560 and 2530 cm^{-1} could be originated from the vibrations of the thiol groups (S-H).

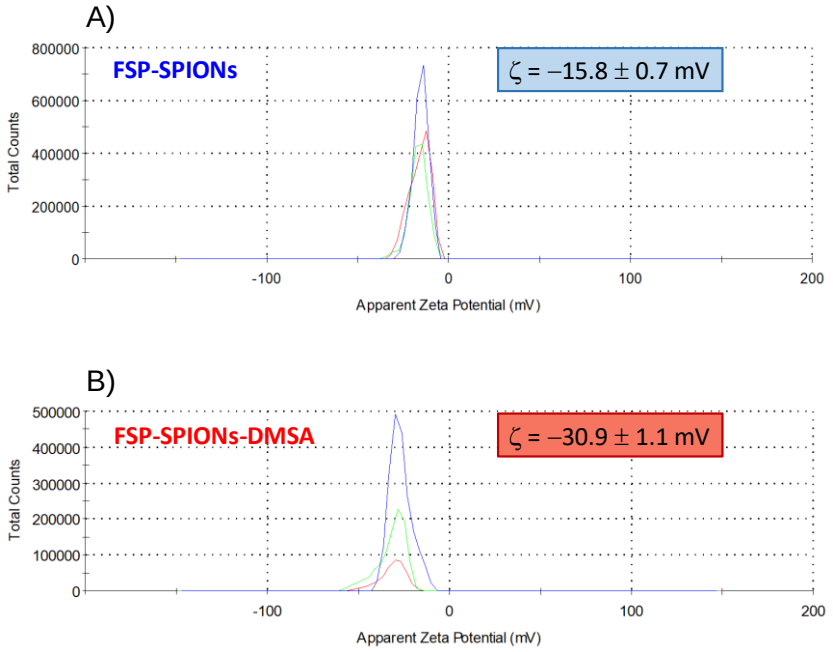


Figure S4. Zeta potential distributions obtained by dynamic light scattering of as-synthetized FSP-SPIONs and DMSA-coated FSP-SPIONs-DMSA nanoparticles suspended in water.

[2] Wierzbinski KR, Szymanski T, Rozwadowska N, Rybka JD, Zimna A, Zalewski T, Nowicka-Bauer K, Malcher A, Nowaczyk M, Krupinski M, Fiedorowicz M, Bogorodzki P, Grieb P, Giersig M, Kurpisz MK. Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts. Sci Rep. 2018 Feb 27;8(1):3682. doi: 10.1038/s41598-018-22018-0.

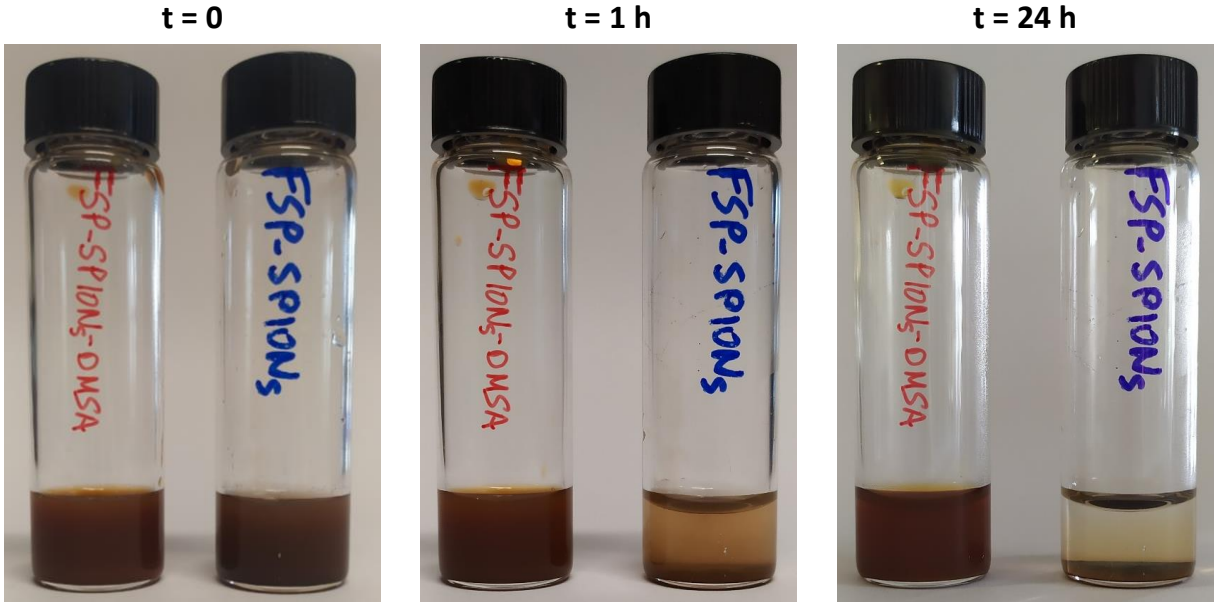


Figure S5. Photographs of the aqueous suspensions of the unmodified FSP-SPIONs (right vials) and the DMSA-coated (left vials) at different times after dispersion in water (t = 0, 1 and 24 hours).

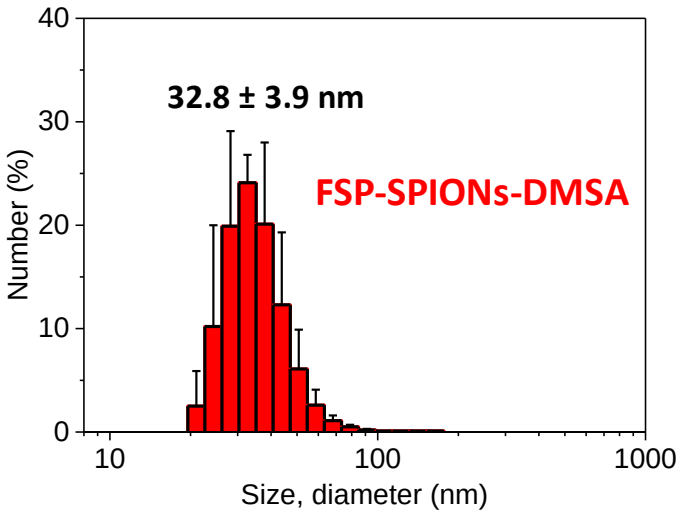


Figure S6. Hydrodynamic size distribution obtained by dynamic light scattering of a sample of FSP-SPIONs-DMSA eleven months after synthesis and kept in aqueous suspension.

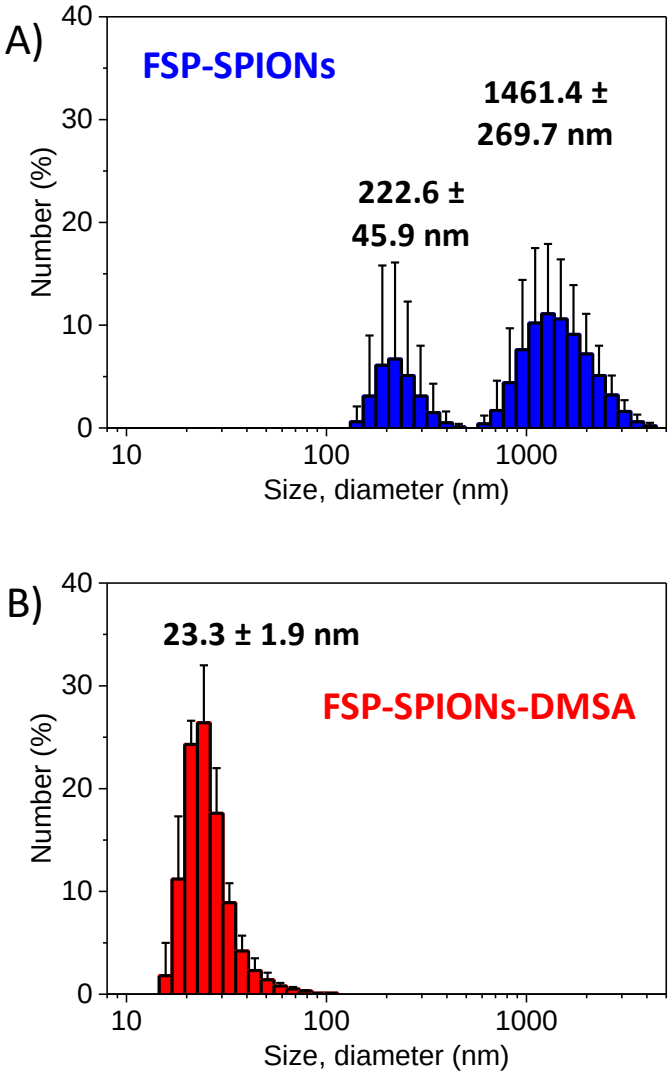


Figure S7. Hydrodynamic size distributions obtained by dynamic light scattering in PBS 1x of A) FSP-SPIONs and B) FSP-SPIONs-DMSA.

4. Conclusiones / Conclusions

Conclusiones

A continuación, se muestran las conclusiones derivadas de la investigación desarrollada en esta tesis doctoral. Todas ellas se basan en la utilización de SPIONs como herramientas para impulsar la regeneración ósea a través del proceso de mecanotransducción desencadenado al aplicar un campo magnético externo.

1. Se han preparado SPIONs de aproximadamente 12 nm mediante descomposición térmica, se recubrieron con DMSA mediante intercambio de ligandos, y después se funcionalizaron con un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) para su direccionamiento hacia las integrinas de la membrana celular. Se confirmó la estabilidad coloidal en medios acuosos proporcionada por el recubrimiento con DMSA y se comprobó la correcta funcionalización con el péptido RGD. Las SPIONs recubiertas con DMSA y funcionalizadas con el péptido RGD preservaron sus propiedades magnéticas iniciales.

   Ambos nanocoloides magnéticos (SPIONs-DMSA y SPIONs-DMSA-RGD) indicaron ser biocompatibles con un alto grado de viabilidad, ciclo celular adecuado y baja producción de ROS en hBM-MSCs. En relación a la internalización, las SPIONs-DMSA-RGD mostraron un mayor grado de captación celular a la vez que un mayor número de mecanismos de endocitosis implicados en su internalización. Este hecho, junto con los resultados del estudio de estabilidad realizado en medio de cultivo demuestran que los mecanismos de endocitosis no sólo dependen de la funcionalización con el ligando RGD, sino también de la evolución del tamaño hidrodinámico a lo largo del tiempo.

   Las SPIONs sintetizadas por descomposición térmica y ensayadas en estado coloidal promovieron la diferenciación osteogénica *in vitro* de hBM-MSCs tras la aplicación de un campo magnético externo de 250 mT y 1 Hz durante 1 h, comenzando la estimulación 30 minutos después de la adición de las SPIONs. Los estudios de mecanotransducción mostraron un aumento significativo de la expresión de los genes osteogénicos *Runx2* y *ALP*, así como de la actividad ALP, siendo más pronunciado en el caso de las SPIONs-DMSA-RGD.

2. Se han diseñado y desarrollado andamios magnéticos, fibrosos y nanoestructurados por el método de electrohilado compuestos por colágeno de tipo I y SPIONs. Para ello, las SPIONs-DMSA preparadas por descomposición térmica e intercambio de ligandos se han incorporado a una solución de colágeno tipo I gracias a su estabilidad coloidal en medio acuoso. Las SPIONs embebidas en las fibras de colágeno conservaron sus propiedades magnéticas. Además, los estudios *in vitro* realizados sobre los andamios demostraron una alta

viabilidad, adhesión y proliferación tanto de hBM-MSCs como de células MC3T3-E1, demostrando la alta biocompatibilidad del sistema final para las aplicaciones biomédicas previstas.

La arquitectura obtenida mediante electrohilado en combinación con el comportamiento superparamagnético de las SPIONs incorporadas, hacen de los andamios desarrollados herramientas muy prometedoras para tratamientos personalizados de regeneración ósea, y para este objetivo final, se están llevando a cabo estudios *in vitro* de diferenciación osteogénica aplicando un campo magnético externo.

3. Se han diseñado y desarrollado andamios magnéticos 3D mediante la combinación de dos técnicas: el modelado por deposición fundida de un filamento polimérico mezcla de tres polímeros (PLLA/PCL/PHBV, 90/5/5 % masa) y la impresión por inyección térmica de tinta por goteo a demanda de suspensiones de SPIONs en la superficie de los andamios previamente fabricados. Este novedoso método ha permitido incorporar SPIONs sintetizadas por descomposición térmica, estabilizadas en medio acuoso y funcionalizadas con un péptido RGD en la superficie de los andamios poliméricos, demostrando la gran precisión y versatilidad de la técnica. Las SPIONs conservaron sus propiedades superparamagnéticas iniciales tras la incorporación en los andamios, además, se mantuvieron estables en la superficie tras 7 días en condiciones fisiológicas.

   La evaluación biológica de los andamios desarrollados reveló una alta biocompatibilidad con hBM-MSCs en términos de viabilidad, adhesión, morfología y proliferación celular. A su vez, el análisis de diferenciación osteogénica mostró un incremento significativo en la expresión del gen *ALP*, la actividad ALP y la mineralización de las hBM-MSCs cultivadas en la superficie de los andamios magnéticos y aplicando el campo magnético externo. Además, se apreció un aumento atribuido a la presencia de SPIONs, otro relacionado con la aplicación del campo magnético, y el mayor aumento cuando las SPIONs se combinaron con el campo magnético externo. Por último, los andamios con SPIONs funcionalizadas con el péptido RGD no mejoran el efecto osteogénico observado en los andamios con SPIONs sin RGD, en contraste con lo observado cuando se administran en suspensión (apartado 3.1.1. de la tesis doctoral). El conjunto de resultados hace de los andamios magnéticos 3D desarrollados herramientas muy prometedoras para tratamientos avanzados y personalizados de regeneración ósea.

4. Se han producido SPIONs de alrededor de 12 nm de diámetro a gran escala mediante la técnica de pirólisis por pulverización en llama (FSP) para aplicaciones biomédicas. Se han optimizado los parámetros de síntesis que conducen a la obtención de tamaños de partícula homogéneos. La producción a gran escala se ha combinado con el tratamiento de la superficie y el recubrimiento con DMSA para conseguir soluciones coloidales acuosas y estables. El producto final (FSP-SPIONs-DMSA) conservó las propiedades magnéticas de las SPIONs recién sintetizadas (FSP-SPIONs). Los estudios de hemocompatibilidad con monocitos y plaquetas, así como los estudios de biocompatibilidad con hBM-MSCs mostraron resultados exitosos para la validación biológica *in vitro* de las FSP-SPIONs-DMSA. Este hecho, añadido a la producción a gran escala, establece una justificación sólida para proponer el uso de estas nanopartículas para aplicaciones biomédicas y constituye un avance significativo en el desarrollo industrial de SPIONs para aplicaciones biomédicas.

Como conclusión general, se puede indicar que las SPIONs sintetizadas por descomposición térmica son una potente herramienta para desencadenar la diferenciación osteogénica, ofrecen una gran versatilidad a la hora de ser integradas en diferentes dispositivos para la regeneración ósea, y la funcionalización de las mismas con el péptido RGD tiene un efecto potenciador en la diferenciación osteogénica cuando se utilizan en estado coloidal pero no cuando se encuentran adheridas a la superficie de un andamio polimérico. Asimismo, las SPIONs sintetizadas por FSP a gran escala ofrecen una alternativa para su uso en aplicaciones biomédicas.

Conclusions

The conclusions derived from the research carried out in this doctoral thesis are shown below. All of them are based on the use of SPIONs as tools to promote bone regeneration through the mechanotransduction process triggered by the application of an external magnetic field.

1. SPIONs of approximately 12 nm were prepared by thermal decomposition, coated with DMSA by ligand exchange, and then functionalized with an Arg-Gly-Asp (RGD) peptide for targeting to cell membrane integrins. The colloidal stability in aqueous media provided by DMSA coating was confirmed and the correct functionalization with the RGD peptide was verified. DMSA-coated SPIONs functionalized with the RGD peptide preserved their initial magnetic properties.

   Both magnetic nanocolloids (SPIONs-DMSA and SPIONs-DMSA-RGD) indicated to be biocompatible with a high degree of viability, adequate cell cycle and low ROS production in hBM-MSCs. Regarding internalization, SPIONs-DMSA-RGD showed a higher degree of cellular uptake as well as a higher number of endocytosis mechanisms involved in their internalization. This fact, together with the results of the stability study performed in culture medium demonstrate that the endocytosis mechanisms not only depend on the functionalization with the RGD ligand, but also on the evolution of the hydrodynamic size over time.

   SPIONs synthesized by thermal decomposition and assayed in colloidal state promoted *in vitro* osteogenic differentiation of hBM-MSCs upon application of an external magnetic field of 250 mT and 1 Hz for 1 h, with stimulation starting 30 min after addition of the SPIONs. Mechanotransduction studies showed a significant increase in the expression of the osteogenic genes *Runx2* and *ALP*, as well as ALP activity, being more pronounced in the case of SPIONs-DMSA-RGD.

2. Magnetic, fibrous and nanostructured scaffolds composed of type I collagen and SPIONs have been designed and developed by electrospinning method. For this purpose, SPIONs-DMSA prepared by thermal decomposition and ligand exchange have been incorporated into a type I collagen solution due to their colloidal stability in aqueous medium. SPIONs embedded in collagen fibres retained their magnetic properties. Moreover, *in vitro* studies performed on the scaffolds showed high viability, adhesion and proliferation of both hBM-MSCs and MC3T3-E1 cells, demonstrating the high biocompatibility of the final system for the intended biomedical applications.

The architecture obtained by electrospinning in combination with the superparamagnetic behaviour of the incorporated SPIONs, make the developed scaffolds very promising tools for personalized bone regeneration treatments, and for this final objective, *in vitro* studies of osteogenic differentiation by applying an external magnetic field are being carried out.

3. 3D magnetic scaffolds have been designed and developed by combining two techniques: fused deposition modelling of a polymeric filament blend of three polymers (PLLA/PCL/PHBV, 90/5/5 mass %) and drop-on-demand thermal inkjet printing of suspensions of SPIONs on the surface of the previously fabricated scaffolds. This novel method allowed the incorporation of SPIONs synthesised by thermal decomposition, stabilised in aqueous media and functionalised with an RGD peptide on the surface of the polymeric scaffolds, demonstrating the high precision and versatility of the technique. The SPIONs retained their initial superparamagnetic properties after incorporation into the scaffolds and were stable on the surface after 7 days under physiological conditions.

   Biological evaluation of the developed scaffolds revealed high biocompatibility with hBM-MSCs in terms of viability, adhesion, morphology and cell proliferation. In turn, osteogenic differentiation analysis showed a significant increase in *ALP* gene expression, ALP activity and mineralisation of hBM-MSCs cultured on the surface of the magnetic scaffolds and applying the external magnetic field. In addition, there was an increase attributed to the presence of SPIONs, an increase related to the application of the magnetic field, and the greatest increase when SPIONs were combined with the external magnetic field. Finally, scaffolds with SPIONs functionalised with the RGD peptide do not improve the osteogenic effect observed in scaffolds with SPIONs without RGD, in contrast to that observed when administered in suspension (section 3.1.1. of the doctoral thesis). These results together make the developed 3D magnetic scaffolds very promising tools for advanced and personalised bone regeneration treatments.

4. SPIONs around 12 nm in diameter have been produced on a large scale using the flame spray pyrolysis (FSP) technique for biomedical applications. Synthesis parameters leading to homogeneous particle sizes have been optimised. Large-scale production has been combined with surface treatment and DMSA coating to achieve stable, aqueous colloidal solutions. The final product (FSP-SPIONs-DMSA) retained the magnetic properties of the newly synthesised SPIONs (FSP-SPIONs). Hemocompatibility studies with monocytes and platelets as well as biocompatibility studies with hBM-MSCs showed successful results for the *in vitro* biological validation of FSP-SPIONs-DMSA. This fact, added to large-scale

production, establishes a strong rationale for proposing the use of these nanoparticles for biomedical applications and constitutes a significant advance in the industrial development of SPIONs for biomedical applications.

As a general conclusion, it can be stated that SPIONs synthesised by thermal decomposition are a powerful tool to trigger osteogenic differentiation, they offer great versatility when integrated into different devices for bone regeneration, and their functionalisation with the RGD peptide has an enhancing effect on osteogenic differentiation when used in a colloidal state but not when attached to the surface of a polymeric scaffold. Furthermore, SPIONs synthesised by FSP on a large scale offer an alternative for use in biomedical applications.

Anexo I. Glosario de abreviaturas y siglas

Abreviaturas y siglas

2D: bidimensional

3D: tridimensional

AC6: adenilil ciclasa 6, del inglés *adenylyl ciclase 6*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALP: fosfatasa alcalina, del inglés *alkaline phosphatase*

AM: fabricación aditiva, del inglés *additive manufacturing*

AMPc: adenosín monofosfato cíclico, del inglés *cyclic adenosine monophosphate*

ATP: adenosín trifosfato, del inglés *adonosine triphosphate*

***Bglap*:** gen codificante para la proteína ósea del ácido gamma-carboxiglutámico u osteocalcina, del inglés *bone gamma-carboxyglutamic acid protein*

BLC: células de revestimiento óseo, del inglés *bone lining cells*

BMP: proteínas morfogenéticas óseas, del inglés *bone morphogenetic proteins*

BSA: albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

BSE: electrones retrodispersados, del inglés *backscattered electrons*

BTE: ingeniería tisular ósea, del inglés *bone tissue engineering*

CAD: diseño asistido por computadora, del inglés *computer-aided design*

cDNA: ADN complementario

***Col1a1*:** gen codificante de la cadena α del colágeno I

COX-2: ciclooxigenasa-2, del inglés *cyclooxygenase-2*

Ct: ciclo umbral, del inglés *threshold cycle*

DAPI: marcador fluorescente 4´6-diamidino-2-fenilindol, del inglés *4´6-Diamidino-2-phenylindole*

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína, del inglés *2',7'-dichlorofluorescein*

D_H: diámetro hidrodinámico, del inglés *hydrodynamic diameter*

DLS: dispersión de luz dinámica, del inglés *dynamic light scattering*

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco, del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSA: ácido dimercaptosuccínico, del inglés *dimercaptosuccinic acid*

DMSO: dimetilsulfóxido, del inglés *dimethyl sulfoxide*

DNA: ácido desoxirribonucleico, del inglés *deoxyribonucleic acid*

DoD: goteo a demanda, del inglés *drop on demand*

DTA: análisis térmico diferencial, del inglés *differential thermal analysis*

ECM: matriz extracelular, del inglés *extracellular matrix*

EDC/NHS: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)/N-hidroxisuccinimida

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*

EE.UU.: Estados Unidos

EMF: campo electromagnético, del inglés *electromanetic field*

EPI: epinefrina, del inglés *epinephrine*

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*

FA: adhesiones focales, del inglés *focal adhesions*

FAK: quinasa de adhesión focal, del inglés *kinase focal adhesion*

FBS: suero fetal bovino, del inglés *fetal bovine serum*

FDA: administración de alimentos y medicamentos, del inglés *Food and Drug Administration*

FN: fibronectina, del inglés *fibronectin*

FSS: tensiones de cizallamiento por el flujo del fluido, del inglés *fluid shear stresses*

FSP: pirólisis por pulverización en llama, del inglés *flame spray pyrolysis*

FTIR: infarrojo transformado de Fourier, del inglés *Fourier transformed infrared*

G0/G1: fase de crecimiento del ciclo celular

G2/M: fase de crecimiento y mitosis del ciclo celular

GA-1000: sulfato de gentamicina-amfotericina, del inglés *gentamicin sulfate-amphotericin*

***GAPDH*:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, del inglés *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

H2DCFDA: diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

HA: hidroxiapatita, del inglés *hydroxyapatite*

hBM-MSCs: células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea, del inglés *human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico, del inglés *4-(2hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid*

hMSCs: células madre mesenquimales humanas, del inglés *human mesenchymal stem cells*

HRTEM: microscopía electrónica de alta resolución, del inglés *high-resolution transmission electron microscopy*

ICP-AES: espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, del inglés *inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*

ICP-OES: espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente, del inglés *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*

IL: interleuquina, del inglés *interleukin*

IONPs: nanopartículas de óxido de hierro, del inglés *iron oxide nanoparticles*

LINC: enlazador del nucleoesqueleto y el citoesqueleto, del inglés *linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton*

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés *mitogen-activated protein kinase*

MC3T3-E1: línea celular clonal de osteoblastos inmaduros derivada de ratón

MCGS: suplemento para el crecimiento de células mesenquimales, del inglés *mesenchymal cell growth supplement*

MF: campo magnético, del inglés *magnetic field*

MMP: metaloproteinasa de matriz, del inglés *matrix metalloproteinase*

MNPs: nanopartículas magnéticas, del inglés *magnetic nanoparticles*

MRI: imagen por resonancia magnética, del inglés *magnetic resonance imaging*

MSCBM: medio basal de células madre mesenquimales, del inglés *mesenchymal stem cell basal medium*

MSCs: células madre mesenquimales, del inglés *mesenchymal stem cells*

NA: apertura numérica, del inglés *numerical aperture*

NFAT: factor nuclear de células T activadas, del inglés *nuclear factor of activated T cells*

NO: óxido nítrico, del inglés *nitric oxide*

NPs: nanopartículas, del inglés *nanoparticles*

OPG: osteoprotegerina, del inglés *osteoprotegerin*

PB: sangre periférica, del inglés *peripheral blood*

PBS: tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*

PCL: policaprolactona, del inglés *polycaprolactone*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

PDGF: factores de crecimiento derivados de plaquetas, del inglés *platelet-derived growth factors*

PGA: ácido poliglicólico, del inglés *polyglycolic acid*

PGE2: prostaglandina E2, del inglés *prostaglandin E2*

PHBV: poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), del inglés *poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)*

PI: yoduro de propidio, del inglés *propidium iodide*

PIR: respuestas inmunitarias primarias, del inglés *primary immune responses*

PKA: proteína quinasa A, del inglés *kinase protein A*

PLA: ácido poliláctico, del inglés *polylactic acid*

PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico), del inglés *poly(lacti-co-glycolic acid)*

PLLA: ácido poliláctico, del inglés *polylactic acid*

pNPP: p-nitrofenil fosfato, del inglés *p-nitrophenyl phosphate*

PPP: plasma pobre en plaquetas, del inglés *platelet-poor plasma*

Ppp3Ca: calcineurina, serina/treonina fosfatasa heterodimérica dependiente de calcio y calmodulina, del inglés *protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha*

PRP: plasma rico en plaquetas, del inglés *platelet-rich plasma*

PVA: alcohol polivinílico, del inglés *polyvinyl alcohol*

qRT-PCR: PCR cuantitativa de transcripción inversa en tiempo real, del inglés *real-time quantitative reverse transcription PCR*

RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-beta, del inglés *receptor activator of nuclear factor kappa-beta ligand*

RGD: Arg-Gly-Asp, arginina-glicina-ácido aspártico

RhoA: miembro A de la familia Ras, del inglés *Ras homolog family member A*

RNA: ácido ribonucleico, del inglés *ribonucleic acid*

RNAse: ribonucleasa, del inglés *ribonuclease*

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

RT: temperatura ambiente, del inglés *room temperature*

Runx2: factor de transcripción 2 relacionado con Runt, del inglés *Runt-related transcription factor 2*

S: fase de síntesis de ADN del ciclo celular

SEM: microscopía electrónica de barrido, del inglés *scanning electron microscopy*

SMF: campo magnético estático, del inglés *static magnetic field*

SOD: superóxido dismutasa, del inglés *superoxide dismutase*

SPIONs: nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, del inglés *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*

SQUID: dispositivo superconductor de interferencia cuántica, del inglés *superconducting quantum interference device*

SSC: dispersión lateral, del inglés *side-scatter*

TCP: fosfato tricálcico, del inglés *tricalcium phosphate*

TCP: poliestireno tratado con plasma o placa de cultivo tisular, del inglés *tissue culture plate*

TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés *transmission electron microscopy*

TGA: análisis termogravimétrico, del inglés *thermogravimetric analysis*

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta, del inglés *transforming growth factor beta*

TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *tumour necrosis factor alpha*

TRAP: fosfatasa ácida resistente al tartrato, del inglés *tartrate resistant acid phosphatase*

TRAP: péptidos similares a la trombina, del inglés *thrombin receptor-activating* protein

TREK-1: canal iónico de potasio

UV: ultravioleta

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *vascular endothelial growth factor*

VSM: magnetometría de muestra vibrante, del inglés *vibrating sample magnetometry*

XRD: difracción de rayos X, del inglés *X-ray diffraction*

YAP1: regulador transcripcional asociado a Yes1, del inglés *yes-associated protein 1*

Anexo II. Glosario de materiales desarrollados

Materiales desarrollados

SPIONs-OA **Fe_3O_4-OA**	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas por descomposición térmica y recubiertas con ácido oleico
SPIONs-DMSA **Fe_3O_4-DMSA**	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas por descomposición térmica y recubiertas con ácido dimercaptosuccínico
SPIONs-DMSA-RGD	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas por descomposición térmica, recubiertas con ácido dimercaptosuccínico y funcionalizadas con el péptido RGD
20% N_COL	Andamios preparados por electrohilado procesando una formulación con un 20% (m/v) de colágeno en ácido acético al 40%
20% N_COL/2% SPIONs	Andamios preparados por electrohilado procesando una formulación de colágeno 20% (m/v) y un 2% nominal (m/m) de Fe_3O_4-DMSA con respecto la masa de colágeno en ácido acético al 40%
SC	Andamios poliméricos 3D fabricados por modelado por deposición fundida con un filamento compuesto de una mezcla de 3 polímeros, PLLA/PCL/PHBV (90/5/5 % respectivamente)
DMSA 25L	Andamios poliméricos 3D (SC) con 25 capas de impresión por inyección de tinta de SPIONs-DMSA en la superficie

RGD 25L	Andamios poliméricos 3D (SC) con 25 capas de impresión por inyección de tinta de SPIONs-DMSA-RGD en la superficie
DMSA 50L	Andamios poliméricos 3D (SC) con 50 capas de impresión por inyección de tinta de SPIONs-DMSA en la superficie
RGD 50L	Andamios poliméricos 3D (SC) con 50 capas de impresión por inyección de tinta de SPIONs-DMSA-RGD en la superficie
FSP-SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas mediante pirólisis por pulverización en llama
FSP-SPIONs*	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas mediante pirólisis por pulverización en llama tras la activación de la superficie
FSP-SPIONs-DMSA	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas mediante pirólisis por pulverización en llama y recubiertas con ácido dimercaptosuccínico

Anexo III. Técnicas de caracterización fisicoquímica y bioanalíticas

A.III.1. Técnicas de caracterización fisicoquímica

Para desarrollar un material es imprescindible la utilización de técnicas analíticas que ofrezcan información sobre las propiedades estructurales y fisicoquímicas del mismo en las distintas etapas de síntesis. A continuación, se detallan las principales técnicas de caracterización utilizadas en la presente tesis doctoral junto con la información obtenida de cada una de ellas.

Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X es una técnica de caracterización estructural de sólidos cristalinos que consiste en hacer incidir un haz de rayos X monocromático a través de la muestra sujeta a estudio. Como consecuencia de la cristalinidad de la muestra, reflejada en las propiedades de simetría de las ordenaciones regulares de los átomos constituyentes, se produce un efecto de interferencia constructiva de las ondas de rayos X dispersadas por cada átomo, teniendo esta interferencia una amplitud máxima para ciertos ángulos de incidencia de la radiación sobre la muestra. La ley de Bragg (Ecuación i) relaciona el espaciado entre planos cristalinos, característico de cada fase, la longitud de onda incidente y el ángulo de dispersión.

$$n\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta \qquad \text{(Ecuación i)}$$

Donde n es un numero entero, λ es la longitud de onda de la radiación, d es la distancia interplanar y θ es el ángulo de incidencia. De acuerdo con la ley de Bragg, la difracción sólo se da en determinados ángulos, de modo que las intensidades y posiciones de los máximos de difracción dan información de la estructura del material. Esta técnica permite identificar las distintas fases cristalinas y, en algunas ocasiones, elementos químicos que componen una muestra por comparación con patrones de estructuras conocidas. Estos patrones de difracción de rayos X se pueden encontrar en distintas bases de datos.

En esta tesis doctoral, la estructura cristalina de las SPIONs se analizó mediante XRD utilizando un difractómetro Philips X'Pert operando con radiación CuKα (λ = 1,5406 Å), (Philips Electronics NV, Eindhoven, Países Bajos). Los patrones de XRD se recogieron entre 10° y 80° (2θ), con un tamaño de paso de 0,04° y un tiempo de contacto de 5 s por paso.

Adsorción de nitrógeno

La adsorción física de nitrógeno es una técnica que permite analizar las propiedades texturales de los sólidos (superficie específica, volumen y tamaño de poro). Esta técnica se basa en la interacción que tiene lugar entre el nitrógeno gas (adsorbato)

y el sólido que se quiere caracterizar (adsorbente). Los resultados del análisis de fisisorción de gases se expresan en forma de isotermas de adsorción-desorción que relacionan el volumen de gas retenido por la superficie del sólido en función de las condiciones de presión. La interpretación de estas isotermas mediante diferentes modelos matemáticos permite obtener valores para las propiedades texturales. Las propiedades que caracterizan texturalmente a un sólido son varias, aunque las más empleadas suelen ser la superficie específica, el volumen total de poro y la distribución de tamaños de poro. La superficie específica (SSA) proporciona la superficie del sólido por unidad de masa. En la presente tesis doctoral, este valor se ha determinado utilizando el modelo matemático B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller). El análisis de adsorción de nitrógeno de las SPIONs se utilizó para estimar el tamaño de partícula mediante la Ecuación (ii) [1], donde d es el diámetro de partícula, SSA la superficie específica y ρ la densidad de las nanopartículas.

$$d = 6000/SSA\rho \qquad \text{(Ecuación ii)}$$

Las mediadas de adsorción de nitrógeno se llevaron a cabo en un equipo Tristar II 3020 multimuestra.

Potencial zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) es una medida que determina la diferencia de potencial existente ente el medio de dispersión y la capa de fluido estacionaria sobre la superficie de los materiales en dispersión. Esta técnica proporciona información sobre la carga superficial de las partículas. Su magnitud indica el grado de las repulsiones electrostáticas entre partículas cargadas adyacentes en una dispersión. Durante esta tesis doctoral, la medición del potencial ζ se ha empleado para estudiar la carga eléctrica superficial de las SPIONs desarrolladas y para determinar los cambios producidos en las mismas después de la modificación de la superficie, ayudando a confirmar la correcta funcionalización de dichas nanopartículas.

Las medidas se realizaron en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) equipado con un láser de 633 nm.

Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una técnica utilizada para medir la distribución de tamaños de partículas, emulsiones o moléculas que se encuentran dispersas o disueltas en un líquido. La técnica de DLS se fundamenta en irradiar la muestra con un haz láser y monitorizar los fotones dispersos en ángulos específicos durante cortos intervalos de tiempo. El movimiento browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades.

Las partículas pequeñas se mueven rápidamente generando fluctuaciones rápidas de la intensidad de dispersión, al contrario que las partículas más grandes. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein (Ecuación iii).

$$D = kT/6\pi\eta r \qquad \text{(Ecuación iii)}$$

En dicha ecuación D es el coeficiente de difusión, que está relacionado con el tamaño hidrodinámico de la partícula, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η la viscosidad del líquido de la disolución y r el radio de la partícula supuestamente esférica. En el caso de los materiales producidos durante esta tesis doctoral, esta técnica se ha utilizado para evaluar la correcta síntesis de las SPIONs (indicada por la ausencia de grandes agregados) así como la estabilidad coloidal de las mismas tras los recubrimientos o la funcionalización. Las medidas de DLS se han llevado a cabo en el mismo instrumento que las de potencial ζ (Malvern).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica es capaz de proporcionar imágenes tridimensionales de alta resolución de la superficie de una muestra basándose en las interacciones producidas entre los electrones y el material analizado. El microscopio electrónico de barrido genera un haz de electrones que incide sobre la superficie de una muestra opaca a los mismos mientras se realiza un barrido en las direcciones X e Y para formar una imagen. Los electrones secundarios y/o retrodispersados son recogidos por un detector para formar la imagen final. La imagen obtenida por la detección de los electrones secundarios refleja la fina estructura topográfica de la superficie de la muestra. Una imagen con electrones retrodispersados refleja la distribución composicional en la superficie de una muestra. Estos microscopios disponen de una gran profundidad de campo que permite enfocar gran parte de la muestra al mismo tiempo. Para ser evaluadas por esta técnica, las muestras han de ser conductoras, esto se consigue recubriéndolas con una capa muy fina de materiales conductores como son el grafito, el platino o el oro.

En esta tesis doctoral la microscopía electrónica de barrido se ha empleado para caracterizar la morfología de los diferentes andamios desarrollados, así como para visualizar las células adheridas en su superficie de los mismos. Los análisis se han realizado en diferentes microscopios electrónicos: JEOL JSM-7600F (Tokio, Japón) o JEOL JEM-2100 (Tokio, Japón), instalados en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid; microscopio electrónico de barrido de sobremesa Phenom XL (Phenom-World B.V., Eindhoven, Países Bajos) instalado en los laboratorios del grupo de investigación liderado por la profesora Chiara Vitale Brovarone del *Politecnico di Torino*.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se utiliza para caracterizar y estudiar materiales de diversa naturaleza, incluso a escala atómica mediante TEM de alta resolución (HRTEM). El instrumento utiliza un haz de electrones suficientemente acelerados que colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una graduación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final con distintas intensidades de gris que se corresponden con el grado de dispersión de los electrones incidentes. Esta técnica proporciona imágenes que aportan información sobre el tamaño, la morfología, la cristalinidad o la porosidad del material, entre otros. La microscopía electrónica de transmisión se ha empleado durante esta tesis principalmente para evaluar la morfología, el tamaño de partícula y la homogeneidad de las SPIONs. Además, esta técnica ha permitido observar la distribución de las SPIONs dentro de las fibras electrohiladas de colágeno.

Las imágenes de TEM se han obtenido con diferentes microscopios electrónicos: JEOL JEM 1400 y 2100 (Tokio, Japón) que operan a 120 y 200 Kv respectivamente y están equipados con una cámara CDD (KeenView Camera), estos microscopios están instalados en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid; microscopio FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN iCorr, instalado en los laboratorios del grupo de investigación liderado por el profesor Lorenzo Moroni de la Universidad de Maastricht.

Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

La espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX o EDS) es una técnica analítica que se utiliza para identificar y cuantificar la composición elemental de pequeñas áreas concretas de un material sólido. Generalmente esta técnica se encuentra acoplada a las técnicas de TEM y SEM. La muestra se bombardea con electrones y los rayos X producidos son medidos en un espectroscopio de rayos X. La energía de los fotones emitidos es característica de cada peso atómico del elemento emisor. Esto se debe a que la diferencia de energía entre orbitales aumenta conforme lo hace el peso atómico (ya que aumentan los protones en el núcleo). De este modo es posible correlacionar la energía emitida de cada fotón con los elementos presentes en la muestra (análisis cualitativo) y el número de fotones emitidos de cada energía con la cantidad relativa de cada elemento (análisis semicuantitativo).

Esta técnica ha permitido reafirmar la composición de los depósitos de óxido de hierro presentes en la superficie de los andamios poliméricos tridimensionales.

Análisis químico elemental

El análisis químico elemental o microanálisis químico es una técnica que proporciona la cantidad de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre (C, H, N y S) presente en un material. El análisis se basa en la volatilización de una muestra por combustión total bajo una atmósfera de oxígeno para que las moléculas orgánicas se conviertan en gases simples, como CO_2, H_2O, NO_X y SO_X. En un proceso posterior de reducción, los NO_X y SO_X se transforman en N_2 y SO_2, respectivamente. Todos los gases formados se separan mediante una columna de cromatografía y son analizados cuantitativamente en un detector. La cantidad total de cada uno de ellos se mide gracias a su conductividad térmica.

Esta técnica se ha utilizado para evaluar el éxito de los recubrimientos de las SPIONs con DMSA y la funcionalización con el péptido RGD.

Las medidas de análisis químico elemental se han llevado a cabo con un equipo Perkin Elmer 2400 CHN y un LECO CHNS-932.

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra de forma continua a consecuencia de aplicar un calentamiento controlado (rampa de calentamiento en una atmósfera controlada). Sus resultados son representaciones de la masa de la muestra respecto a la temperatura, aunque puede sustituirse la temperatura por el tiempo (diagramas isotermos). Puesto que se analiza la pérdida o ganancia de masa, la termogravimetría aporta información acerca de si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes.

En particular, esta técnica se ha empleado durante esta tesis para evaluar el recubrimiento con DMSA y la cantidad de materia orgánica presente en la superficie de las SPIONs. Las medidas se realizaron en un equipo Perkin Elmer Pyris Diamond (Perkin Elmer, CA, EE.UU.) colocando aproximadamente 5 mg de muestra en un crisol de platino y calentando a 800 °C a 5 °C/min bajo una tasa de flujo de aire de 100 mL/min. La diferencia de masa (en % absoluto) entre 150 °C y 600 °C es la atribuida a la cantidad de materia orgánica presente en el nanomaterial.

Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de radiación infrarroja sobre una muestra y posteriormente determinar la radiación incidente absorbida. Las bandas que presentan los espectros obtenidos vienen determinadas por las frecuencias de vibración de los enlaces que forman las estructuras moleculares y son únicas para una muestra en

particular. De este modo es posible detectar multitud de grupos funcionales presentes en los materiales. La fortaleza de los enlaces, la masa de los átomos implicados, la simetría de la molécula y sus modos normales de vibración son factores que definen las absorciones activas, por lo que el espectro es característico de cada compuesto analizado.

La espectroscopía FTIR presenta una amplia aplicación, ya que permite analizar líquidos, geles, superficies, polvos... En particular, esta técnica se ha empleado durante esta tesis para confirmar la correcta incorporación de grupos químicos a la superficie de las SPIONs mediante la identificación de su frecuencia de vibración.

Los espectros FTIR de las muestras se han registrado entre 4000 y 400 cm^{-1} en un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus 470 en modo de reflectancia total atenuada.

Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES)

La técnica ICP-AES se emplea para cuantificar de manera muy precisa la composición elemental de una muestra. Esta técnica se basa en la emisión de fotones de analitos que son llevados a un estado excitado mediante el uso de plasma de alta energía de un gas inerte como el argón. Cuando el analito es excitado los electrones intentan disipar la energía inducida moviéndose a un estado fundamental de menor energía, al hacer esto emiten el exceso de energía en forma de luz. El color que se emite desde el analito es indicativo de los elementos presentes (radiación electromagnética en longitudes de onda característica de un elemento particular), y la intensidad de la señal es indicativa de la concentración de los mismos.

Esta técnica posee límites de detección muy bajos y permite cuantificar varios elementos en un mismo análisis. Habitualmente se utiliza para cuantificar iones en disolución. Durante esta tesis doctoral se ha utilizado para conocer la concentración de óxido de hierro de todas las muestras de SPIONs utilizadas, a través de la cuantificación del Fe presente en las mismas. Antes de realizar el análisis, la muestra se somete a un tratamiento de digestión para favorecer la disolución los componentes sólidos de la muestra a analizar. El quipo empleado fue un aparato ICP Perkin Elmer Optima 2100 DV.

Magnetometría

La magnetometría ofrece información acerca de las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales sometidos a estudio. Las técnicas utilizadas en esta tesis para medir las propiedades magnéticas de los materiales desarrollados han sido la magnetometría de muestra vibrante (VSM) y la magnetometría SQUID.

La magnetometría de muestra vibrante permite obtener con gran precisión los valores de magnetización de una muestra en diferentes condiciones de temperatura y campo magnético. En una medida de VSM la muestra se sitúa dentro de un campo magnético generado por el instrumento para magnetizar la muestra. Posteriormente, un sistema de vibración hace vibrar la muestra a alta frecuencia para que se genere un campo magnético secundario debido a la magnetización de la muestra. El campo magnético secundario es detectado a través de la inducción de una tensión en una bobina de detección. Esta tensión es proporcional a la magnetización de la muestra. Finalmente, la señal procesada y analizada sirve para determinar las propiedades magnéticas de la muestra, tales como la magnetización remanente, la coercitividad, la magnetización de saturación y la susceptibilidad magnética. Esta técnica ha permitido medir las propiedades magnéticas de los andamios electrohilados y de las nanopartículas antes y después de su transferencia al medio acuoso. Los bucles de histéresis se midieron a 290 K y 5 K hasta 5 T. Para ello se utilizó un magnetómetro de muestra vibrante MagLabVSM (Oxford Instrument, High Wycombe, Reino Unido) ubicado en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC).

La magnetometría con sensor de tipo SQUID (dispositivo superconductor de interferencia cuántica, del inglés *superconducting quantum interference device*) es una técnica muy precisa para detectar campos magnéticos e imanaciones muy pequeñas. Esta técnica experimental está basada en el efecto Josephson [2], que consiste en la aparición de una corriente eléctrica por efecto túnel entre dos superconductores separados, altamente sensible a la presencia de campos magnéticos. Esta técnica se ha utilizado para medir la variación de la magnetización con el campo aplicado de algunas de las nanopartículas y andamios magnéticos desarrollados. Los bucles de histéresis se midieron a 298 K hasta 5 T. Para ello se utilizó un magnetómetro MPMS-XL tipo SQUID de la Unidad de Magnetometría y Criogenia de la UCM.

A.III.2. Técnicas bioanalíticas

En este apartado se describen las técnicas bioanalíticas utilizadas para la evaluación funcional *in vitro* de las nanopartículas y los andamios desarrollados en la presente tesis doctoral.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar distintas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en un medio acuoso. Una peculiaridad de este tipo de análisis consiste en que las células o partículas se hacen pasar individualmente por un haz luminoso con la ayuda de un flujo laminar para ser analizadas una a una. La información acerca de múltiples parámetros celulares se recoge a través de la dispersión generada y de la emisión de fluorescencia de los fluorocromos presentes en las células o partículas. El sistema de detección recoge la dispersión frontal denominada *forward scatter* (FSC) en un detector situado en la misma dirección al haz de luz incidente, y la dispersión lateral denominada *side scatter* (SSC) en un detector situado a 90° respecto al haz. La FSC ofrece información del tamaño de las células, mientras que la SSC aporta información acerca de la complejidad y granularidad de las mismas. Asimismo, los detectores de fluorescencia recogen la señal de emisión fluorescente de los múltiples fluorocromos que pueden ser utilizados como marcadores. Además, esta técnica permite contar y clasificar las células en diferentes poblaciones en función de los parámetros analizados (tamaño, complejidad celular y presencia de marcadores).

La citometría de flujo se ha utilizado en esta tesis doctoral para evaluar diferentes parámetros celulares. Mediante el análisis de fluorescencia y la utilización de diferentes marcadores se ha podido estudiar la viabilidad celular, el contenido intracelular de ROS y la progresión del ciclo celular. A través de la complejidad celular se ha evaluado la incorporación de SPIONs en las células. El equipo utilizado es un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) de la Unidad de Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia del CAI de Técnicas Biológicas de la UCM.

Microscopía confocal de fluorescencia

La microscopía confocal de fluorescencia detecta y recoge la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Esto es posible porque, por una parte, la fuente de iluminación utilizada es luz láser en la que el haz monocromático se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Esta luz ilumina las muestras con una intensidad muy elevada y estable, permitiendo conseguir resoluciones microscópicas a nivel subcelular. Por otra parte, este tipo de microscopía se basa en el

uso de un “pinhole" o colimador (apertura situada delante del fotomultiplicador) que elimina la luz fuera de foco (luz procedente de planos de la muestra que no están enfocados) para obtener imágenes a escala micrométrica de capas discretas del plano focal. Mediante el apilamiento de las distintas capas individuales se pueden generar imágenes en 3D. Su uso está muy extendido dentro del campo de la investigación biomédica, ya que permite el seguimiento y análisis de procesos biológicos o tejidos mediante el marcaje de las biomoléculas con marcadores fluorescentes.

En la presente tesis doctoral, la microscopía confocal de fluorescencia permitió evaluar la adhesión y la morfología de las células en contacto con las SPIONs y con los diferentes andamios desarrollados. Para ello es necesario marcar las células con moléculas fluorescentes. En este caso se ha utilizado DAPI para marcar los núcleos celulares (visualización en el azul) y faloidina para marcar los filamentos de actina que forman el citoesqueleto (visualización en el rojo). Las imágenes han sido adquiridas con un microscopio laser confocal FluoView-1200, Olympus.

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. Esta técnica analítica mide la intensidad incidente y la intensidad transmitida de la radiación con una longitud de onda discreta que atraviesa una muestra. Que la radiación sea absorbida o transmitida depende de la composición de la muestra y la longitud de onda de la radiación.

La luz presenta una cantidad de energía que es inversamente proporcional a su longitud de onda. De forma que, las longitudes de onda más cortas transportan más energía y las longitudes de onda más largas transportan menos energía. La absorción de la radiación por una sustancia provoca la promoción de los electrones a un nivel energético más alto (estado excitado), para que esto ocurra, se necesita una cantidad específica de energía que es diferente según la molécula o sustancia en cuestión. Por ello la absorción de la luz ocurre en diferentes longitudes de onda para diferentes sustancias.

La espectroscopía UV-Vis permite obtener información sobre la composición y concentración de las muestras. En esta tesis se ha empleado para estudiar la proliferación celular, la actividad fosfatasa alcalina y la mineralización. Para todas estas medidas se ha empleado un lector de microplacas multimodo FLUOstar Omega (BMG LABTECH) en modo de detección absorbancia UV-Vis a la longitud de onda adecuada en cada caso.

Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica que se basa en la excitación de los electrones de las moléculas de ciertos compuestos con un haz de luz desde su estado electrónico fundamental a uno de sus estados electrónicos excitados. Esto ocurre mediante la absorción de fotones de una determinada longitud de onda. Cuando una molécula fluorescente absorbe fotones de luz puede pasar a distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado. Las colisiones entre las moléculas excitadas ocasionan la pérdida de energía vibracional, alcanzando así el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado. Tras esto, la molécula fluorescente vuele a su estado electrónico fundamental perdiendo parte de la energía absorbida mediante la emisión de un fotón de una longitud de onda distinta a la de excitación. Los fotones emitidos tendrán diferentes energías en función del estado vibracional del que desciendan.

En esta tesis doctoral, la espectroscopía de fluorescencia se ha utilizado para estudiar la viabilidad celular de preosteoblastos y hBM-MSCs en contacto con las SPIONs y los andamios electrohilados. Las medidas de fluorescencia se realizaron con un lector de microplacas BioTek Synergy 4 (BioTek Instruments GmbH, Alemania).

PCR cuantitativa de transcripción inversa (qRT-PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN concreto gracias a la capacidad natural de la ADN polimerasa para replicar hebras de ADN. Para este fin, el proceso experimental implica ciclos de temperatura que provocan la separación de las hebras recién formadas después de la replicación para, a continuación, volver a replicarse. En la primera etapa, la temperatura se eleva hasta 94-96 °C para desnaturalizar la doble cadena de ADN por calentamiento. En la siguiente etapa se baja la temperatura hasta 55 °C para que se dé la hibridación del cebador (*primer*), este se une a la secuencia complementaria en el ADN molde. La siguiente etapa, conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del *primer* por acción de la ADN polimerasa, que incorpora las bases opuestas de la hebra de ADN molde empleando como sustrato los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 °C porque es la temperatura a la cual la *Taq* polimerasa (enzima más utilizada) alcanza su mayor actividad. Al final del proceso se lleva a cabo una etapa a 70-74 °C para garantizar la amplificación total.

Para poder cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra, se utiliza la PCR cuantitativa (qPCR), la cual se basa en el empleo de cebadores con sondas fluorescentes o ácidos nucleicos marcados con fluorescencia, permitiendo la

monitorización del producto tras cada ciclo de PCR (cada vez que se replica una cadena se emite una señal de luz).

Por su parte, la qRT-PCR permite analizar la expresión génica y compararla entre distintas condiciones. El flujo de información desde el ADN al ARN constituye lo que se denomina expresión génica. De modo que con esta técnica se pretende cuantificar el ARN de un determinado gen en las muestras de estudio. Por otro lado, el paso de información de ARN a ADN es posible gracias a la acción de un enzima denominada transcriptasa inversa. La principal función de este enzima es sintetizar ADN (denominado ADN complementario) a partir de una plantilla de ARN.

Así, para analizar el ARN de una muestra se puede llevar a cabo una qRT-PCR, la cual consta de las siguientes etapas:

- Aislamiento y purificación del ARN contenido en las células: este proceso se puede realizar mediante extracción con solventes orgánicos (por ejemplo, derivados del fenol).
- Retrotranscripción: el ARN mensajero servirá como plantilla para la acción de la retrotranscriptasa, que sintetizará moléculas de ADN complementario.
- Amplificación del ADN complementario: a través de la utilización de oligonucleótidos específicos (*primers*) que actuarán como cebadores de la acción de la polimerasa, se amplificará el ADN complementario de los genes de interés. Gracias a la utilización de *primers* marcados con sondas fluorescentes es posible evaluar cuantitativamente la expresión relativa de los genes de interés.

A continuación, se detalla la metodología experimental llevada a cabo para analizar la expresión de los genes *ALP* y *Runx2* en las hBM-MSCs expuestas a las SPIONs y los andamios desarrollados en la presente tesis doctoral.

Para realizar la extracción del ARN de las células, se retira el medio de cultivo y se lava una vez con PBS. Se añade un volumen adecuado de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a cada pocillo, este volumen varía dependiendo de la superficie de cultivo (1 mL en el caso de utilizar placas de 6 pocillos). Seguidamente se recoge el volumen con cuidado de levantar las células y se transfiere a un *eppendorf* de 2 mL. A cada muestra se añade el volumen adecuado de cloroformo (200 µL para placas de 6 pocillos) y se agita con vortex durante 15 s. Tras la agitación se deja reposar 15 min a temperatura ambiente para favorecer la separación de fases. Transcurrido este tiempo, se centrifugan las muestras a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El producto resultante presenta dos fases, la superior está compuesta por el ADN y el ARN. Se recoge la fase superior y se añade el volumen correspondiente de isopropanol (500 µL para placas de 6 pocillos). Se invierten los tubos varias veces y se deja reposar 10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifuga a 10.000 rpm a 4 °C, obteniéndose el pellet de ARN y el sobrenadante donde se encuentra el ADN. Se retira el sobrenadante de ADN y el pellet de ARN se resuspende en 1 mL de etanol absoluto y se mantiene 24 h a 4 °C.

Finalmente las muestras se centrifugan a 6000 rpm durante 7 min a 4 °C. El sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende en 30 µL de agua libre de RNAsas, en este punto las muestras se pueden guardar a -20 °C.

Para poder realizar la PCR a tiempo real es necesario llevar a cabo el procesamiento del ARN mensajero para obtener ADN complementario. Antes de la retrotranscripción, se realiza una valoración de la pureza y concentración del ARN mediante análisis espectrofotométrico midiendo su absorbancia a 280 y 260 nm. En una reacción estándar, se prepara una solución con 2 µg de ARN, 9 µL de agua libre de RNAasas, 10 µL de RT Buffer MIXC 2X (Applied Biosystems) y 1 µL de RT Enzyme Mix 20X (Applied Biosystems). Las muestras se colocan en el equipo (QuantuStudio5) y se lleva a cabo un ciclo de temperatura necesario para que se produzca la reacción de polimerización del ADN complementario (10 min a 25 °C, 1 h a 37 °C y 5 min a 95 °C). Una vez obtenido el ADN complementario, se diluyen las muestras con 70 µL de agua libre de nucleasas. En este punto las muestras se pueden guardar a -20 °C.

Finalmente, los niveles de expresión de *ALP* y *Runx2* se determinaron mediante qRT-PCR utilizando las sondas Taqman Hs01029144_m1 y Hs01047973_m1 (sondas TaqMan® MGB marcadas con colorante FAM™, Applied Biosystems). En la reacción se añadieron 0,5 µL de las sondas, 5 µL de ADN complementario, 4,5 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de 2X PCR master mix (TaqMan™ Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems). Tras una incubación inicial de 2 minutos a 50 °C y 10 min a 95 °C, las muestras se sometieron a 50 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Para la cuantificación de la expresión génica, los valores de los genes diana se normalizan con respecto a la expresión del gen de referencia endógena *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, Hs02786624_g1). Para calcular la expresión relativa se utilizó el método del ciclo umbral comparativo (Ct). Para la cuantificación de la expresión génica, el valor del gen diana se normalizó con respecto a la expresión de la referencia endógena. La expresión del gen diana, normalizada con respecto a la referencia endógena y relativa al control viene dada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cuantificación relativa, RQ). ($\Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{referencia endógena}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condición de estudio}} - \Delta Ct_{\text{control}}$).

Referencias bibliográficas

[1] Rubio, L., Pyrgiotakis, G., Beltran-Huarac, J., Zhang, Y., Gaurav, J., Deloid, G., Spyrogianni, A., Sarosiek, K. A., Bello, D., & Demokritou, P. (2019). Safer-by-design flame-sprayed silicon dioxide nanoparticles: the role of silanol content on ROS generation, surface activity and cytotoxicity. *Particle and fibre toxicology*, *16*, 1-15.

[2] Josephson, B. D. (1974). The discovery of tunnelling supercurrents. *Reviews of Modern Physics*, *46*(2), 251.

Anexo IV. Biorreactor magnético

Biorreactor magnético MICA Biosystems

El biorreactor de fuerza magnética oscilante vertical de MICA Biosystems ha sido el equipo utilizado en esta tesis doctoral para generar un campo magnético que estimule mecánicamente a las células en cultivos *in vitro* a través de las fuerzas desencadenadas por los movimientos de las SPIONs o los andamios con SPIONs incorporadas bajo la acción del campo magnético.

Este biorreactor magnético consiste en un dispositivo formado por dos matrices magnéticas que presentan varios imanes permanentes de neodimio-hierro-boro (NdFeB) (**Figura A.IV.**). Los imanes se distribuyen en la matriz siguiendo el patrón de los pocillos de las placas de 6, 24 o 96 pocillos, de modo que esos mismos son los diferentes tipos de placas de cultivo que pueden ser utilizadas en este biorreactor. Las matrices se encuentran sujetas a un soporte accionado por un motor, de este modo las matrices se pueden mover hacia arriba y hacia abajo controlando la velocidad, la aceleración y la distancia; siendo estos tres parámetros los que determinan la frecuencia de oscilación del campo magnético. El equipo se puede programar para que el soporte oscile a 1 Hz o menos. Los parámetros que determinan el movimiento de las matrices y el tiempo de aplicación son controlados a través de un software dirigido por ordenador. El movimiento oscilatorio generado (hacia arriba y hacia abajo) permite que las matrices magnéticas se acerquen y se alejen a la posición en la que se encuentran las placas de cultivo con las células y las partículas magnéticas. En la posición más próxima a la placa de cultivos se aplica la mayor intensidad de campo magnético (250 mT), la cual disminuye cuando la matriz se aleja. El dispositivo está diseñado para poder colocarse y utilizarse dentro de una estufa a 37 °C, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad relativa.

De este modo, el biorreactor permite generar un campo magnético pulsante que se mueve hacia arriba y hacia abajo a una frecuencia controlada. Las SPIONs en contacto con las células se mueven atraídas por el campo magnético generando fuerzas del orden de pN en la membrana celular. La intensidad de dicha fuerza dependerá del momento magnético de la partícula y del gradiente de campo magnético. Cuando se utiliza un gradiente de campo magnético, los actuadores magnéticos (partículas o nanopartículas magnéticas) se moverán hacia la fuente del campo [1]. Si las partículas están unidas a un receptor celular, su movimiento generará una fuerza de tracción.

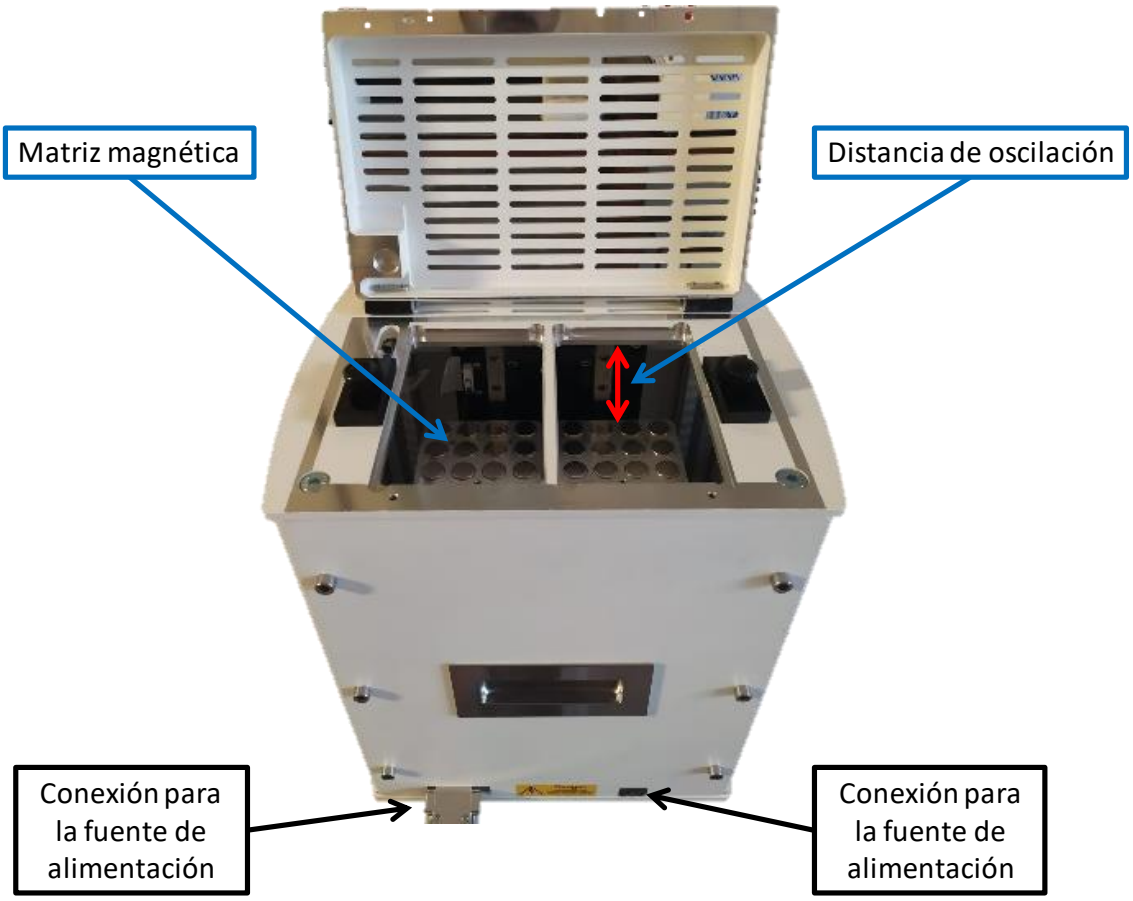


Figura A.IV. Fotografía del biorreactor de fuerza magnética oscilante vertical de MICA Biosystems.

Referencias bibliográficas

[1] Tanase, M., Biais, N., & Sheetz, M. (2007). Magnetic tweezers in cell biology. *Methods in cell biology*, *83*, 473-493.

Anexo V. Publicaciones científicas y comunicaciones a congresos durante la tesis doctoral

Artículos científicos derivados de la tesis doctoral

- **Estévez, M.,** Montalbano, G., Gallo-Cordova, A., Ovejero, J. G., Izquierdo-Barba, I., González, B., Tomasina, C., Moroni, L., Vallet-Regí, M., Vitale-Brovarone, C., & Fiorilli, S. (2022). Incorporation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles into collagen formulation for 3D electrospun scaffolds. *Nanomaterials*, 12(2), 181.

- **Estévez, M.,** Cicuéndez, M., Crespo, J., Serrano-López, J., Colilla, M., Fernández-Acevedo, C., Oroz-Mateo, T., Rada-Leza, A., González, B., Izquierdo-Barba, I., & Vallet-Regí, M. (2023). Large-scale production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by flame spray pyrolysis: In vitro biological evaluation for biomedical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 650, 560-572.

- **Estévez, M.,** Cicuéndez, M., Colilla, M., Vallet-Regí, M., González, B., & Izquierdo-Barba, I. (2024). Magnetic colloidal nanoformulations to remotely trigger mechanotransduction for osteogenic differentiation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 664, 454-468.

- **Estévez, M.,** Batoni, E., Cicuéndez, M., Bonatti, A. F., Fernández-Marcelo, T., Vozzi, G., González, B., De Maria, C., & Izquierdo-Barba, I. Fabrication of 3D functional Scaffolds by combining Fused Deposition Modelling and Inkjet Printing of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. En preparación.

- Tomasina, C., **Estévez, M.,** Cicuéndez, M., García, A., González, B., Camarero-Espinosa, S., Izquierdo-Barba, I., & Moroni, L. Magnetoactive electrospun fibrous scaffolds for osteogenic differentiation through mechanotransduction. En preparación.

Otros artículos científicos

- Álvarez, E., **Estévez, M.,** Jiménez-Jiménez, C., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., González, B., & Vallet-Regí, M. (2021). A versatile multicomponent mesoporous silica nanosystem with dual antimicrobial and osteogenic effects. *Acta Biomaterialia*, 136, 570-581.

- Álvarez, E., **Estévez, M.,** Gallo-Cordova, A., González, B., Castillo, R. R., Morales, M. P., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., & Vallet-Regí, M. (2022). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles decorated mesoporous silica nanosystem for combined antibiofilm therapy. *Pharmaceutics*, 14(1), 163.

Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

- E. Álvarez-Corchado, A. Aguilar, **M. Estévez,** G. Hernández, C. Anchico, A. García, M. Colilla, D. Lozano, R. Castillo, C. Jiménez, D. Lozano, B. González, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. Nanomedicines in infection treatment. Póster. CIBER-BBN ANNUAL CONFERENCE 2019, Tarragona, (España).

- B. González, E. Álvarez, **M. Estévez,** J. Soler, E. García, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. Incorporation of metals in mesoporous silica nanoparticles for infection treatment. Presentación oral. 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials ESB 2019 in tandem with the 26th Annual Conference of the German Society for Biomaterials (DGBM), Dresden, (Alemania).

- E. Álvarez-Corchado, **M. Estévez,** A. Gallo-Córdova, M. Colilla, B. González, I. Izquierdo-Barba, M. P. Morales and M. Vallet-Regí. Mesoporous silica nanosystems decorated with magnetic nanoparticles for infection treatment. Póster. Spanish Conference on Biomedical Applications of Nanomaterials SBAN 2020, Madrid, (España), online.

- **M. Estévez,** E. Álvarez-Corchado, C. Jiménez-Jiménez, I. Izquierdo-Barba, B. González and M. Vallet-Regí. Incorporation of Zinc and Antibiotics in Mesoporous Silica Nanoparticles for Dual Effect: Infection Treatment and Bone Regeneration. Póster. Spanish Conference on Biomedical Applications of Nanomaterials SBAN 2020, Madrid, (España), online.

- G. Montalbano, **M. Estévez,** C. Tomasina, S. Fiorilli, B. González, I. Izquierdo-Barba, L. Moroni, M. Vallet-Regí, C. Vitale-Brovarone. The combination of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Type I collagen to design 3D Electrospun Scaffolds for bone regeneration. Presentación oral. 31st CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS ESB2021 TOGETHER WITH THE 43rd ANNUAL CONGRESS OF THE IBERIAN SOCIETY OF BIOMECHANICS AND BIOMATERIALS (SIBB), Porto, (Portugal), virtual.

- **M. Estévez,** A. Gallo-Cordova, J. Crespo, S. G. Pedrero, J. Serrano-López, M. Colilla, M. P. Morales, B. González, I. Izquierdo-Barba and M. Vallet-Regí. Large-scale Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Coated with Dimercaptosuccinic Acid for Biomedical Applications. Póster. 31st CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS ESB2021 TOGETHER WITH THE 43rd ANNUAL CONGRESS OF THE IBERIAN SOCIETY OF BIOMECHANICS AND BIOMATERIALS (SIBB), Porto, (Portugal), virtual.

- E. Álvarez-Corchado, **M. Estévez,** M. Mura, C. Jiménez-Jiménez, J. Serrano-López, M. Colilla, B. González, I. Izquierdo-Barba and M. Vallet-Regí. Multifunctional copper-containing mesoporous silica nanoparticles as antibacterial and angiogenic agents. Presentación oral. EUROPEAN CONGRESS AND EXHIBITION ON ADVANCED MATERIALS AND PROCESSES - EUROMAT 2021, Graz, (Austria), virtual.

- **M. Estévez,** B. González, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba and M. Vallet-Regí. ENGINEERING SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. Póster. IV JORNADAS PHDAY FARMACIA UCM 2021, Madrid, (España).

- S. G. Pedrero, **M. Estévez**, I. Izquierdo-Barba, B. González, M. Vallet-Regí, P. Llamas-Sillero and J. Serrano-López. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for T cell reprogramming. Póster. RSEQ Symposium 2021, online.

- I. Izquierdo-Barba, **M. Estévez**, G. Montalbano, C. Tomasina, A.F. Bonatti, M. Colilla, B. González, S. Fiorilli, L. Moroni, C. De María, G. Vozzi, C. Vitale-Brovarone, M. Vallet-Regí. INCORPORATION OF SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES INTO 3D SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE REGENERATION. Póster. TERMIS 6TH WORLD CONGRESS 2021, Maastricht, (Países Bajos), online.

- E. Batoni, A.F. Bonatti, **M. Estévez,** B. González, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, C. De Maria, G. Vozzi. Fabrication of 3D paramagnetic functional Scaffolds by combining extrusion and inkjet bioprinting. Presentación oral. International Conference on Biofabrication 2022 Pisa, Montecatini Terme, (Italia).

- **M. Estévez,** G. Montalbano, A.F. Bonatti, C. Tomasina, E. Batoni, S. Camarero-Espinosa, C. De Maria, B. González, M. Colilla, S. Fiorilli, L. Moroni, G. Vozzi, C. Vitale-Brovarone, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. 3D scaffolds incorporating superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bone regeneration. Póster. International Conference on Biofabrication 2022 Pisa, Montecatini Terme, (Italia).

- **M. Estévez,** M. Cicuéndez, J. Crespo, M. Colilla, B. González, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. In vitro evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a pivotal study in bone tissue scaffolding. Presentación oral. International Conference on Biofabrication 2022 Pisa, Montecatini Terme, (Italia).

- **M. Estévez,** B. González, I. Izquierdo-Barba. Remote activated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bone tissue engineering. Presentación oral. VI Phday Facultad de Farmacia UCM 2023, Madrid, (España).

- **M. Estévez,** E. Álvarez, A. Gallo-Cordova, B. González, R.R. Castillo, M.P. Morales, M. Colilla, I. Izquierdo Barba, M. Vallet Regí. Magnetic mesoporous silica nanoparticles for Combined Antibiofilm Therapy. Presentación oral. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Meeting 2023, Manchester, (Reino Unido).

- **M. Estévez,** M. Cicuéndez, J. Crespo, C. Fernández-Acevedo, T. Oroz-Mateo, A. Rada-Leza, J. Serrano, M. Colilla, M.P. Morales, B. González, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí. Biological evaluation of large-scale synthetized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Póster. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Meeting 2023, Manchester, (Reino Unido).

- C. Tomasina, **M. Estévez**, I. Corvaglia, M. Pagani, C.L. Gigliotti, C. Dianzani, U. Dianzani, N. Dunne, C. Coelho, A. Azevedo, P. Quadros, B. González, I. Izquierdo-Barba, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, S. Camarero-Espinosa, L. Moroni. Designing anti-osteoporotic nanomaterials scaffolds for pelvic fractures: the use of ICOS-Fc and SPIONs. Presentación oral en el seminario y póster en el congreso. Biomaterials and Tissue Engineering (GRC) Gordon Research Conference and (GRS) Gordon Research Seminar 2023, Holderness, New Hampshire, (Estados Unidos).

- **M. Estévez,** M. Cicuéndez, M. Colilla, B. González, M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro funcionalizadas con un péptido RGD para regeneración ósea. Presentación oral. XLV Congreso de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales 2023, Barcelona, (España).

- **M. Estévez,** M. Cicuéndez, A. García, M. Colilla, B. González, M. Manzano, M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bone tissue regeneration: GIOTTO Project European Union's Horizon 2020. Póster. JORNADAS 2023 COLABORATIVAS CIBEREHD Y CIBER-BBN, Santander, (España).

- **M. Estévez,** M. Cicuéndez, A. García, M. Colilla, B. González, I. Izquierdo-Barba. SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES ON OSTEOGENIC DIFFERENTIATION. Presentación oral. V Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos, V QuimBioQuim 2023, Segovia, (España).

- C. Tomasina, **M. Estévez,** M. Cicuéndez, A. García, I. Izquierdo-Barba, B. González, A. Rada-Leza, J. Crespo, S. Camarero-Espinosa, L. Moroni. Creating magneto-active fibrous electrospun scaffolds for the remote mechanotransduction of human mesenchymal stem cells. Póster. 12th World Biomaterials Congress, WBC2024, Daegu, (Corea del Sur).

- **M. Estévez,** M. Cicuéndez, M. Colilla, M. Vallet-Regí, B. González, I. Izquierdo-Barba. A new versatile nanoformulation to remotely trigger mechanotransduction for bone regeneration. Abstract enviado como comunicación oral. 14th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, 2024, Barcelona, (España).