

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Caracterización *in vitro* de andamios biológicos elaborados a partir de biopolímeros naturales para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Trabajo de Titulación, Modalidad de Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Autores: Leslie de los Ángeles Piñaloza Vásconez

Víctor Xavier Ramírez Manzano

Tutora: PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Ambato, 25 de Julio del 2023

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C.I. 1804256905

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Leslie de los Ángeles Piñaloza Vásconez y Víctor Xavier Ramírez Manzano, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Leslie de los Ángeles Piñaloza Vásconez

C.I. 1850175470

AUTOR



Víctor Xavier Ramírez Manzano

C.I. 1850209964

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedemos los derechos en línea patrimoniales de nuestro Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Leslie de los Ángeles Piñaloza Vásconez

C.I. 1850175470

AUTOR



Víctor Xavier Ramírez Manzano

C.I. 1850209964

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

PhD. Irvin Ricardo Tubón Usca
C.I. 060425035-7

Msc. Danae Fernández Rivero
C.I. 175718120-9

Ambato, 25 de agosto del 2023

DEDICATORIA

Lo más valioso que tengo en la vida no es lo que poseo, sino lo que he logrado.

Es difícil dar un orden para nombrar a cada una de las personas que dedicaría todo mi esfuerzo y sacrificio, que se ve reflejado en esta, MI TESIS, por ello:

Dedico mi lucha constante, mis noches en desvelo, mis alegrías y mis tristezas, mis sueños y mis metas alcanzadas y las que seguiré logrando;

A la familia, por el soporte constante, el amor más puro, leal y genuino que he podido sentir, desde que llegué a este mundo.

Al amor, ese amor que siempre estuvo presente en el corazón y hoy está en el alma, es lo que idealicé.

A la amistad, son esa familia que no se elige pero que Dios pone en el camino, las risas, los consejos y todo lo vivido.

Es hora de partir, hacia lo incierto, nos debemos ir, nos toca volar y las alas despegar para emprender el vuelo, en busca de la verdad, hacer una carrera y alto llegar....

Estamos preparados, claro que nos hemos preparado, de eso no debe haber duda, fuimos educados para llegar a las alturas, nunca dudemos de hacia dónde queremos llegar....

Extendamos bien las alas, llegaremos, solo es cuestión de seguir el viento, planear, poco a poco, sin miedo, los frutos llegaran y seremos en el firmamento una estrella, pero no una más, habremos cumplido nuestros sueños ; Ser grandes!

--- Leslie Piñaloza ---

DEDICATORIA

La vida me demostró que las cosas no se consiguen con facilidad, sino con esfuerzo.

Todos hemos pasado por el sentimiento que nos detiene y no nos permite avanzar, pensando que nada de lo que pasa a nuestro alrededor tiene sentido, pues ese sentido lo damos nosotros mismos, y sé que todos lo conseguimos en este punto.

Decir que dedico, MI TESIS, a alguien es mentirme a mí mismo, porque su desarrollo está englobado por ideas de cada uno de ustedes (lo saben), pero siempre habrá un pilar, por ello quiero dedicar:

*A mí esfuerzo, noches de desvelo, lágrimas,
metas y sueños que he cumplido y cumpliré.*

*A mi familia, quienes me han demostrado que, con esfuerzo,
amor y pasión nada es imposible de conseguir.*

*A mí segunda familia, mis amigos, quien me han demostrado
que ante la adversidad nunca faltará una sonrisa.*

Y al amor, que muchas veces duele, pero te enseña a ser mejor.

Debemos partir, florecer y convertirnos en lo que algún día soñamos, tal vez no fue tal como lo esperábamos, tal vez, el camino se torció y pensamos que no lo lograríamos, tal vez y solo tal vez, pensamos no conseguirlo, pero la vida y nuestro esfuerzo nos demostró que nada nos detendrá.

Seamos grandes, seamos fuertes y nunca perdamos nuestra esencia.

--- Víctor Ramírez ---

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por ser luz y guía en el camino de mi vida y hoy estar aquí.

Agradezco a mi madre (Martha) y mi hermano (Josué) por la lucha constante, junto conmigo, por ser mi consuelo, mi apoyo, mi motivación y mi refugio.

Agradezco a mi tutora PhD. Lorena Núñez, por confiar en mí desde el primer día, sabiendo que el camino no era fácil, gracias por el apoyo, ayuda y consejos no solo para la academia, sino para la vida. Fue la mejor tutora, es y será mi inspiración.

Agradezco a Dr. Irvin Tubón, Dr. Orestes López, Dr. Mario García, Dra. Liliana Cerda, Dra. María Daniela Garcés; por su ayuda y enseñanza; nunca recibí un no como respuesta, ante las dudas. Gracias por los reactivos, gracias de verdad.

Agradezco a los profesionales del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT - ESPE) por su ayuda para la aplicación de SEM. Fue posible.

Agradezco a mi familia: Adri y Tannia, han sido mis mamás, nunca me faltaron sus consejos, su apoyo y ayuda en todos los sentidos. Nancy, Marce, Vilma, Klever, Ñana Guadita y Alexandra gracias por absolutamente todo, siempre conmigo.

Agradezco a mis pequeños: Nebby (mi pequeña pío), Diddier (mi gordito), a la niña Zoe (mi Choyita); ustedes me han dado la sonrisa más sincera, el abrazo más tierno. El amor inocente y puro que tienen para dar siempre que llego a casa. Porque no agradecer a mi primo Sebastián, el hombrecito valiente de la familia, por enseñarme la fuerza con la que hay que tomar decisiones, hoy no está aquí, pero regresará y nos sentiremos orgullosos de tenerle de vuelta.

Agradezco a mis abuelitos: Mamita Gloria y Papá Augusto, no saben cuánta falta me hacen; no me pude despedir de ninguno de ustedes, pero siempre me hicieron saber lo orgullosos que se sentían de mí. Marianita, la única abuelita que me queda, gracias por tenerme siempre en sus oraciones, gracias por su bendición.

Agradezco al amor: Sebastián (mi Sebitas), todo en una misma persona, gracias por el amor, la compañía, la ayuda, la paz y tranquilidad. Mi corazón y mente así lo sienten. Lo logré, lo logramos. Los sueños se cumplen, las metas se alcanzan.

Finalmente, agradezco a mis amigos, mi compañero de tesis, personal del laboratorio (UODIDE), a la familia que se va encontrando en el camino. Son parte del logro, fue un trabajo en conjunto.

--- Leslie Piñaloza ---

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres Rocío Manzano y Víctor Ramírez, quienes han sido mi apoyo, mi sustento y mi mayor motivación para culminar una etapa más en mi vida.

Agradezco a mi tutora PhD. Lorena Núñez, quien me demostró que, aunque el tiempo pase, siempre estará presente un niño interior en nosotros. Sus enseñanzas y guía han sido invaluable.

Agradezco a Dr. Irvin Tubón, Dr. Orestes López, Dr. Mario García, Dra. Liliana Cerda, Dra. María Daniela Garcés; por sus enseñanzas y apoyo, demostrando que existen personas con una gran pasión por la investigación. Gracias por todo.

Agradezco a los profesionales del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT – ESPE) por su valioso apoyo en la aplicación de SEM.

Agradezco especialmente a Geo, quien me enseñó que aún existen personas increíbles por conocer, por sacarme una sonrisa en cada momento y por soportar mis “no entiendo” para todo, por las tardes de risas y estrés en las bibliotecas. Por ti sé, que las personas son buenas, sensibles, risueñas, divertidas. Gracias por ser mi apoyo incondicional.

Agradezco a mi segunda familia, mis amigos: Erick, Lucho, Nía, Washo, Mishu, Chino, Vivi, Mika (Dome), Dome, George, Jenny, Kevin (gracias por la pipeta), Gracias por sus consejos, su apoyo y ánimo para no decaer en el camino. Sé que la vida le recompensará a cada uno de ustedes.

Finalmente, quiero agradecer a mis hermanos, Oscar y Erika, quienes siempre han estado en cada paso de mi vida, con sus locuras, sus ganas de compartir, jugar, conversar. Sé que ambos llegaran muy lejos.

--- Víctor Ramírez ---

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
GLOSARIO.....	xvii
RESUMEN EJECUTIVO	xviii
ABSTRACT.....	xix
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Ingeniería de tejidos	4
1.1.2. Componentes para la ingeniería de tejidos.....	5
1.1.3. Fabricación de los andamios biológicos	9
1.1.4. Características de los andamios biológicos para la IT	21
1.2. Objetivos.....	31
1.2.1. Objetivo general.....	31
1.2.2. Objetivos específicos	31
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	32
2.1. Materiales	32
2.1.1. Reactivos	32
2.1.2. Material fungible.....	32
2.1.3. Equipos de laboratorio	33
2.2. Métodos	34

2.2.1. Elaboración de andamios biológicos por liofilización empleando biopolímeros naturales.....	34
2.2.2. Análisis de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas	37
2.2.3. Comparación de dos métodos de esterilización para andamios biológicos a fin de garantizar su asepsia.....	43
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
3.1. Análisis de resultados	47
3.1.1. Elaboración de andamios biológicos por liofilización empleando biopolímeros naturales.....	47
3.1.2. Análisis de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas	56
3.1.3. Comparación de dos métodos de esterilización para andamios biológicos.....	77
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89
4.1. Conclusiones.....	89
4.2. Recomendaciones	91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales componentes en la ingeniería de tejidos.	8
Figura 2. Resumen de la composición del colágeno.	12
Figura 3. Proceso de desacetilación para la obtención de quitosano.	15
Figura 4. Influencia del grado de desacetilación (DD) del quitosano.	16
Figura 5. Andamios biológicos elaborados por liofilización.	20
Figura 6. Características de los andamios biológicos.	22
Figura 7. Mecanismo de desinfección de los andamios biológicos.	28
Figura 8. Proceso de elaboración de andamios biológicos.	36
Figura 9. Proceso para la evaluación del porcentaje de porosidad de los ABs.	37
Figura 10. Evaluación de la capacidad máxima de hinchazón de los ABs.	38
Figura 11. Evaluación de la biodegradación de los ABs.	39
Figura 12. Evaluación del índice de coagulación sanguínea (BCI).	40
Figura 13. Método visual para la evaluación del índice de coagulación (BCI).	40
Figura 14. Evaluación del porcentaje de hemólisis de los ABs en sangre.	41
Figura 15. Evaluación de la adhesión de glóbulos rojos de los ABs.	42
Figura 16. Evaluación de la adhesión de plaquetas de los ABs.	43
Figura 17. Métodos de esterilización en los ABs y su evaluación microbiológica. .	45
Figura 18. Evaluación de inhibición bacteriana de los ABs.	46
Figura 19. Diagrama de distribución de andamios sobre placa de 96 pocillos.	46
Figura 20. Andamios biológicos elaborados por el método de liofilización.	48
Figura 21. Superficie de los ABs liofilizados.	50
Figura 22. Evaluación de la morfología de los ABs liofilizados cortados.	51
Figura 23. Resultados de la evaluación de porosidad de ABs biológicos.	54
Figura 24. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (Agua).	57
Figura 25. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (PBS).	58
Figura 26. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (Sangre).	59
Figura 27. Porcentaje de peso residual de los ABs.	64
Figura 28. Porcentaje de biodegradación de los ABs.	65
Figura 29. Resultados evaluación coagulación de sangre entera in vitro.	69
Figura 30. Capacidad hemolítica (%) de los andamios biológicos in vitro.	71
Figura 31. Resultados evaluación de adhesión glóbulos rojos in vitro.	74

Figura 32. Resultados evaluación de adhesión plaquetaria in vitro.....	76
Figura 33. Evaluación de métodos de esterilidad en Agar Sangre.....	83
Figura 34. Evaluación de inhibición celular (Resazurina).....	84
Figura 35. Porcentaje de proliferación de <i>S. aureus</i>	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familia de proteínas de colágeno.....	13
Tabla 2. Composición de los andamios biológicos elaborados por liofilización.....	47
Tabla 3. Resumen de los posibles usos de los andamios en bae al porcentaje de porosidad.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Pesos obtenidos para determinación del % de porosidad de los ABs.	114
Anexo 2. Promedio y desviación estándar del % de porosidad de los ABs.....	114
Anexo 3. Pesos obtenidos para la determinación del % de hinchamiento de los ABs.	114
Anexo 4. Porcentajes de hinchamiento obtenidos para los ABs.....	116
Anexo 5. Promedio de los % de hinchamiento de los ABs.	117
Anexo 6. Desviación estándar de los % de hinchamiento de los ABs.....	118
Anexo 7. Pesos obtenidos para la determinación del % de degradabilidad de los ABs.	118
Anexo 8. Pesos residuales obtenidos para el % de biodegradabilidad de los ABs..	119
Anexo 9. Porcentaje de peso residual obtenido para los ABs.....	119
Anexo 10. Promedio del % de peso residual obtenido para los ABs.....	120
Anexo 11. Desviación estándar del % de peso residual de los ABs.....	120
Anexo 12. Porcentaje de degradabilidad de los ABs.	120
Anexo 13. Promedio del % de biodegradación de los ABs.	121
Anexo 14. Desviación estándar del % de biodegradación de los ABs.	121
Anexo 15. Valores de absorbancias obtenidas para el % de BCI de los ABs.....	121
Anexo 16. Promedio y desviación estándar del % de BCI de los ABs.....	122
Anexo 17. Valores de absorbancias obtenidos para el % de hemólisis de los ABs.	122
Anexo 18. Promedio y desviación estándar del % de hemólisis de los ABs.	122
Anexo 19. Valores de absorbancias para la determinación de la concentración de hemoglobina de los ABs.	123
Anexo 20. Promedio y desviación estándar de la concentración de hemoglobina de los ABs.....	123
Anexo 21. Valores de absorbancias obtenidos para el % de liberación de LDH de los ABs.....	124
Anexo 22. Promedio y desviación estándar del % de liberación de LDH de los ABs.	124
Anexo 23. Valores de las absorbancias obtenidos para el ensayo de resazurina (proliferación bacteriana).	125

Anexo 24. Promedio de las absorbancias obtenidas para los diferentes tratamientos de los ABs.	125
Anexo 25. Determinación de los % de proliferación bacteriana con respecto a los ABs.....	126
Anexo 26. Valores obtenidos de % de proliferación bacteriana con respecto a los controles.	126
Anexo 27. Porcentaje de proliferación bacteriana en los ABs.....	126
Anexo 28. Permiso del Comité de Bioética	126

GLOSARIO

AB: Andamio biológico

ABs: Andamios biológicos

IT: Ingeniería de tejidos

SEM: Microscopía electrónica de barrido

ECM: Matriz extracelular

MSC: Células madre mesenquimales

ESC: Células madre embrionarias

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas

GF: Factores de crecimiento

bFGF: Factores básicos de crecimiento de fibroblastos

TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β

VEGF: Factor de crecimiento epitelial vascular

PLA: Polilactida

PLLA: Ácido poli-láctico-L

PGA: Ácido poliglicólico

PLGA: Ácido poli-láctico-DL-co-glicólico

DD: Grado de desacetilación

PM: Peso molecular

UV: Irradiación ultravioleta

EtO: Óxido de etileno

PBS: Tampón fosfato sódico

RESUMEN EJECUTIVO

La escasez de donantes de órganos y la falta de técnicas de regeneración de tejidos son desafíos mundiales, por lo que, la IT surge como una alternativa prometedora. Se combinan células, andamios biológicos o scaffolds y factores para generar tejidos funcionales. Este estudio, se enfocó en la elaboración y caracterización de andamios elaborados a partir de biopolímeros naturales dado que son el soporte para la adhesión y proliferación celular.

Se elaboraron andamios de colágeno, quitosano y colágeno-quitosano (híbrido) empleando liofilización. Su morfología se evaluó mediante SEM (porosidad) e infiltración con etanol (porcentaje de porosidad). También, se caracterizó la hemocompatibilidad, mediante pruebas de hinchazón, BCI, hemólisis, adhesión de glóbulos rojos y plaquetas. Los resultados mostraron que el ABs híbrido presenta mejores características y sería el más robusto para futuras investigaciones. No obstante, se sugiere que el AB de colágeno sea aplicado para investigaciones de tejido epitelial, el de quitosano para tejido óseo y cartilaginoso, y el híbrido para tejido óseo, cartilaginoso y conectivo. En futuras investigaciones se evaluará la bioactividad de los andamios con células, para asegurar la esterilidad de los andamios se evaluó dos métodos: irradiación ultravioleta y etanol (65 a 70 por ciento). Se encontró que la luz UV es mejor debido al tiempo y facilidad de aplicación.

En conclusión, la caracterización realizada a los ABs elaborados sugiere que poseen características adecuadas para futuros ensayos relacionados al desarrollo de tejidos, sin embargo, el ABs híbrido presenta mejores características morfológicas. Estos ABs serán utilizados en futuras evaluaciones de crecimiento y proliferación celular.

Palabras clave: andamios biológicos, ingeniería de tejidos, biopolímeros naturales, biomedicina, hemocompatibilidad.

ABSTRACT

The shortage of organ donors and the lack of techniques to regenerate injured tissues pose a challenge worldwide, making tissue engineering a promising alternative. In this discipline, cells, biological scaffolds, and factors are combined to generate functional tissues. This study focused on the development and characterization of scaffolds made from natural biopolymers, as these provide the basis for cell adhesion and proliferation.

Collagen, chitosan, and collagen-chitosan (hybrid) scaffolds were prepared by lyophilization. Their morphology was evaluated by SEM (porosity) and ethanol infiltration (porosity percentage). In addition, hemocompatibility was characterized by swelling, clotting index, hemolysis, and red blood cell and platelet adhesion tests. The results showed that the hybrid scaffold has the best properties and is the most suitable for future research. However, it is proposed to use the collagen scaffold for epithelial tissue studies, the chitosan scaffold for bone and cartilage tissues, and the hybrid scaffold for bone, cartilage, and connective tissues. Future studies will evaluate the bioactivity of the scaffolds with cells, therefore, to ensure sterility of the scaffolds for cell culture, two sterilization methods were investigated: ultraviolet irradiation and ethanol (65 to 70 percent). UV light proved to be the best method due to the time required and ease of use.

In conclusion, the characterization carried out on the ABs suggests that they possess adequate characteristics for future investigations related to tissue development; however, the collagen/chitosan scaffold presents better morphological characteristics. These ABs will be used in future evaluations of cell growth and proliferation.

Keywords: biological scaffolds, tissue engineering, natural biopolymers, biomedicine, hemocompatibility.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

En el ámbito de la salud, la escasez de donantes de órganos es uno de los problemas más desafiantes a nivel mundial; en las últimas tres décadas el número de trasplantes ha incrementado 2 veces, mientras que los pacientes en lista de espera son 6 veces más (Elisseeff, Badylak, & Boeke, 2021). Según la base de datos UNOS, en 2021 en Estados Unidos se realizaron 41,354 trasplantes, sin embargo, 116,566 pacientes permanecieron en lista de espera y 6,564 murieron. A pesar de que durante ese periodo existían 6.500 donantes vivos y 13,800 donantes fallecidos, la demanda supera con creces la oferta (Kupiec, 2022). En Ecuador el escenario es aún más preocupante, durante el 2022 las estadísticas mostraron cerca de 2,000 pacientes en lista de espera, solo 597 fueron atendidos, y la mayoría fueron para trasplantes de córnea con un 56.62 % (INDOT, 2021). En ese sentido, la Ingeniería de Tejidos (IT) ha surgido como alternativa para el desarrollo de tejidos y órganos con el objetivo de dar solución al bajo número de donantes y otros factores limitantes como la incompatibilidad (Garcia, Cascalho, & Platt, 2018).

El desarrollo de un tejido en laboratorio es un proceso complejo que requiere de tres componentes principales: 1) células, 2) andamios o soportes que permitirán el crecimiento y expansión celular y 3) condiciones y nutrientes adecuados (Tonelli et al., 2017). Como primer componente se requiere el uso de células con la capacidad de diferenciarse y proliferar según el estímulo que estas reciban, entre las células que pueden utilizarse se encuentran células madre embrionarias, células madre adultas, y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Upadhyay, 2017a).

Los andamios o soportes favorecen la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, y en la actualidad están siendo fabricados con una diversidad de biomateriales obtenidos a partir de diferentes fuentes naturales y sintéticas. Las investigaciones que

se basan en el desarrollo de los andamios buscan encontrar los biomateriales, condiciones y métodos adecuados para que logren imitar las funciones biológicas y físicas de la matriz extracelular (ECM) (Costa, Naranjo, Londono, & Badylak, 2017). El imitar las características biológicas y mecánicas de la matriz extracelular, así como las reacciones que de manera natural aquí ocurren es un gran desafío y para lograrlo se están evaluando biopolímeros naturales, sintéticos o mezclas de ambos (Bedell, Guo, Xie, Navara, & Mikos, 2020). Adicionalmente, un andamio biológico ideal debe poseer características como adecuada biocompatibilidad, bioactividad y biodegradabilidad (Upadhyay, 2017a).

El quitosano es un ejemplo de biopolímero natural, este se obtiene de fuentes naturales y renovables como las conchas de crustáceos (Nwe, Furuike, & Tamura, 2009). El quitosano es catalogado como un biomaterial versátil, pues provoca una respuesta inmune mínima y su proceso de obtención es relativamente barato. En cuanto a sus características biológicas presenta una superficie hidrofílica que facilita la adhesión celular y posterior proliferación, además, los productos generados por su degradación no son tóxicos (Levengood & Zhang, 2014). Ventajosamente puede ser combinado con otros biomateriales con el fin de producir una amplia variedad de andamios con una estructura porosa variada (Haaparanta et al., 2014; Radwan, Janus, Piątkowski, Bogdał, & Matýsek, 2020; Sarukawa et al., 2011).

Por otra parte, el colágeno es la proteína más abundante en el ECM, por lo que, se lo considera fundamental en el mantenimiento de la estructura e integridad biológica; se lo puede obtener a partir de fuentes de tejidos duros como el cartílago y hueso (León et al., 2019). Presenta baja inmunogenicidad, amplia estructura porosa, permeabilidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad que facilita la adhesión, migración y diferenciación celular, sin embargo, sus características mecánicas no son las ideales por lo que se requiere su combinación con otros biomateriales (Dong & Lv, 2016a).

Dentro de las características morfológicas indispensables en el desarrollo de un andamio se encuentran la permeabilidad, propiedades mecánicas y porosidad, ya que definirán parámetros como el crecimiento, migración y colonización celular (G. Chen & Kawazoe, 2016). La porosidad facilita la formación de nuevos tejidos y órganos, influyendo sobre la interacción andamio – tejido, migración celular, vascularización, difusión y permeabilidad (Bartoš, Suchý, & Foltán, 2018a). Los andamios deben tener una porosidad idónea de entre 70 y 90 % para garantizar su funcionalidad (Danilevicius et al., 2015). En cuanto al tamaño de los poros, no se tienen valores definidos, debido a que las células poseen tamaños y formas diferentes, por lo que el tamaño difiere de una célula a otra (Y. Han et al., 2021). En el caso del cultivo de condrocitos el tamaño ideal es de 250 – 500 μm (Nelson et al., 2021), mientras que para fibroblastos es de 100 – 150 μm (Loh & Choong, 2013a).

En relación con la evaluación biológica, los andamios deben cumplir parámetros como adecuada compatibilidad (Jimenez et al., 2022). Por ejemplo, cuando un elemento extraño entra en contacto con la sangre, se produce una serie de reacciones por parte del huésped categorizadas en reacciones inmediatas (absorción de proteínas, activación de la cascada de la coagulación, adhesión plaquetaria, producción de anticuerpos y respuestas de las células inmunitarias) y reacciones tardías (citotoxicidad, hipersensibilidad, mutagenicidad, genotoxicidad o formación de tumores) (Balan & Verestiuc, 2014). Las pruebas de hemocompatibilidad se realizan con el fin de conocer el comportamiento del andamio frente a la presencia de sangre, es decir, se enfoca en determinar si se produce o no coagulación, trombosis, activación del sistema del complemento, activación plaquetaria y alteración de eritrocitos, indicado si el andamio elaborado tiene el potencial de ser biocompatible (Chi Perera et al., 2020).

La esterilidad es otro parámetro fundamental en la elaboración de andamios, debido a que permite que los mismos queden libres de contaminación por microorganismos vivos como bacterias, levaduras y virus que puedan estar presentes durante la etapa de

elaboración (Dai, Ronholm, Tian, Sethi, & Cao, 2016a). Contar con andamios estériles es extremadamente importante para iniciar con el cultivo *in vitro* con las células deseadas y sus medios de cultivo (Łopianiak & Butruk-Raszeja, 2020). Sin embargo, la técnica de esterilización debe ser bien elegida, debido a que es necesario mantener las propiedades estructurales y bioquímicas de los andamios (Griffin et al., 2018a). Con esto se conserva la inocuidad de los andamios para posteriores etapas como son el cultivo celular y ensayos *in vivo*.

Investigaciones relacionadas al desarrollo de andamios biológicos o también llamados scaffolds son necesarias en cuanto a la combinación de polímeros y a la caracterización de sus propiedades para obtener un andamio “ideal” para la generación de tejidos en laboratorio.

1.1.1. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos (IT) es un campo multidisciplinario que combina los principios de ingeniería y ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren las funciones de un tejido lesionado (Belleghem, Mahadik, Snodderly, & Fisher, 2020). La IT ha sido reconocida desde 1987 por la National Science Foundation como un campo de estudio que requiere la combinación de la medicina regenerativa, ciencia de materiales, biología, física e ingeniería de procesos para obtener tejidos miméticos que ofrezcan ventajas notables en comparación con el trasplante de órganos (Akter, 2016a).

En particular, la IT se ha convertido en una herramienta vital en el tratamiento de pacientes que presentan lesiones en tejidos u órganos. Por ejemplo, la IT combinada con andamios biológicos y células como células madre mesenquimales (MSC), células madre embrionarias (ESC) e células madre pluripotentes inducidas (iPSC), ha permitido el desarrollo de sustitutos de piel que aceleran el proceso de curación y recuperación de pacientes con lesiones en la piel (Goldenberg, McLaughlin, Koduru,

& Ravnic, 2021). Además, la IT puede reducir o incluso eliminar el rechazo en trasplantes, ya que los tejidos generados pueden ser genéticamente idénticos al receptor (Solez et al., 2018), lo que la hace una herramienta crucial en el desarrollo de órganos y tejidos a nivel de laboratorio (Caddeo, Boffito, & Sartori, 2017a).

La IT ha permitido la creación de microambientes tridimensionales que simulan la interacción entre diferentes células y la matriz extracelular, superando la necesidad de adquirir modelos animales y realizar pruebas *in vivo* (Caddeo et al., 2017a). A pesar de estas ventajas, existen limitaciones e incógnitas por resolver en la IT, como la tasa de degradación, disponibilidad y características de los polímeros empleados, estructura del andamio, fuentes celulares confiables y producción de órganos complejos (Ashammakhi et al., 2022).

Aunque la IT se presenta como una herramienta prometedora para el desarrollo de sustitutos de tejidos y órganos, aún quedan retos importantes por superar en el camino hacia su aplicación clínica a gran escala. A pesar de esto, se espera que la IT continúe avanzando en un futuro cercano, lo que puede tener un impacto significativo en la medicina regenerativa y en la vida de los pacientes con lesiones tisulares.

1.1.2. Componentes para la ingeniería de tejidos

1.1.2.1. Células

Las células se consideran como la unidad funcional de la vida, las cuales se unen de acuerdo con las funciones que realicen para dar paso a la formación de tejidos (Mironov et al., 2022). En el caso de la IT seleccionar la fuente correcta del aislamiento de las células es una fase importante, al tener que combinarse con el tejido seleccionado y factores de crecimiento que activen la regeneración del tejido propio (Krishani, Shin, Suhaimi, & Sambudi, 2023a). A partir de esto, la IT se enfoca en la

fFuente celular prometedora que son las células madre mesenquimales (MSC) las cuales pueden ser aisladas de la médula ósea, tejido adiposo y amígdalas, presentando similitud morfológica con los fibroblastos (Upadhyay, 2017b). Las MSC tienen un alto potencial de diferenciación y autorrenovación en linajes como los adipocitos, osteoblastos, condrocitos y músculos, además de promover la angiogénesis (Schulze-Tanzil, 2015). Diversos estudios han aplicado las MSC para el tratamiento de enfermedades neuronales, óseas, inflamatorias y cartilagosas, sin embargo, la eficiencia, aún se encuentra en discusión (P. Sharma, Kumar, Sharma, Dhar Bhatt, & Dhot, 2019).

Las células madre embrionarias (ESC) son otro tipo de células empleadas en la IT, debido a que son células pluripotentes que provienen de la masa interna de los blastocitos (Dufey, Tacheny, Art, Becken, & Longueville, 2016). Las ESC pueden diferenciarse en cualquier linaje, siendo difícil inducir la diferenciación para un tipo de célula en específico con el 100% de eficiencia, dando espacio a células indiferenciadas y derivando en la formación de teratomas (Mashayekhan, Hajiabbas, & Fallah, 2013). Presentan ventajas como la autorrenovación y pluripotencia, sin embargo, no se aplican ampliamente, debido a que son alogénicas, es decir que provienen de un embrión, generando un posible rechazo inmunológico por parte del paciente (Krishani, Shin, Suhaimi, & Sambudi, 2023b). Lo que ha causado controversia a nivel ético, retrasando su aplicación en el campo de la IT.

Como solución a las ESC, se tiene otro tipo de células que son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que pueden ser reprogramadas a partir de células somáticas adultas, empleando factores de transcripción (Ye, Swingen, & Zhang, 2013). Si bien las iPSC ya no generan una respuesta inmunológica como sucedería con las ESC, la posibilidad de que se pueda formar algún tipo de tumor no se elimina, esto debido a que los factores empleados para la reprogramación se encuentran asociados directamente con el desarrollo de tumores (Upadhyay, 2017c).

1.1.2.2. Andamios biológicos (scaffolds)

El crecimiento celular para la formación de tejidos se da empleando una superficie adherente, en el caso de los tejidos humanos se conoce como matriz extracelular, que se encuentra compuesta por colágenos, glicoproteínas y proteoglicanos (Bandzerewicz & Gadomska-Gajadhur, 2022). Por esto, en la IT se han desarrollado los andamios biológicos (AB) que juegan un papel fundamental, debido a que actúan como una matriz extracelular artificial (ECM), que sirve de soporte para que las células mantengan una organización tridimensional y se desarrollen nuevos tejidos (Krishani et al., 2023b). Para esto, las células deben ser inducidas en el andamio que hace referencia a uno o varios biomateriales porosos, siendo un entorno favorable para la proliferación celular y regeneración de tejidos (O'Brien, 2011).

Una de las principales características es su biocompatibilidad, debido a que sirve como modelo para la reconstrucción tisular, adhesión celular y restauración de órganos, músculos, nervios y huesos (Caddeo, Boffito, & Sartori, 2017b). Además, los andamios biológicos deben contar con una buena permeabilidad para una transferencia de nutrientes efectiva, que va desde medios de cultivo hasta la eliminación de residuos presentes en los tejidos que puedan llegar a obstaculizar las condiciones de cultivo (Chocholata, Kulda, & Babuska, 2019). Los andamios biológicos se obtienen empleando polímeros naturales, sintéticos o una combinación entre ambos, donde las características de los AB dependerán directamente del biomaterial que se emplee (Krishani et al., 2023b). Por lo cual, en ocasiones es necesario el uso de factores de crecimiento y nutrientes para mejorar su funcionalidad, ayudando a reducir problemáticas como la limitada interacción andamio-célula, falta de organización celular y diferencias del entorno *in vivo* con el *in vitro* (Caddeo, Boffito, & Sartori, 2017c).

1.1.2.3. Condiciones y nutrientes

Los factores de crecimiento (GF) son polipéptidos que se unen a receptores específicos en la superficie celular, de forma que ayudan a regular las respuestas celulares como la supervivencia y proliferación celular, que permitirá el desarrollo del tejido (Caballero Aguilar, Silva, & Moulton, 2019). Así, los GF no solo complementan la nutrición celular sino también a los andamios para otorgar una ECM completa (Qu et al., 2020). Dentro de la IT los factores que más se han empleado son factores básicos de crecimiento de fibroblastos (bFGF), proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) (Akter, 2016b). Los GF tienen como fuente de origen fibroblastos o macrófagos debido a que regulan la tumorigénesis, cicatrización, angiogénesis, apoptosis celular, respuestas inmunitarias y morfogénesis (Qu et al., 2020).

De esta manera se puede evidenciar que el desarrollo de la IT es un proceso complejo que requiere de tres componentes (Figura 1), donde cada uno tiene su funcionalidad para resultados exitosos en la formación y regeneración de tejidos y órganos

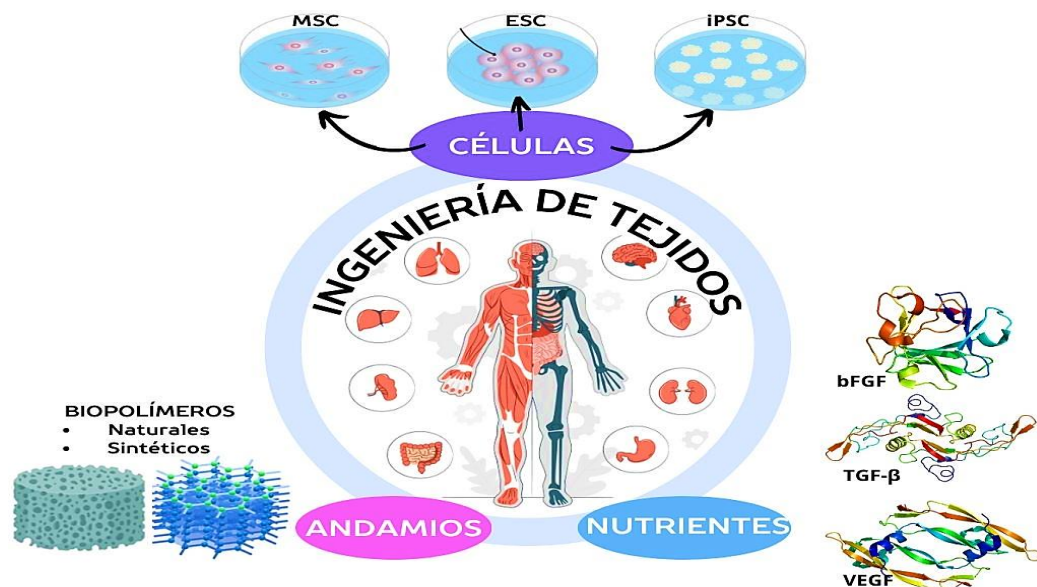


Figura 1. Principales componentes en la ingeniería de tejidos.

La IT se encuentra integrada de tres componentes: 1) células, como las células madre mesenquimales (MSC), células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC); 2) andamios que actúan como soporte y 3) nutrientes, principalmente factores de crecimiento (GF).

1.1.3. Fabricación de los andamios biológicos

1.1.3.1. Biopolímeros para la elaboración de los andamios biológicos

Los polímeros son macromoléculas de cadena larga que se forman por monómeros repetidos, a partir de los cuales se originan los biomateriales que dan paso a la fabricación de andamios (Biswal, 2021). Los biomateriales en la IT se consideran como materiales capaces de generar una interacción con los sistemas biológicos de forma que se puede reemplazar o tratar cualquier órgano, función o tejido del cuerpo (Chopra, Kumar, & Singh, 2021). Su amplia aplicación en la IT se debe a la versatilidad y flexibilidad que confiere propiedades químicas, mecánicas, físicas y biológicas que los vuelve resistentes al ataque bioquímico (Pramanik et al., 2023a). Algunas de las aplicaciones más destacadas son la fabricación de órganos, vasos sanguíneos, implantes mamarios, lentes de contacto, reparación de oído, reemplazo de articulaciones y recubrimiento de fármacos (Biswal, 2021).

Los biomateriales tienen varias fuentes de obtención como son los polímeros naturales y sintéticos; sin embargo, de acuerdo con la estructura química se pueden clasificar en polisacáridos, proteínas y poliésteres (Hassan, Bai, & Dou, 2019). Cada uno cuenta con sus ventajas y desventajas, por lo que la elección del biomaterial va a depender de la aplicación, ya que las características como biocompatibilidad y biodegradabilidad también variarán entre los tipos de tejido (Aaliya, Sunooj, & Lackner, 2021). Otros materiales que se vienen probando en la actualidad son las cerámicas que se forman de elementos metálicos y no metálicos unidos por enlaces iónicos o covalentes, que presentan una alta compatibilidad y semejanza con tejidos duros como los huesos y dientes, pese a que su naturaleza frágil es una limitante (Zarrintaj et al., 2023).

1.1.3.1.1. Biopolímeros sintéticos

Los biopolímeros sintéticos son obtenidos por producción petroquímica, biotecnológica y fermentaciones, por lo que se han convertido en una opción

económica debido a su versatilidad y disponibilidad para llevar a cabo una producción a escala industrial (Maurya & Mishra, 2020). Las características físicas y químicas, así como el peso y estructura molecular vuelven sencilla la ruta de síntesis, considerando que son biológicamente inertes (Hartley, Moon, & Neves, 2022). Dentro de los biopolímeros sintéticos más empleados están los poliésteres alifáticos como la polilactida (PLA) y poli (ϵ -caprolactona), este último es un poliéster semicristalino no tóxico y biodegradable, pero con tasas de degradación lentas de hasta 24 meses, algo parecido sucede con el PLA con un tiempo de 3 a 5 años (B. Guo & Ma, 2014). Estos problemas se suelen solucionar al combinarlos con otros polímeros, comúnmente los naturales que ayudan a mejorar las características. Además, existen otros biopolímeros sintéticos aplicados en IT como son el ácido poli-láctico-L (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) y ácido poli-láctico-DL-co-glicólico (PLGA) (Kannan, Wei, & Ma, 2022).

A diferencia de los biopolímeros naturales, la ventaja radica en las propiedades mecánicas que son mayores, no obstante, durante el proceso de degradación se pueden liberar sustancias tóxicas como el dióxido de carbono (CO_2) que provoca daño a nivel celular y por lo tanto aumenta el riesgo de rechazo inmunitario (Maurya & Mishra, 2020). Por otro lado, controlar las condiciones durante el proceso de síntesis pueden disminuir las posibilidades de riesgos inmunológicos y obtener las características deseadas, esto debido a que al tener una estructura definida se tiene un control sobre las formas que adopta (Bolívar-Monsalve et al., 2021).

1.1.3.1.2. Biopolímeros naturales

Los biopolímeros naturales son materiales que se obtienen de diversas fuentes naturales como son los organismos vivos (plantas, animales y microorganismos), siendo biológicamente activos (Pramanik et al., 2023b). Las sustancias que se extraen para dar origen a los polímeros naturales son los basados en: 1) proteínas, como el colágeno, elastina y fibrina; 2) polisacáridos, como el quitosano, gelatina, alginato y seda y 3) polipéptidos, los cuales se encuentran todavía en investigaciones (Krishani,

Shin, Suhaimi, & Sambudi, 2023c). El uso de sustancias naturales en el mundo de la IT ha ido en aumento, debido a que estos biopolímeros presentan características muy similares a los tejidos blandos, con buena bioactividad, adhesión y proliferación celular, aumentando los niveles de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Ebhodaghe, 2021). Estas características permiten que las células sean capaces de producir su propia matriz extracelular (ECM) y llegar a reemplazar el andamio degradado. A diferencia de los biopolímeros sintéticos, durante el proceso de degradación no existe presencia de productos tóxicos, sino más bien de sustancias de accesibilidad metabólica (Sahana & Rekha, 2018).

La disponibilidad de las fuentes de obtención permite que los biopolímeros naturales sean de fácil adquisición y cuenten con seguridad ecológica, lo que permite realizar modificaciones de acuerdo con las aplicaciones que se quieran llevar a cabo (Pramanik et al., 2023b). No obstante, requieren de una etapa de purificación para evitar respuestas inmunológicas durante los implantes. Además, poseen bajos niveles de resistencia mecánica y sensibilidad a altas temperaturas, generando limitaciones para aplicaciones en las que se requiera soporte de carga, debido a la deficiencia en cuanto a la estabilidad (S. Sharma & Mittal, 2016).

Colágeno como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

El colágeno se encuentra presente en todo el tejido conjuntivo, como son huesos, músculos, ligamentos, piel, nervios y tendones; siendo una de las biomoléculas más estudiadas de la matriz extracelular (Copes, Pien, Van Vlierberghe, Boccafoschi, & Mantovani, 2019). Es una proteína fibrosa que actúa como componente principal de la piel y huesos, con un 25 % de peso seco total en mamíferos, logrando hasta la actualidad caracterizar alrededor de 28 tipos de colágeno, todos con una estructura típica de triple hélice (Tabla 1) (Shoulders & Raines, 2009a). Cada molécula se encuentra compuesta por tres cadenas α que se ensamblan entre sí, además cada cadena contiene más de 1000 aminoácidos en secuencia -Gly-XY-, donde la presencia de glicina es esencial, se ubica en una de cada tres posiciones de aminoácidos,

permitiendo así un empaquetamiento hermético; mientras que las posiciones XY se ocupan por prolina e hidroxiprolina (Figura 2) (Perez-Puyana, Jiménez-Rosado, Romero, & Guerrero, 2019a).

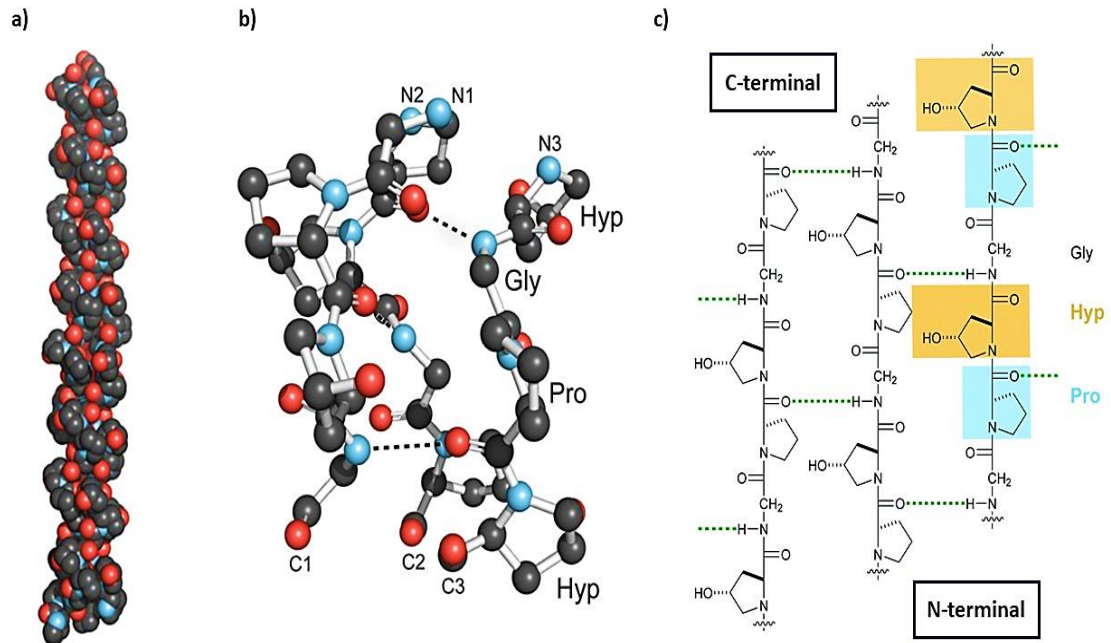


Figura 2. Resumen de la composición del colágeno.

A) estructura de la triple hélice de colágeno obtenida de Protein Data Bank (PDB); B) estructura en forma de palo y bola de un segmento de triple hélice de colágeno obtenida de PDB evidenciando los enlaces de hidrógeno entre hebras y C) estructura de los aminoácidos para la formación de las hebras, teniendo glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). Ilustración basada en la presentada por [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846778/#:~:text=The%20defining%20feature%20of%20collagen,triple%20helix%20\(Figure%201\).](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846778/#:~:text=The%20defining%20feature%20of%20collagen,triple%20helix%20(Figure%201).)

Existen colágenos fibrilares y no fibrilares. Los colágenos fibrilares constituyen cerca del 90% de la totalidad, donde se destacan los tipos I, II, III, V y XI que tienen la capacidad de formar fibrillas superestructuradas, por lo que son ampliamente empleados en la IT, sin embargo, el tipo I y II son los que destacan debido a su bajo peso molecular de aproximadamente 100kDa (Shoulders & Raines, 2009b). Es así, como el colágeno mantiene la integridad estructural de los tejidos y órganos, interactuando con las células y regulando la adhesión, proliferación y diferenciación (Parenteau-Bareil, Gauvin, & Berthod, 2010). Además, contribuye en el suministro de factores de crecimiento y citoquinas que proporcionan un ambiente adecuado que

permite el desarrollo de órganos, evita la cicatrización excesiva y reparación de tejidos (Cen et al., 2009).

Tabla 1. Familia de proteínas de colágeno

Tipo	Clase	Distribución	Tipo	Clase	Distribución
1	Fibrilar	Dermis, huesos, tendones y ligamentos	15		Testículos, riñones, corazón, capilares
2	Fibrilar	Cartílago	16	Fibrilar	Dermis, riñones
3	Fibrilar	Piel, intestino, vasos sanguíneos	17	No Fibrilar	Epitelios
4	No fibrilar	Membranas basales	18	No Fibrilar	Hígado, membrana basal
5	Fibrilar	Dermis, placenta, córneas	19	Fibrilar	Membrana basal
6	No fibrilar	Huesos, dermis, cartílagos, córneas	20	Fibrilar	Córnea
7	Fibrilar	Vejiga, dermis	21	Fibrilar	Riñon, estómago
8	No fibrilar	Cerebro, corazón, riñones, dermis	22	Fibrilar	Uniones de tejido
9	Fibrilar	Córnea, cartílago	23	No Fibrilar	Retina, corazón
10	No fibrilar	Cartílago	24	Fibrilar	Córneas, huesos
11	Fibrilar	Discos, cartílago	25	No Fibrilar	Corazón, testículos, cerebro
12	Fibrilar	Tendones, dermis	26	Fibrilar	Ovarios, testículos
13	No fibrilar	Dermis, corazón, córneas, células endoteliales	27	Fibrilar	Cartílago
14	Fibrilar	Dermis, cartílago	28	***	Nervio ciático, dermis

Las fuentes de obtención son amplias, habitualmente se extraen de la piel y tendones bovinos y porcinos, no obstante, en la actualidad mediante procesos biotecnológicos se extrae de esponjas, peces, crustáceos, canguros y caimanes, siendo una solución rentable para la elaboración de andamios (Khan & Khan, 2013). En el caso del colágeno que se obtiene de piel y tendones su producción es de bajo costo y alto rendimiento, pero de solubilidad limitada, con inmunogenicidad y riesgo de transmisión de patógenos. Esto le ha dado un enfoque a la investigación del colágeno marino, ya que las escamas y conchas contienen un alto porcentaje de colágeno, pero con aplicación limitada en la IT (Ahmed, Verma, & Patel, 2020). También se han estudiado colágenos recombinantes y péptidos sintéticos que no tendrían las limitaciones del colágeno común, sin embargo, se enfrentan a altos costos de producción, bajo rendimiento y susceptibilidad a degradación enzimática (Dong & Lv, 2016b).

El colágeno en la IT es el polímero natural más empleado debido a las características de antigenicidad débil, biocompatibilidad robusta, adhesión celular y biodegradabilidad, convirtiéndolo en un buen biomaterial dentro de las aplicaciones biomédicas (Pramanik et al., 2023b). Dentro de las aplicaciones más destacadas se encuentra el tratamiento de quemaduras y heridas, mediante la formación de apósitos debido a la estructura, porosidad y propiedades superficiales; otra aplicación común es la formación de armazones osteogénicos y material de relleno en el campo ortopédico; también como sustitutos óseos e implantes corneales (Dong & Lv, 2016b). No obstante, también presenta desventajas debido a las propiedades mecánicas que son limitadas a nivel viscoelástico y relacionadas al soporte de altas presiones y tensiones.

Quitosano como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

El quitosano es un polisacárido semicristalino lineal, obtenido de la quitina que viene a ser la forma activa; se encuentra compuesta por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (N-acetilglucosamina) unidas por enlaces β -1,4 (Jiménez-Gómez &

Cecilia, 2020a). El quitosano es uno de los biopolímeros más empleados en el campo biomédico, con escasa presencia en el ambiente, sin embargo, mediante un proceso de cuatro etapas como es la desmineralización, desproteinización, decoloración y la N-desacetilación a partir de la quitina se logra su obtención, esto por hidrólisis química o hidrólisis enzimática (Figura 3) (Ressler, 2022). Las fuentes de obtención son los exoesqueletos de crustáceos e insectos (hormigas, cucarachas, escorpiones) y de las paredes celulares de hongos, algas, esporas y microorganismos. En el caso de los hongos, se encuentra en las paredes celulares de dos formas como quitosano libre y unido a β -glucano (Akca, Özdemir, Öner, & Şenel, 2018).

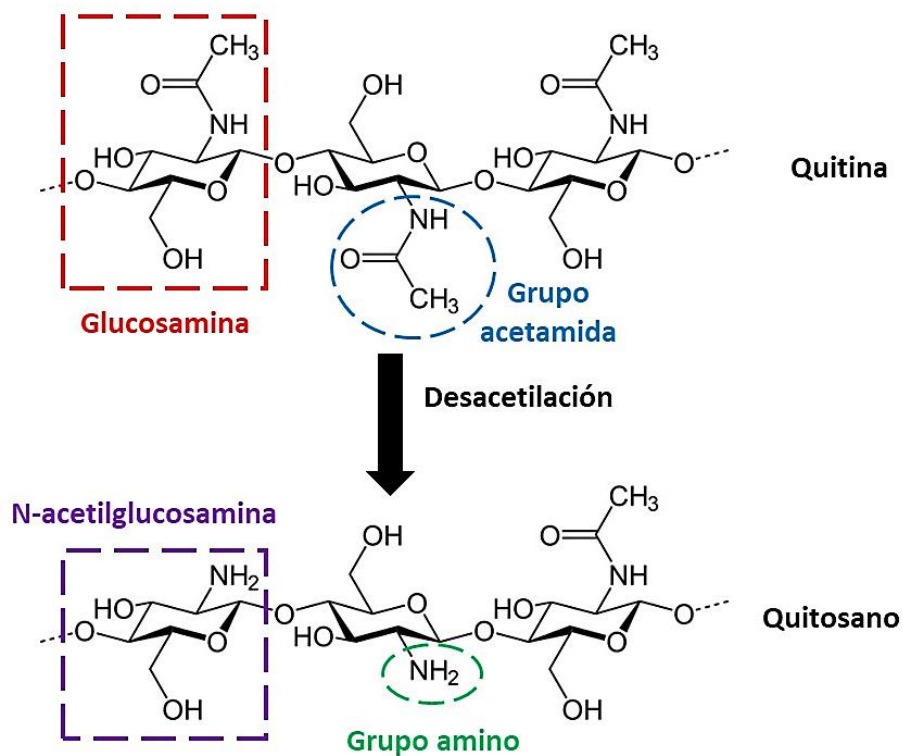


Figura 3. Proceso de desacetilación para la obtención de quitosano.

Tanto la quitina como el quitosano se forman por la unión de varios polisacáridos, contando con un grupo de alcohol primario (CH_2OH) y un grupo hidroxilo (OH). La quitina pierde su grupo acetamina (NH-CO-CH_3) para la formación del quitosano con el grupo amino (NH_2) como resultado de la desacetilación.

Las propiedades físicas, mecánicas, químicas y biológicas que se le confieren al quitosano están dadas por la masa molecular, el grado de desacetilación, el tamaño de las cadenas poliméricas y la composición (Kołodziejaska, Jankowska, Klak, & Wszola,

2021). El grado de desacetilación (DD) es el principal factor, que se define como la relación entre el número de grupos de glucosamina y el número total de grupos N-acetilglucosamina y glucosamina. La quitina se considera quitosano cuando presenta un grado de desacetilación superior al 50% (Budishevskaya et al., 2020),

Es así, como se encuentra quitosano con DD entre 60 y 98%. Un DD de 55-70% confiere al quitosano un bajo grado de desacetilación, lo que lo vuelve insoluble en agua, sin embargo, permite su aplicación en la agroindustria de textiles y fibras, así como en la producción de papel. Un DD de 70-85% es el grado medio de desacetilación y es parcialmente soluble en agua por lo que se emplea para la elaboración de complementos alimenticios, cosméticos y purificación de agua. Por último, se tiene un DD de 85-98% que es el grado más alto de desacetilación y la solubilidad en agua es buena, facilitando su aplicación en la industria farmacéutica y biomédica. También existe un DD de 95-100% que se considera como un grado ultra alto de desacetilación, que es muy difícil de lograr (Lizardi-Mendoza, Argüelles Monal, & Goycoolea Valencia, 2016). Es así como de acuerdo con el uso que se le quiere dar y los fines investigativos, dependerá el nivel de DD que se requiera, tomando en cuenta la influencia que tiene sobre las propiedades (Figura 4).



Figura 4. Influencia del grado de desacetilación (DD) del quitosano.

El DD afecta directamente a las propiedades biológicas, físicas y químicas del quitosano, en algunas de forma beneficiosa como el aumento de solubilidad, y en otras perjudica como en la reducción de la biocompatibilidad.

En las propiedades y características del quitosano también influye el peso molecular (PM), en donde el quitosano con PM más bajo (< 20 kDa) presenta mayor bioactividad que el quitosano de PM más alta (> 120 kDa) (Morin-Crini, Lichtfouse, Torri, & Crini, 2019). Por otro lado, la solubilidad del quitosano está ligada a la densidad de la carga, longitud de la cadena de los polímeros, grado de desacetilación y pH, por lo que no es soluble en agua, alcális o solventes orgánicos, requiriendo de una solución ácida con un pH inferior a 6.3, siendo el ácido acético y fórmico de los más utilizados (Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020b). Considerando que el quitosano es uno de los biopolímeros más utilizados presenta excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y no es tóxico, por lo que los biomateriales a base de quitosano no muestran inflamaciones ni reacciones alérgicas. Además, presenta actividad antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, hemostática, analgésica e hipocolesterolemica (Ahsan et al., 2018). Por lo que se unió con otros polímeros para la formación de biomateriales mejora la hidrofiliidad, propiedades mecánicas y la compatibilidad con la sangre.

Pese a las múltiples ventajas que presenta, también existen limitaciones como la elevada tasa de degradabilidad y el proceso tardado de purificación; que si bien se pueden producir modificaciones esto puede verse afectado en el resto de las propiedades; además su estabilidad se logra únicamente al mezclarse con otros polímeros, preferiblemente la agarosa (Bhat & Kumar, 2012). Entre las aplicaciones que más se pueden destacar están la reparación de cartílago, ingeniería de tejido óseo, hepático y vascular, curación de heridas, medicina regenerativa, terapia génica e implantes dentales (LogithKumar et al., 2016).

1.1.3.1.3. Otros biopolímeros de interés

Agarosa como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

La agarosa es uno de los polisacáridos más empleados debido a la alta biocompatibilidad que presenta, además tiene la capacidad de formar geles

térmicamente reversibles (Su, Chen, Tian, Lu, & Lv, 2022), sin embargo, carece de adhesión celular, por lo que obligatoriamente debe ser combinado con otro polímero. La agarosa con el quitosano muestra gran similitud en cuanto a la estructura química, por lo que su combinación es ampliamente utilizada en el campo biomédico, debido a que ralentiza el proceso de degradación y descomposición que presenta el quitosano por separado (Saeedi Garakani et al., 2020). En el caso del colágeno, no se han realizado suficientes investigaciones, sin embargo, presenta compatibilidad eliminando la carencia de rigidez de este polímero (López-Marcial, Elango, & O'Connell, 2022).

La agarosa es uno de los polímeros más usados en experimentos biológicos como es el caso de la electroforesis y cultivo celular; esto se debe particularmente a su estructura de polisacáridos lineales como D – galactosa y 3 – 6 – anhídrido – L – galactopiranososa que le confiere estabilidad física y química, baja interacción con biomoléculas y comportamiento termorreversible (Merlin, 2022). Por lo que, gracias a su biocompatibilidad y biodegradabilidad se lo cataloga como un biomaterial óptimo para el suministro de medicamentos e ingeniería de tejidos. La agarosa tiene la capacidad de genera una red al ser disuelto, permitiendo que la difusión de nutrientes vitales y oxígeno sea la adecuada en la generación de tejido, simulando las condiciones de la matriz extracelular (Samrot et al., 2023).

1.1.3.2. Métodos de elaboración de los andamios biológicos

Los métodos empleados en la elaboración de andamios biológicos dependerán de la función y propósito del biomaterial utilizado, consiguiendo un entorno 3D. Afectando directamente sobre las características de los andamios, tal es el caso de su composición, rigidez, micro y macroestructura, dichas características influirán sobre la interacción andamio – tejido circundante y el comportamiento celular (Efraim et al., 2019).

Actualmente, la fabricación de andamios 3D se clasifica en dos grandes grupos: 1) métodos manuales y 2) métodos avanzados. De acuerdo con el método seleccionado las características del andamio presentarán variaciones, especialmente sobre el porcentaje de porosidad e interacción andamio – tejido. Los métodos manuales incluyen liofilización, gas foaming, electrohilado, función de solventes y lixiviación, mientras que los métodos avanzados incluyen estereolitografía, sinterización selectiva por láser, bioimpresión 3D y descelularización (Eltom, Zhong, & Muhammad, 2019).

1.1.3.2.1. Métodos manuales

El gas foaming, también conocido como espumado de polímero con gas, es una técnica basada en la formación de dos fases, una sólida y otra gaseosa, que da lugar a una espuma rígida y porosa, sin embargo, su uso es reducido debido su dificultad en el control en el tamaño de los poros (Costantini & Barbeta, 2018). El electrohilado, por otro lado, emplea fuerzas electrostáticas para generar andamios nano o micro fibrosos que simulan la matriz extracelular (Jun, Han, Edwards, & Jeon, 2018). La función de solventes y lixiviación es considerada como uno de los primeros métodos empleados en la fabricación de andamios, consiste en una mezcla de un polímero disuelto con una sal insoluble, posteriormente se elimina el solvente obteniendo así un compuesto sal - polímero y finalmente la sal es retirada por lavado (Sola et al., 2019).

Liofilización

La liofilización, también conocida como secado por congelación, es uno de los métodos utilizado en la fabricación de andamios biológicos 3D. Este método consiste en la disolución de un polímero natural o sintético en un disolvente apropiado, para posteriormente convertirlo en un sólido mediante tres pasos: 1) preparación de la solución, 2) modelado de la solución y 3) congelación y secado (primario y secundario) a presión baja, siendo este último paso el más importante, donde los componentes

congelados y descongelados se eliminan por sublimación y desorción, respectivamente (Figura 5) (Capuana et al., 2021).

La liofilización es un método altamente eficiente para obtener andamios con un alto porcentaje de porosidad, aproximadamente del 90 %, y tamaños de poros entre 20 y 200 micrómetros. Los parámetros de porosidad y tamaño de poro se obtienen mediante la manipulación de variables como la concentración de polímero, tasa de congelación y temperaturas empleadas en el proceso (Collins et al., 2021). Adicionalmente, la liofilización permite conservar la estructura y morfología del andamio, garantizando una adecuada interacción entre el andamio y el tejido.

Sin embargo, la liofilización presenta ciertas desventajas como: alto consumo energético dado que se requiere un alto vacío para la generación de porosidad e interconectividad, uso de solventes citotóxicos y largo tiempo de producción (Eltom et al., 2019). A pesar de esto, la liofilización sigue siendo uno de los métodos más utilizados para la fabricación de andamios biológicos debido a su eficacia en la obtención de andamios porosos y su capacidad para conservar la estructura y morfología del andamio.

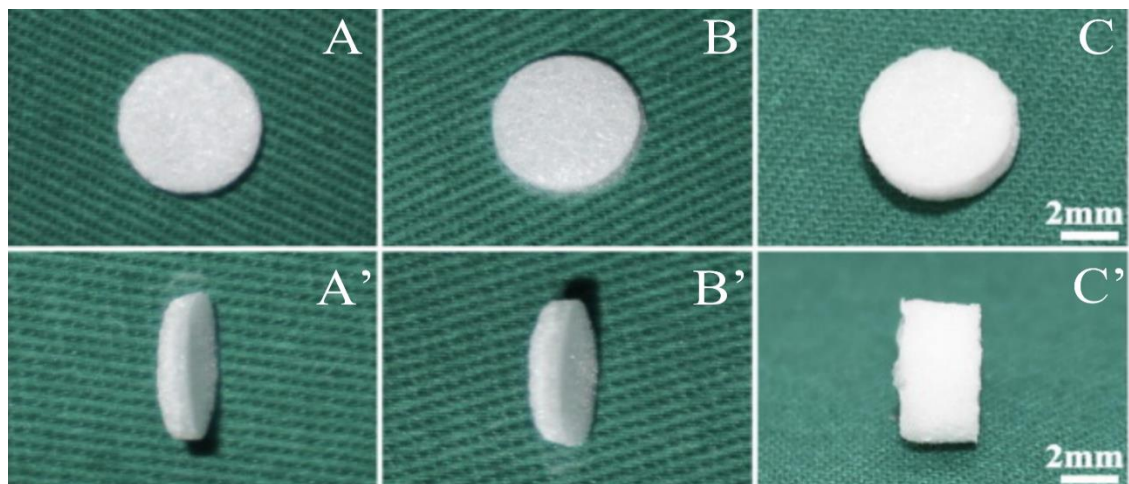


Figura 5. Andamios biológicos elaborados por liofilización.

Fuente: (X. Zheng et al., 2022). Se muestran andamios obtenidos por el método de liofilización, utilizando colágeno y bevacizumab. A y A' andamio monocapa de colágeno, B y B' andamio monocapa de bevacizumab y colágeno, y C y C' andamio bicapa de bevacizumab y colágeno.

1.1.3.2.2. Métodos avanzados

La estereolitografía o fotocurado es un sistema de bioimpresión 3D que utiliza métodos de excitación de fotones único y multifotón, en los que se absorbe energía por un fotoiniciador para generar radicales libres (Kumar & Kim, 2020). La síntesis selectiva por láser se refiere a la construcción de estructuras 3D mediante el calentamiento de un filamento de polímero sobre una superficie donde se solidifica, obteniendo un andamio capa por capa (Z. Liu et al., 2019). Las técnicas mencionadas son llamadas como fabricación aditiva (AM) consiguiendo una reducción del 70 % y 90 % en costo y tiempo de producción, respectivamente (DiNoro et al., 2022). Por último, la descelularización de órganos es una técnica que consiste en retirar las células de un órgano para obtener una estructura sólida que pueda utilizarse como andamio (Saldin et al., 2017).

1.1.4. Características de los andamios biológicos para la IT

La ingeniería de tejidos requiere la construcción de soportes o andamios biológicos (AB) que permitan la regeneración de tejidos con algún tipo de defecto, especialmente en pacientes con daños en tejidos tisular. Para que este proceso ocurra, los ABs deben simular las características de la matriz extracelular del tejido original facilitando así la migración, proliferación, diferenciación y adhesión celular (Piaia et al., 2020). De manera general, para que un andamio cumpla su función de regeneración, debe cumplir con ciertas propiedades como la porosidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y bioactividad (Figura 6) (Nokoorani, Shamloo, Bahadoran, & Moravvej, 2021a).

CARACTERÍSTICAS DE LOS ABs

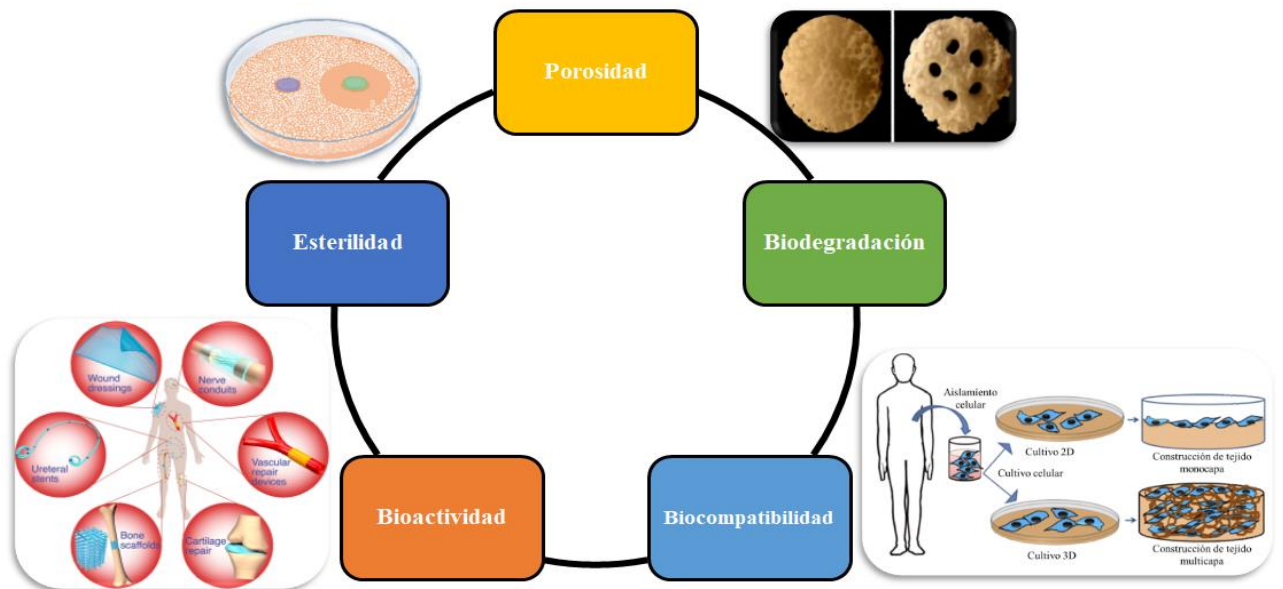


Figura 6. Características de los andamios biológicos.

Características principales que deben cumplir los andamios biológicos para su uso en ingeniería de tejidos.

1.1.4.1. Porosidad

La porosidad es una característica que influye directamente sobre el comportamiento de las células, este parámetro se determina por el tamaño de los poros, distribución espacial, forma e interconexión mutua, lo que proporciona una adecuada integración del tejido y andamio, migración celular, vascularización, permeabilidad y propiedades mecánicas (Bartoš et al., 2018).

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje de porosidad los andamios pueden presentar ciertas características; andamios con una baja porosidad presentan una superficie más grande que favorece a la fijación celular inicial, mientras que, una elevada porosidad favorece la difusividad de nutrientes y permeabilidad hidráulica, no obstante, la densidad celular y proliferación serán menor, además, las características mecánicas del mismo se verán afectadas (Lutzweiler et al., 2020).

1.1.4.2. Biodegradabilidad

Otra característica que deben presentar los andamios es la biodegradabilidad, la cual se relaciona con el tipo de enlace del biomaterial empleado, dando paso a una descomposición química (enlaces hidrolíticos) o enzimática al entrar en contacto con organismos vivos (Krishani et al., 2023). La capacidad de un andamio de biodegradarse favorece su uso en terapias regenerativas evitando así su extracción en procesos quirúrgicos (Kirillova et al., 2021). Dicha característica se relaciona con la bioactividad de los andamios, debido a que la tasa de degradación debe ser sincrónica con la tasa de regeneración del tejido (Bitar & Zakhem, 2014; Nitti et al., 2021), además, se debe considerar que el andamio no produzca compuestos tóxicos para que estos sean liberados al organismo sin afectar órganos o tejido circundante (Perić Kačarević et al., 2020).

1.1.4.3. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un andamio de integrarse en el organismo sin promover alteración en las funciones celulares o toxicidad aguda en el tejido (Lutzweiler et al., 2020). Dado que el andamio se utilizará como un implante en el cuerpo humano, es importante considerar posibles respuestas sistémicas inesperadas. Para garantizar su seguridad, es necesario evaluar y eliminar posibles efectos adversos como la citotoxicidad, genotoxicidad, inmunogenicidad, mutagenicidad y trombogenicidad (Jang et al., 2023). Es fundamental abordar esta problemática a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* para comprender las posibles reacciones en el cuerpo y su interacción con el sistema inmunitario (Ivanov et al., 2019).

Como se mencionó, la biocompatibilidad permite que el andamio se integre al organismo sin causar efectos adversos sobre este; los ABs al ser empleados en trasplantes entran en contacto con fluidos sanguíneos, lo que podría provocar algún

tipo de respuesta particular, por lo que, se requiere una característica adicional conocida como hemocompatibilidad. Es un tema complejo ligado al comportamiento de los materiales o dispositivos frente a la sangre, se rige fundamentalmente a la bioquímica de coagulación e interacción con el material sanguíneo, aunque también depende del diseño y la función que cumplirá en el torrente sanguíneo (Balan & Verestiuc, 2014). De tal manera que, la hemocompatibilidad evalúa procesos de coagulación, hemólisis, hematología y función plaquetaria (Schimper et al., 2023)

1.1.4.4. Bioactividad

La bioactividad se refiere a la capacidad de un biomaterial de interactuar con el entorno biológico (componentes celulares circundantes) y así mejorar procesos fundamentales como la adhesión, migración y proliferación celular controlada y favorable, mientras se previene procesos indeseables de reparación como la cicatrización excesiva (Krishani et al., 2023d; Stratton, Shelke, Hoshino, Rudraiah, & Kumbar, 2016). Esto se logra mediante el diseño de andamios bioactivos que contienen mitógenos, que son factores que estimulan el crecimiento celular, lo que a su vez promueve una regeneración tisular selectiva. De esta manera, el andamio no solo proporciona soporte físico y bioquímico, sino que también contribuye con un microentorno 3D favorable (Ramos, Segura, González, & González, 2022).

1.1.4.5. Esterilidad

Dentro de las características que deben cumplir los biomateriales para su uso en ingeniería de tejidos incluye la esterilidad, se define como un proceso que provoca la destrucción o eliminación total de cualquier forma de vida microbiana (bacterias, virus y levaduras) mediante la aplicación de métodos físicos o químicos. En muchas ocasiones, la desinfección se confunde con el término de esterilización, este parámetro se diferencia dado que, a pesar de eliminar una gran cantidad de organismos patógenos, no permite la eliminación de esporas bacterianas. Para conseguir un andamio estéril,

se debe puede considerar dos parámetros: fabricación aséptica o aplicación de esterilización terminal (métodos de esterilización/desinfección).

La eficacia del método de esterilización dependerá fundamentalmente del tiempo de exposición, concentración del germicida, temperatura, pH y humedad relativa empleada, por lo que, de acuerdo con el control de estos parámetros, se busca obtener andamios biológicos con un impacto insignificante sobre sus propiedades, además de aportar un ambiente inocuo procurando un efecto positivo en el proceso de cultivo celular y posterior generación del tejido (Horakova et al., 2020).

La búsqueda de un método de esterilización eficiente en andamios biológicos biodegradables es uno de los desafíos más controversiales en la actualidad, debido a que, se requiere un método que no tenga efectos nocivos sobre las propiedades fisicoquímicas, morfología o rendimiento biológicos, esto con el fin de mantener un alto índice de biocompatibilidad con el tejido y así ser empleados como andamios implantables estériles, es decir, andamios totalmente inocuos (Griffin et al., 2018a).

Por lo que, la selección del método de esterilización eficiente para los andamios biológicos dependerá principalmente de las propiedades de los biopolímeros empleados; las técnicas de esterilización de uso común se encuentran clasificadas en tratamiento químico (óxido de etileno, etanol), técnicas de irradiación (gamma y ultravioleta), tratamiento con antibióticos y tratamiento térmico (Łopianiak col., 2020).

El óxido de etileno (EO, por sus siglas en inglés) es un método que funciona a baja temperatura y es de fácil acceso, no obstante, afecta la morfología de los andamios y puede presentar remanentes tóxicos para las células (Moerman & Mager, 2016). La irradiación gamma, es un método catalogado como simple, efectivo y de alta

penetración, sin embargo, al igual que el método anterior, provoca un cambio en la morfología del andamio incluyendo sus propiedades químicas y mecánicas (Rediguieri et al., 2016).

El tratamiento con antibióticos se basa en el uso de soluciones antimicrobianas (vancomicinas, gentamicina, penicilina, ciprofloxacina, entre otros) donde la concentración y composición dependerá de los potenciales microorganismos presentes en el material (Serrano et al., 2022). Finalmente, el tratamiento térmico se aplica únicamente a biomateriales termo resistentes, por lo que, no se recomienda su uso en andamios biodegradables (Łopianiak col., 2020).

1.1.4.5.1. Etanol

El etanol (EtOH) es uno de los métodos más sencillos de esterilización debido a su bajo costo de tratamiento y condiciones sencillas de manejo. Este método se basa en la desnaturalización de proteínas, disolución de lípidos membranales y deshidratación celular provocando la irrupción de los procesos metabolitos y lisis celular (Dai et al., 2016a).

La concentración recomendada para conseguir la inactivación bacteriana va del 60 % al 80 %, no obstante, su capacidad limitada de inactivación sigue siendo un problema, ya que se ha reportado que permite la inactivación de bacterias grampositivas, gramnegativas y ácido-bacilos rápidos, además de virus lipofílicos, bacterias vegetativas y virus envueltos, pero no esporas de bacterias, virus no envueltos, priones, ni fúngicos (Juwarkar, 2013).

Otra problemática relacionada con el uso del EtOH es su influencia directa sobre las propiedades mecánicas de los andamios, en donde se ha reportado una reducción en la

resistencia a la tracción y aumento en el módulo de Young una vez aplicado el tratamiento de esterilización (Łopianiak col., 2020). Es necesario considerar que no se considera un método de esterilización, sino de desinfección debido a su nula capacidad para eliminar esporas de bacterias; además puede provocar la desnaturalización de proteínas reduciendo significativamente el contenido de colágeno, provocando cambios en el andamio (Tao et al., 2021).

1.1.4.5.2. Irradiación ultravioleta

La irradiación ultravioleta (UV) es un enfoque innovador empleado en procesos de esterilización de andamios biodegradables (Evrova et al., 2019). Su uso provoca un daño severo sobre las moléculas de ADN de los organismos, previniendo su replicación y, por ende, su inactivación.

Para conseguirlo, la irradiación UV produce la excitación de electrones y formación de fotoproductos (sustancias químicas producto de la interacción con la luz UV con los enlaces químicos del andamio), se lo considera efectivo frente a bacterias vegetativas y virus envueltos, sin embargo, no inactiva micobacterias, esporas de bacterias, virus no envueltos, priones y fúngico (Dai et al., 2016a).

Para conseguir que el método sea efectivo, se debe considerar dos características: 1) duración de la irradiación UV y 2) longitud de onda aplicada. La exposición de los andamios biodegradables por un corto o largo período será determinante en las propiedades físicas y químicas (Dai et al., 2016a). En el segundo caso, se establece que la longitud de onda recomendada este entre 200 y 280 nm, no obstante, la longitud de onda mayormente letal se encuentra en 260 nm (Raeiszadeh & Adeli, 2020). Cabe mencionar que la esterilización por medio de este método puede causar la degradación no deseada del andamio, por lo que, el tiempo de exposición serán fundamental al utilizar este método de desinfección (Elashnikov et al., 2019).

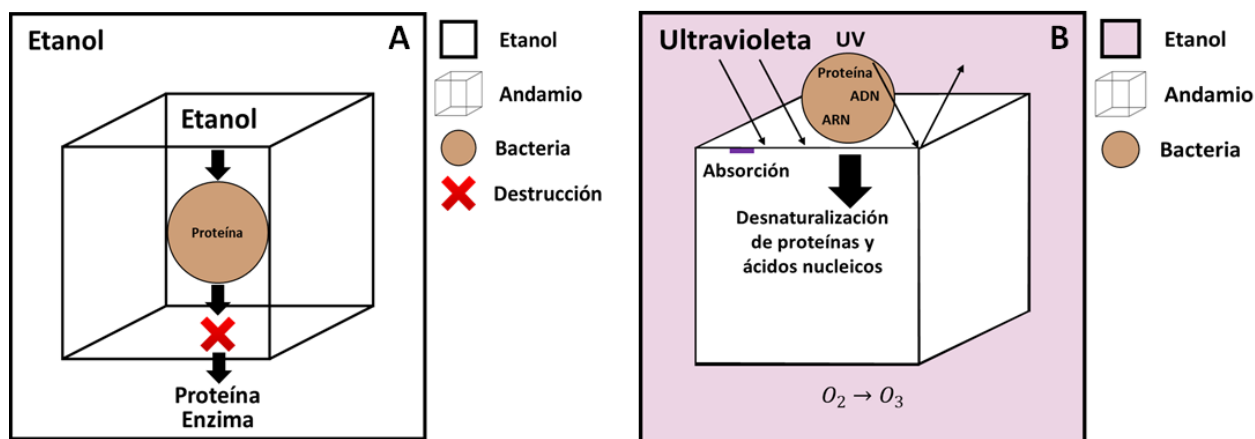


Figura 7. Mecanismo de desinfección de los andamios biológicos.

A) Etanol (desnaturalización de las proteínas y destrucción del sistema enzimático microbiano) y B) Radiación ultravioleta (Desnaturalización de los ácido nucleico y proteínas; puede provocar la producción del de ozono a partir del aire, teniendo efectos bactericidas).

1.1.4.6. Desafíos actuales

En los últimos años, el estudio y desarrollo de andamios biológicos ha avanzado significativamente. No obstante, aún existen desafíos que obstaculizan el aprovechamiento pleno de la ingeniería de tejidos (IT). Uno de los desafíos más relevantes es la disponibilidad de biomateriales óptimos que posean propiedades físicas y biológicas adecuadas, debido principalmente a la obtención de biomateriales. Por ejemplo, el colágeno obtenido de tejido bovino y porcino puede desencadenar preocupaciones como el riesgo de transmisión zoonótica, reacciones inmunológicas y costos de purificación elevados (Liu et al., 2022). Por otro lado, ciertos biopolímeros pueden provocar la liberación de sustancias tóxicas en el proceso de biodegradación. Tal es el caso del ácido poliláctico (PGA) que tiene como subproducto el ácido láctico y glicólico, produciendo una alteración en el pH afectando perjudicialmente a células y tejidos circundantes (Ramos-Zúñiga et al., 2022).

Otro desafío en la elaboración de los andamios es la emulación de la matriz extracelular del huésped, ya que su composición y estructura varía según el tipo de

tejido. Esto dificulta la interacción entre el andamio y el tejido, limitando funciones básicas como la homeostasis, mecanotransducción y proceso de regeneración (Costa et al., 2017).

La porosidad, el tamaño y su interconectividad también son un problema en la elaboración de los andamios (Bartoš et al., 2018). Si bien una alta porosidad favorece la difusión de oxígeno, el transporte de nutrientes y agua, la regeneración e infiltración celular, también puede provocar propiedades mecánicas deficientes en el andamio (Adel et al., 2022).

Además, la porosidad también está relacionada con la vascularización de los andamios, ya que una baja porosidad puede provocar una baja vascularización e inserción celular, mientras que una porosidad elevada puede dificultar la distribución adecuada de oxígeno y nutrientes en todo el andamio, lo que podría resultar en necrosis y muerte del tejido (Kang & Chang, 2018). Por lo tanto, es necesario encontrar un equilibrio adecuado entre porosidad y resistencia mecánica.

Finalmente, encontrar un método adecuado de esterilización ha sido un desafío, pues la falta de técnicas diseñadas específicamente para andamios biológicos biodegradables no han podido ser solventadas por métodos previamente establecidos como tratamientos térmicos, irradiación gamma y EtO, técnicas que provocan un cambio en las propiedades estructurales y bioquímicas del andamios, eliminando sus características de bioactividad y biocompatibilidad debido al que podría suponer problemas de seguridad (Dai et al., 2016a).

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación muy prometedor que tiene el potencial de revolucionar la medicina regenerativa. Sin embargo, existen desafíos significativos que deben superarse antes de que la tecnología pueda ser utilizada de

manera efectiva en la clínica. Los avances en la ciencia de materiales, la biología celular y molecular, y la ingeniería de tejidos están permitiendo a los investigadores abordar estos desafíos y trabajar hacia la creación de andamios biológicos y tejidos funcionales (Sefat et al., 2019).

Es así como esta investigación se basó en la caracterización *in vitro* de andamios biológicos de colágeno y quitosano teniendo en cuenta sus propiedades biomédicas, se analizó la porosidad, hemocompatibilidad y biodegradabilidad, que son características fundamentales que deben tener para que puedan ser empleados en la IT. Además, se evaluaron métodos de esterilización sobre los andamios biológicos, con el fin de garantizar un ambiente inocuo y libre de fuentes de contaminación.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar andamios biológicos a partir de biopolímeros naturales mediante ensayos *in vitro* para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Elaborar andamios biológicos por liofilización empleando biopolímeros naturales
- Analizar la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas.
- Comparar dos métodos de esterilización para andamios biológicos a fin de garantizar su asepsia.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Los materiales empleados para el desarrollo del presente trabajo de investigación (reactivos, material fungible y equipos de laboratorio) se presenta a continuación:

2.1.1. Reactivos

- Ácido acético glacial
- Agua desionizada (dH₂O)
- Agua destilada
- Agua estéril
- Caldo Müller – Hilton
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃)
- Citrato de sodio
- Cloruro de Calcio (CaCl₂)
- Etanol 65 %
- Etanol 70 %
- Kit de cuantificación de LDH
- Kit de ensayo de hemoglobina
- Medio Agar – Agar
- Medio Müller – Hilton
- PBS
- Sangre
- Tritón X-100

2.1.2. Material fungible

- Cajas petri de plástico
- Frasco ámbar de 500 mL
- Frascos de vidrio de tapa azul de 500 mL

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Micropipetas de 0 a 100 μ L
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Placas no estériles de 96 pocillos
- Placas para cultivo celular de 96 pocillos
- Probetas de 500 mL
- Tubos de centrifuga cónicos de 10 mL
- Tubos de ensayo con rosca
- Tubos Falcon
- Tubos para muestras de sangre
- Vasos de precipitación de 50, 100, 200, 500 y 1000 mL

2.1.3. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Centrifuga
- Congeladora
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Liofilizador
- Microscopio electrónico de barrido (SEM)
- Plancha de calentamiento
- Ultracongeladora

2.2.Métodos

2.2.1. Elaboración de andamios biológicos por liofilización empleando biopolímeros naturales

2.2.1.1. Obtención de colágeno y quitosano

El colágeno que se utilizó para la elaboración de los andamios fue de tipo I extraído de res, gentilmente donado por el PhD. Orestes López Docente – Investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En cuanto al quitosano que se utilizó es de la marca Chemsavers con un 90 % de desacetilación de bajo peso molecular. El mismo fue donado por el PhD. Irvin Tubón Docente – Investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.1.2. Preparación de la solución de colágeno

Se preparó la solución de colágeno siguiendo el método modificado de Offeddu et al., (2016). Para esto, se pesó 0.15 g de colágeno y se disolvió en 13 mL de ácido acético 0.05 M. El colágeno fue añadido de forma progresiva hasta alcanzar una concentración final de 1 % (p/v). Además, se agregó 0.075 g de agarosa en 2 mL de PBS. De esta forma se mantuvo la concentración de la solución. Finalmente se añadió la solución de agarosa sobre la solución de colágeno, manteniendo agitación constante hasta su homogenización.

2.2.1.3. Preparación de la solución de quitosano

Se preparó la solución de quitosano siguiendo el método de Martínez et al., (2015), con algunas modificaciones. Para esto, se pesó 0.15 g de quitosano y se disolvió en 13 mL de ácido acético 0.05 M, de forma progresiva hasta alcanzar una concentración

final de 1 % (p/v). Además, se agregó 0.075 g de agarosa en 2 mL de PBS. De esta forma se mantuvo la concentración de la solución. Finalmente se añadió la solución de agarosa sobre la solución de quitosano, manteniendo agitación constante hasta su homogenización.

2.2.1.4. Preparación de la solución híbrida de colágeno y quitosano

La solución híbrida de colágeno y quitosano se preparó mediante la metodología de Perez-Puyana et al., (2019). Se disolvió 0.15 g de colágeno y 0.15 g de quitosano en 13 mL de ácido acético 0.5 M a concentraciones de 1 % (p/v) para ambos casos. Además, se agregó 0.075 g de agarosa en 2 mL de PBS. Finalmente se añadió la solución de agarosa sobre la solución del colágeno, manteniendo agitación constante hasta su homogenización.

2.2.1.5. Formación de andamios biológicos

Para la elaboración de los andamios, las soluciones se vertieron en placas y se colocaron en refrigeración durante 24 h. Posterior a ello, se introdujeron en la ultracongeladora a -75°C por 24 h. Por último, se liofilizaron a -57°C y 127 mT durante 18 h y se colocaron en un desecador (Pipattanawarothai, Suksai, Srisook, & Trakulsujaritchok, 2017).

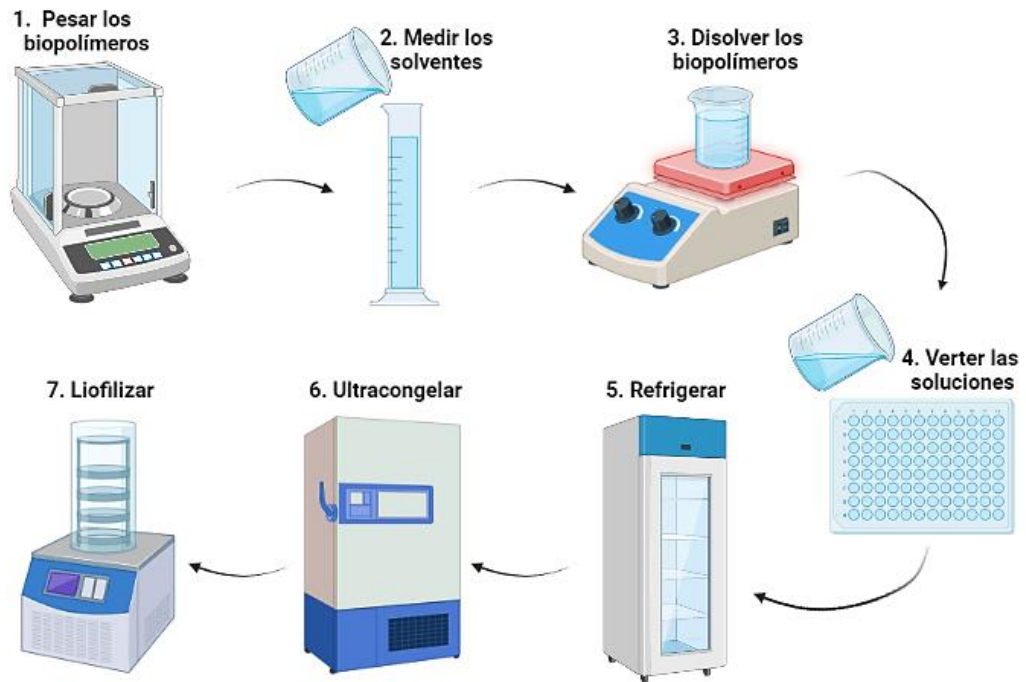


Figura 8. Proceso de elaboración de andamios biológicos.

Se muestra la metodología empleada paso a paso en la elaboración de ABs, desde el pesaje de los biopolímeros hasta la liofilización de los ABs.

2.2.1.6. Evaluación morfológica

La evaluación morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), con la cual se obtuvieron imágenes de la superficie de los andamios. Además, se calculó la porosidad con el método de infiltración de etanol, para lo cual se utilizó el peso seco de los andamios (W_{seco}), la densidad del biomaterial (ρ_1), la densidad del etanol (ρ_2) y el peso final (W_f) el cual se obtuvo de pesar el andamio después de haber estado sumergido por 24 h en etanol (Nocera et al., 2018). Estos datos se reemplazaron en la fórmula que se muestra a continuación:

$$Porosidad(\%) = \frac{(W_f - W_{seco})\rho_1}{\rho_1 W_f + (\rho_2 - \rho_1)W_{seco}} \times 100 \quad (1)$$

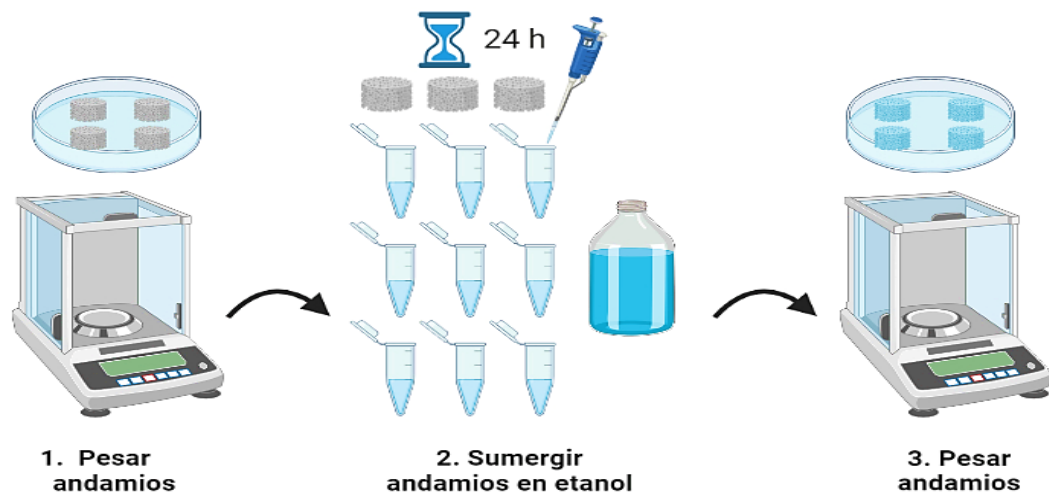


Figura 9. Proceso para la evaluación del porcentaje de porosidad de los ABs.

Esquema de los pasos a seguir para la obtención del porcentaje de porosidad de los ABs.

2.2.2. Análisis de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas

2.2.2.1. Obtención de muestras sanguíneas

La sangre se obtuvo de donantes voluntarios sanos de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Bioética para Investigación en Seres Humanos CBISH-FCS-UTA (Of. 003-CBISH-UTA-2023).

La importancia de las pruebas de hemocompatibilidad radica en que los andamios van a estar en contacto directo con sangre y en ese ambiente deberán ser capaces de permitir la proliferación celular para regenerar el tejido, evitar problemas de coagulación y la activación de una respuesta inmune que genere rechazo al andamio incorporado (Balan & Verestiuc, 2014). Con el propósito de conocer el comportamiento de los andamios elaborados en contacto con la sangre se realizaron las pruebas que se describe a continuación.

Las muestras de sangre de donantes sanos se utilizarán para la evaluación de la hemocompatibilidad empleando la metodología descrita por (Jimenez et al., 2022) con ciertas modificaciones.

2.2.2.2.Capacidad máxima de hinchazón y degradación del andamio

La capacidad máxima de hinchazón del andamio se determinó sumergiendo los andamios previamente pesados (W_o) (n = 4 andamios por grupo) en 500 uL de agua destilada, PBS y sangre por 5 s, 15 s, 30 s, 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min; posteriormente se volvió a pesar (W_f). Por último, la capacidad máxima de hinchazón se estableció por la siguiente ecuación:

$$Hinchazón(\%) = \frac{W_f - W_o}{W_o} \times 100 \quad (2)$$

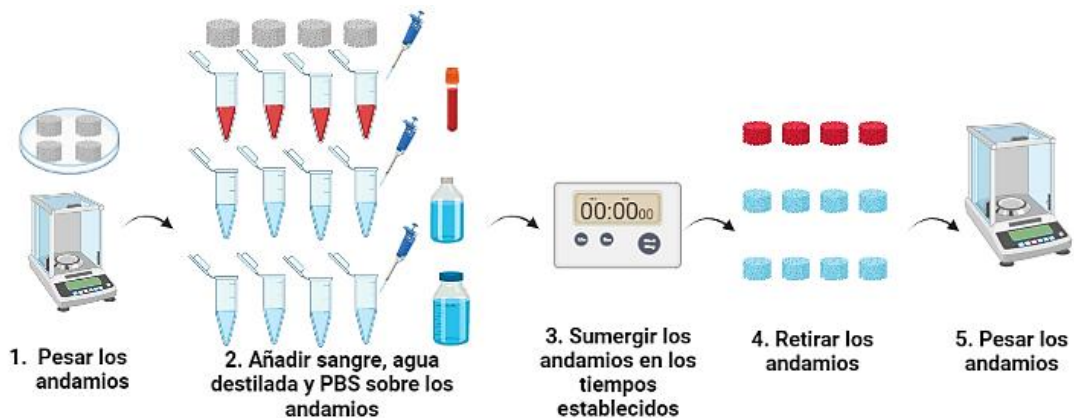


Figura 10. Evaluación de la capacidad máxima de hinchazón de los ABs.

Esquema de los pasos para la determinación de la hinchazón de los ABs en las diferentes soluciones (sangre, agua y PBS).

Para la evaluación de la degradación en sangre, andamios previamente pesados (W_o) se colocaron en placas de 96 pocillos, posterior se añadió sangre con una capacidad máxima de hinchazón del 120% y se incubó a 37°C. Se evaluó en un lapso de 2, 4 y 7 días, para lo cual se requirieron 3 placas; en cada punto de tiempo, las muestras fueron

lavadas con PBS, liofilizadas y pesadas (W_f). Finalmente, la degradación en sangre fue dada por el peso remanente de las muestras con respecto al peso inicial como lo muestra la siguiente ecuación:

$$\text{Peso residual}(\%) = \frac{W_f}{W_o} \times 100 \quad (3)$$

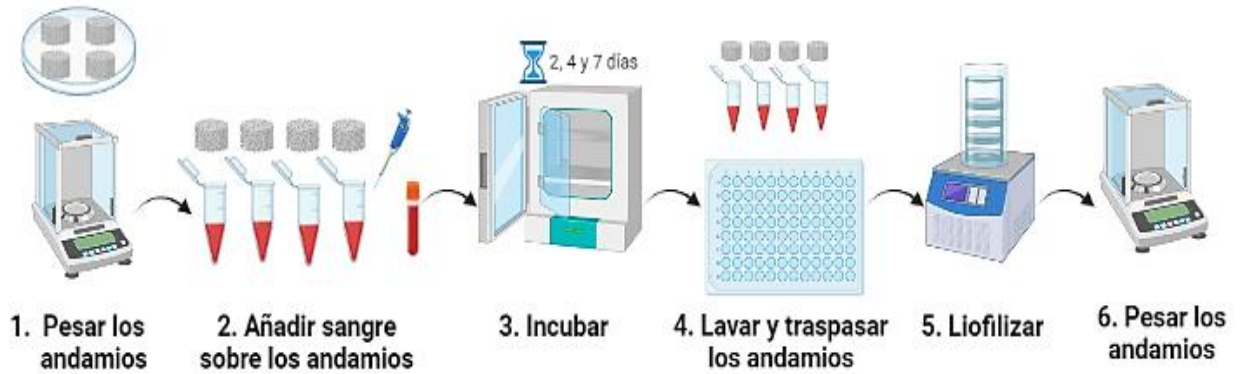


Figura 11. Evaluación de la biodegradación de los ABs.

Esquema de los pasos para la obtención del peso residual de los ABs conforme el tiempo.

2.2.2.3. Coagulación de sangre entera in vitro

Para la determinación del índice de coagulación se empleó un kit de ensayo de hemoglobina (HUMAN). Para lo cual, se obtuvo 4.5 mL de sangre entera con citrato de un donante sano. Primero, se precalentó la placa de 96 pocillos con las muestras ($n = 4$ andamios por grupo) a 37°C por 30 min, posterior, se añadió $100\ \mu\text{L}$ de sangre entera con citrato en los pocillos. Para el proceso de coagulación, se agregó $10\ \mu\text{L}$ de CaCl_2 (0.2 M) y se incubó a 37°C por 10 min a 110 rpm. Después, se adicionó $200\ \mu\text{L}$ de agua desionizada para hemolizar los glóbulos rojos que no estaban adheridos a las muestras, finalmente, se recolectó el sobrenadante y se cuantificó el contenido de hemoglobina a 540 nm (I_s). Adicionalmente, se midió la absorbancia de la celda vacía (I_o) y se preparó una solución de referencia (I_r) con $10\ \mu\text{L}$ de CaCl_2 (0.2 M), $100\ \mu\text{L}$ de sangre entera con citrato y $200\ \mu\text{L}$ de agua desionizada. Por último, el índice de coagulación sanguínea (BCI, por sus siglas en inglés) se determinó por la siguiente ecuación:

$$BCI(\%) = \frac{(I_s - I_0)}{(I_r - I_0)} \times 100 \quad (4)$$



Figura 12. Evaluación del índice de coagulación sanguínea (BCI).

Esquema de los pasos a seguir para la determinación del BCI de los ABs.

Adicionalmente, se evaluó la formación de coágulos de forma visual, para ello, se colocó las muestras ($n = 4$ andamios por grupo) en tubos Eppendorf. Se añadió $125 \mu\text{L}$ de sangre entera con citrato y $125 \mu\text{L}$ de CaCl_2 (10 mM), se incubó a 37°C por 1 min, se volteó y se agitó suavemente.

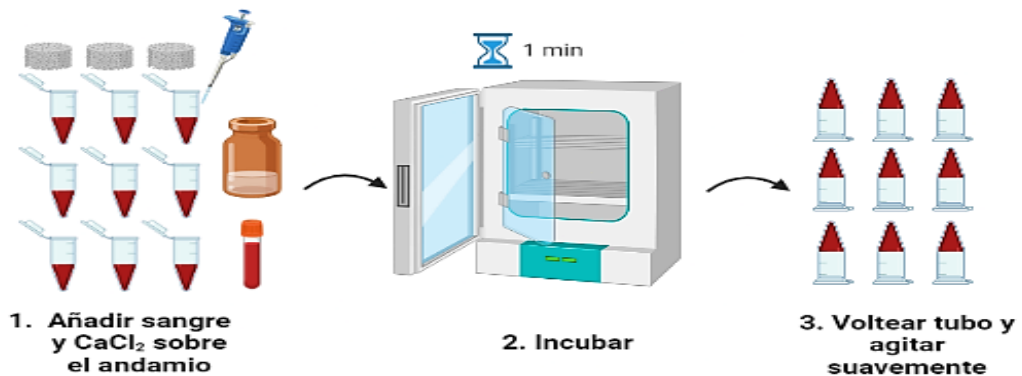


Figura 13. Método visual para la evaluación del índice de coagulación (BCI).

Esta metodología es complementaria a la presentada en la figura anterior.

2.2.2.4. Ensayo de hemólisis *in vitro*

La tasa de hemólisis *in vitro* se determinó añadiendo 100 µL de sangre entera con citrato diluida en solución salina normal (suero fisiológico) en una proporción 1:5 sobre las muestras previamente colocadas en tubos Eppendorf (n = 4 andamios por grupo). Seguido, se incubaron a 37 °C por 1 h, posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue recolectado y se cuantificó el contenido de hemoglobina (*I_s*) empleando el kit descrito en la sección 2.1.2.3. Como control positivo (*I_r*) y control negativo (*I_o*), se agregó 100 µL de sangre entera en agua desionizada y PBS, respectivamente. Por último, la tasa de hemólisis *in vitro* se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$Hemolisis (\%) = \frac{(I_s - I_o)}{(I_r - I_o)} \times 100 \quad (5)$$

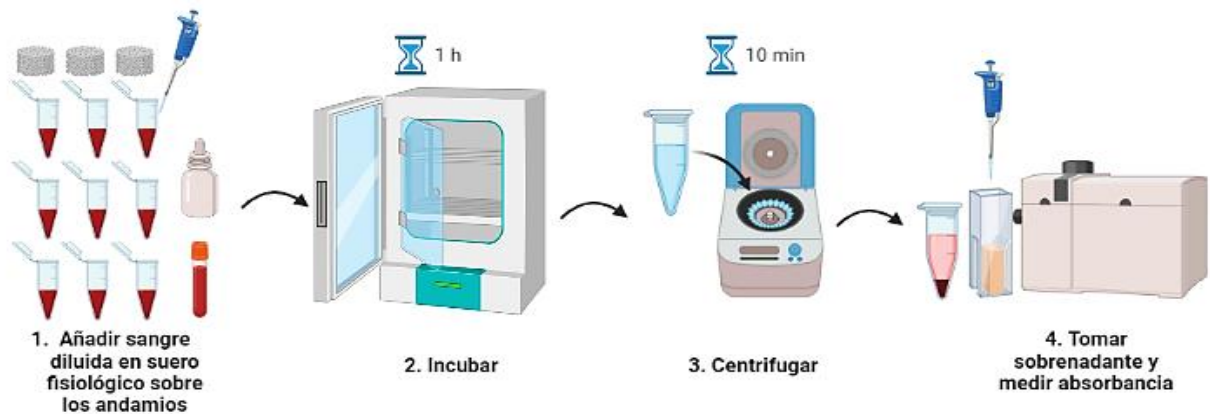


Figura 14. Evaluación del porcentaje de hemólisis de los ABs en sangre.

Esquema de los pasos para la determinación de la tasa de hemólisis de los ABs.

2.2.2.5. Adhesión de glóbulos rojos *in vitro*

Para la determinación del contenido de hemoglobina se empleó un kit de ensayo de hemoglobina (HUMAN). Primero, se añadió 100 µL de sangre entera con citrato considerando sobre las muestras dispuestas en tubos Eppendorf independientes (n = 4 andamios por grupo) y se incubó a 37 °C por 5 min y se removi6 cada material a una caja Petri limpia. Seguidamente, se coloc6 nuevamente los andamios en tubos Eppendorf, se a6adi6 200 µL de agua desionizada sobre el andamio para liberar los gl6bulos rojos adheridos y se cuantific6 el contenido de hemoglobina de la soluci6n

resultante (I_s). Por último, la concentración de hemoglobina se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{Hemoglobina}] = I_s \times 29,4 \quad (6)$$

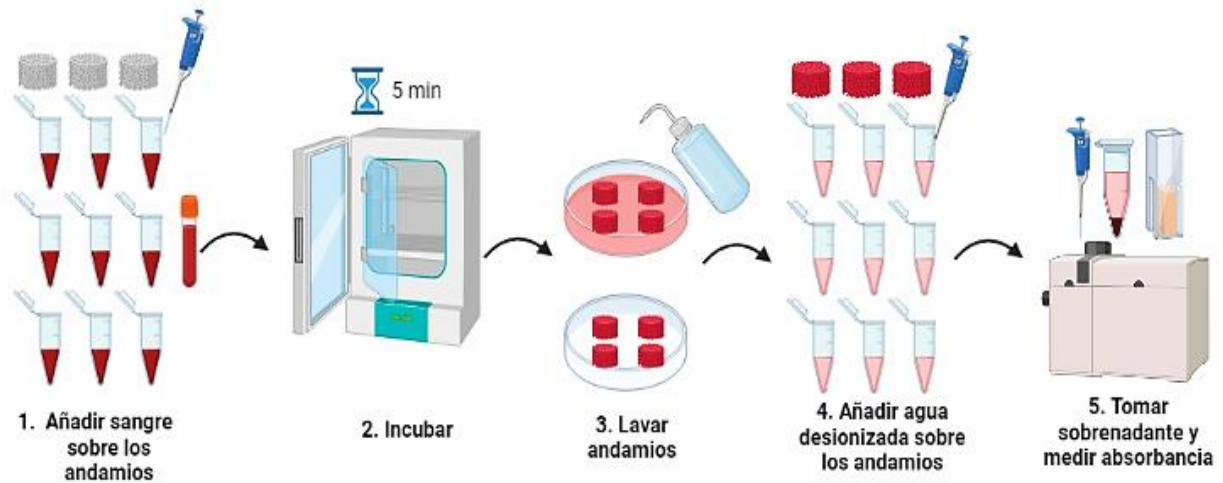


Figura 15. Evaluación de la adhesión de glóbulos rojos de los ABs.

Esquema de los pasos a seguir para la determinación de la concentración de hemoglobina en los ABs que indica la cantidad de glóbulos adheridos.

2.2.2.6. Adhesión plaquetaria *in vitro*

El estudio de la adhesión plaquetaria *in vitro* se estudió mediante un kit de ensayo de deshidrogenasa láctica (LDH) (HUMAN). Primero, se centrifugó sangre entera con citrato de sodio a 3200 rpm por 15 min para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Posterior, se agregó 100 μL de PRP a cada muestra colocadas en una placa de 96 pocillos ($n = 4$ andamios por grupo) y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Seguidamente, se añadió 200 μL de solución salina normal (suero fisiológico) hasta sumergir el material para liberar las plaquetas no adheridas. Los andamios se trasladaron a tubos Eppendorf, se añadió 300 μL Tritón X-100 al 1% disuelto en PBS, se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h y se cuantificó el contenido de LDH. Para el control positivo (I_r) y negativo (I_o) se añadió 100 μL de PRP en 200 μL Tritón X-100 al 1% y PBS, respectivamente y se midió la absorbancia a 340 nm. Por último, la liberación de LDH (%) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Liberación de LDH}(\%) = \frac{(I_s - I_0)}{(I_r - I_0)} \times 100$$

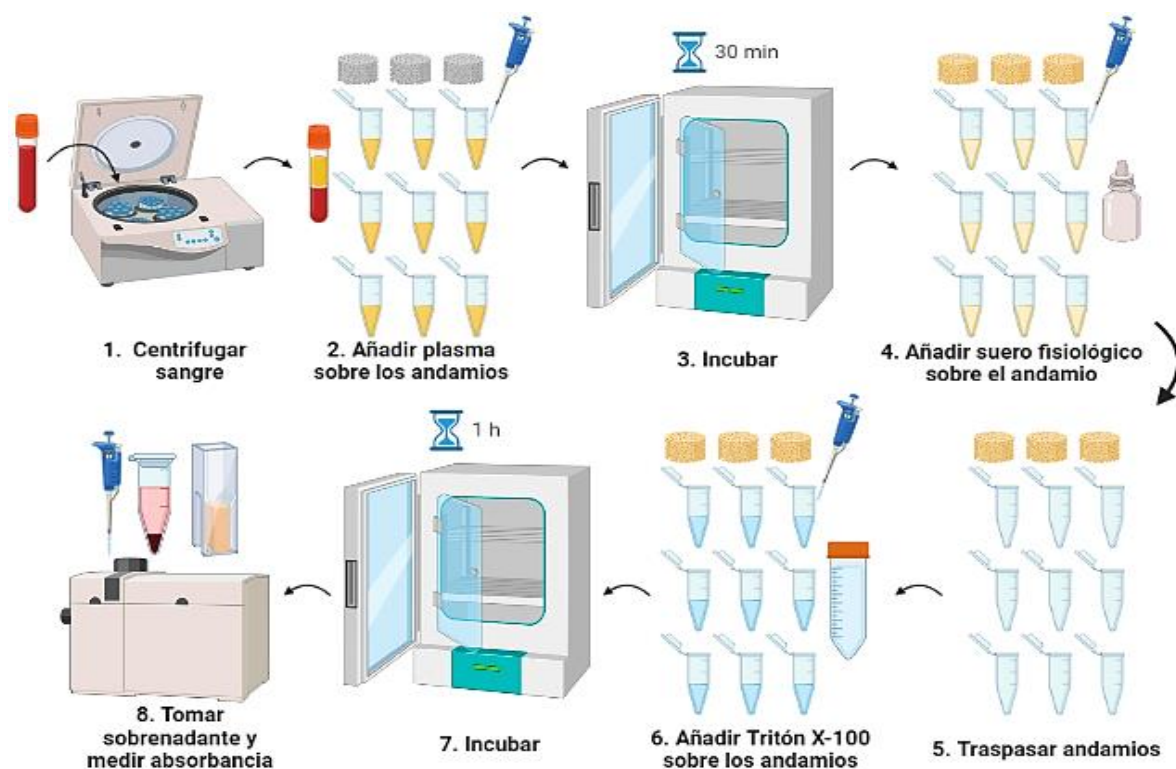


Figura 16. Evaluación de la adhesión de plaquetas de los ABs.

Esquema de los pasos para la determinación de la liberación de LDH que muestra la concentración de plaquetas adheridas a los ABs.

2.2.3. Comparación de dos métodos de esterilización para andamios biológicos a fin de garantizar su asepsia

2.2.3.1. Preparación del medio de cultivo

Se empleó Medio Agar Sangre para evaluar los métodos de esterilización. Para ello se disolvió 9 g de polvo Agar - Agar en 500 mL de agua desmineralizada. La mezcla se calentó hasta que los componentes se integren y posteriormente se autoclavó a 121°C durante 15 min. Se dejó enfriar el medio a 50 – 55 °C, seguido, se agregó sangre en una concentración del 5% v/v y se mezcló suavemente. Finalmente, se dispensó en placas estériles y se dejó solidificar.

2.2.3.2. Neutralización de los andamios

El proceso de neutralización se basó en la metodología modificada descrita por Laidmäe et al., (2018). Para la neutralización, se introdujo los andamios en una solución acuosa saturada de Na_2CO_3 a una concentración 5 M en una caja Petri y se llevó a incubación durante 1 h. Posterior a ello se eliminó la solución y se lavaron los andamios por 5 veces durante 5 min cada una con agua desionizada.

2.2.3.3. Esterilización de los andamios

2.2.3.3.1. Esterilización por etanol

Para la esterilización por etanol, se trabajó con concentraciones de etanol del 65% y 70%. Para esto, se colocó los andamios en placas Petri y se cubrió completamente con el alcohol a las concentraciones antes mencionadas por un periodo de 5 min, seguido de ello se procedió a lavar durante 5 min con PBS estéril.

2.2.3.3.2. Esterilización por luz UV

Para la esterilización por luz UV, los andamios fueron colocados individualmente en cajas Petri e introducidos en una cámara con luz UV durante 30 min. Finalmente, se procedió a retirarlos.

2.2.3.4. Evaluación de los métodos de esterilización de los andamios

Los andamios sometidos a los métodos de esterilización mencionados en el apartado 2.1.3.1., se procedió a realizar un ensayo microbiológico. Para esto, se colocaron los

andamios sobre las placas del Medio Agar Sangre y se incubó a 37°C por 24 y 48 h. Transcurrido los tiempos, se evaluó la presencia o ausencia de microorganismos

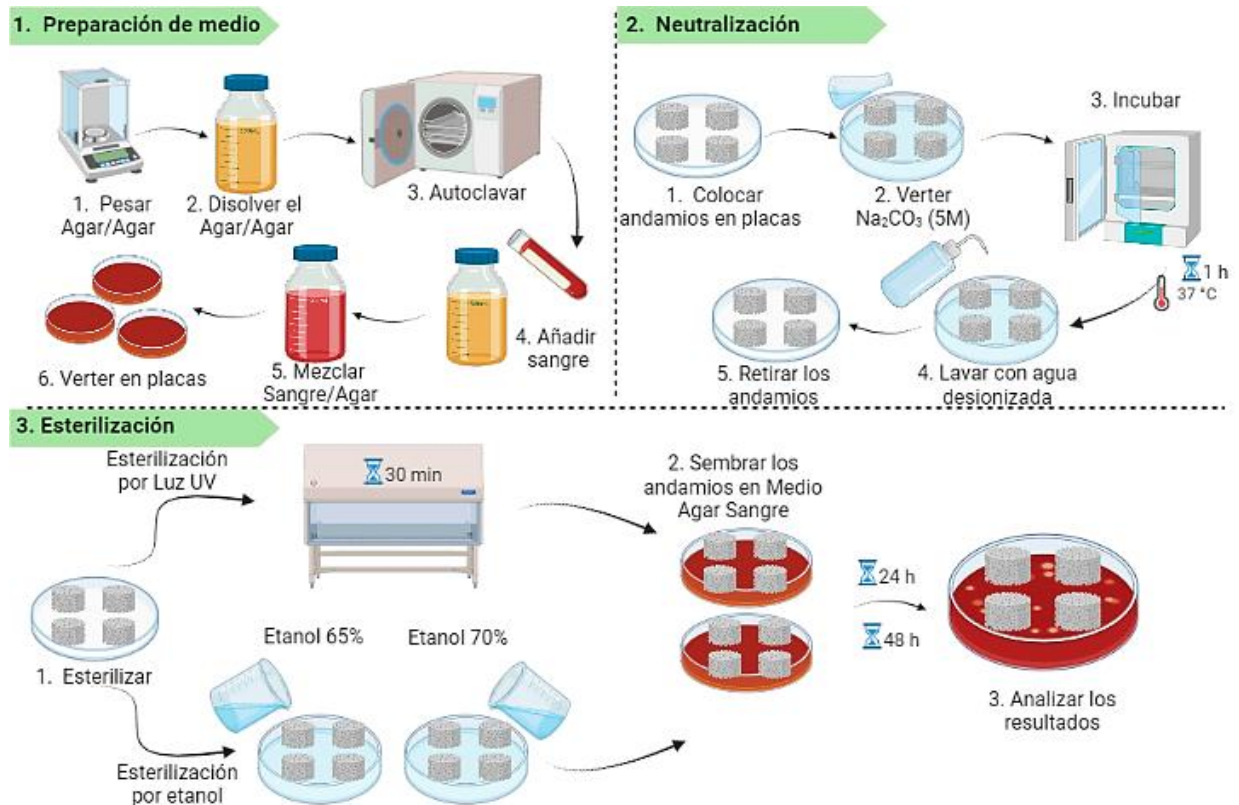


Figura 17. Métodos de esterilización en los ABs y su evaluación microbiológica.

Esquema de los pasos de los métodos de luz UV y etanol para la esterilización de los ABs y su posterior evaluación de los mismo mediante ensayos microbiológicos.

2.2.3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

2.2.3.5.1. Ensayo de inhibición celular (Resazurina)

Para determinar la inhibición celular, se preparó una concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* considerando una escala 0.5 McFarland. Seguidamente, se preparó el reactivo de resazurina al 0.2%, para lo cual, se pasó 0.2 g de resazurina y se aforó a 100 mL con agua destilada. Seguidamente, empleando una placa de 96 pocillos, se colocaron tanto andamios esterilizados como no esterilizados siguiendo la distribución presentada en la Figura X. De acuerdo con lo anterior, se colocó 200 μ L de caldo Müller-Hilton (MH) en cada uno de los pocillos y 100 μ L de solución

bacteriana, según sea el caso y dejó incubar por 24h. Posteriormente, se añadió 50 μ L de resazurina en cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente por 1h en condiciones de oscuridad. Para el control negativo (C-) se colocó caldo, solución bacteriana y gentamicina [40 mg]; para el control positivo (C+) se omitió el antibiótico. Finalmente, se dejó incubar por 1 h a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad y se midió absorbancia a 540 nm.

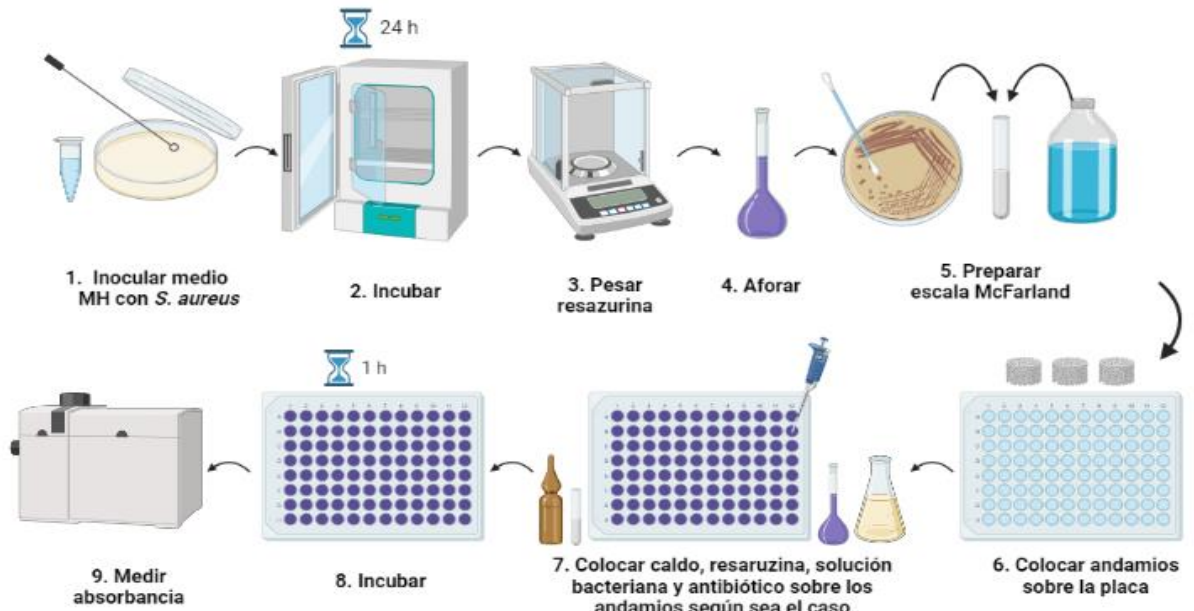


Figura 18. Evaluación de inhibición bacteriana de los ABs.

Esquema de los pasos aplicando la metodología de la resazurina para medir la actividad antimicrobiana de los ABs.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	C-	C-	C-	C-			C+	C+	C+	C+		
2												
3	1C	1C	1C	3Ce	3Ce	3Ce	4Ce	4Ce	4Ce	5Ce	5Ce	5Ce
4	1Q	1Q	1Q	3Qe	3Qe	3Qe	4Qe	4Qe	4Qe	5Qe	5Qe	5Qe
5	1H	1H	1H	3He	3He	3He	4He	4He	4He	5He	5He	5He
6	2CS	2CS	2CS	6CeS	6CeS	6CeS	7CeS	7CeS	7CeS	8CeS	8CeS	8CeS
7	2QS	2QS	2QS	6QeS	6QeS	6QeS	7QeS	7QeS	7QeS	8QeS	8QeS	8QeS
8	2HS	2HS	2HS	6HeS	6HeS	6HeS	7HeS	7HeS	7HeS	8HeS	8HeS	8HeS

Figura 19. Diagrama de distribución de andamios sobre placa de 96 pocillos.

(C-) Control negativo, (C+) Control positivo, (C, Q y H) Colágeno, Quitosano e Híbrido, (e) esterilizado, (S) S. aureus.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Elaboración de andamios biológicos por liofilización empleando biopolímeros naturales

Mediante la técnica de liofilización se obtuvieron andamios biológicos de acuerdo con su composición: 1) ABs de colágeno, 2) ABs de quitosano y 3) ABs híbridos (colágeno/quitosano). La elaboración de estos andamios se realizó utilizando las concentraciones que es muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. *Composición de los andamios biológicos elaborados por liofilización.*

Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB de colágeno	Colágeno	1
	Agarosa	0.5
AB de quitosano	Quitosano	1
	Agarosa	0.5
AB híbrido	Colágeno	1
	Quitosano	1
	Agarosa	0.5

Con el propósito de mejorar el proceso de entrecruzamiento de los polímeros utilizados se incorporó agarosa, este polímero se seleccionó debido a su capacidad para formar una red que puede ser penetrada por el colágeno y el quitosano durante el proceso de reticulación térmica (Orjuela & Clark, 2020). Además, sus características de biocompatibilidad y biodegradabilidad hacen de la agarosa un biopolímero natural excelente para la fabricación de los andamios (Samrot et al., 2023).

Las soluciones de cada uno de los polímeros se vertieron en dos diferentes recipientes: placas de 96 pocillos y cajas Petri; en el primer caso se colocó un volumen total de 150

μL de solución, mientras que, en el segundo caso, se vertió un aproximado de 30 mL de solución. Cada una de estas pasaron por un proceso de refrigeración y ultracongelación por 24 h, seguido de liofilización hasta obtener andamios completamente secos, dando como resultado los ABs que se muestran en la Figura 20. Visualmente se denota una coloración blanquecina para los ABs de colágeno, mientras que para los ABs de quitosano e híbridos se muestran ligeramente amarillentos. Además, se evidenció que los ABs de colágeno son frágiles, haciéndolos propensos a deformación, mientras que, los ABs de quitosano e híbrido presentan mayor rigidez, facilitando su manipulación. Los ABs elaborados en placas de 96 pocillos fueron retirados cuidadosamente para su posterior uso. Los ABs elaborado en caja Petri se realizaron con el fin de obtener un método estandarizado en caso de ser necesario.

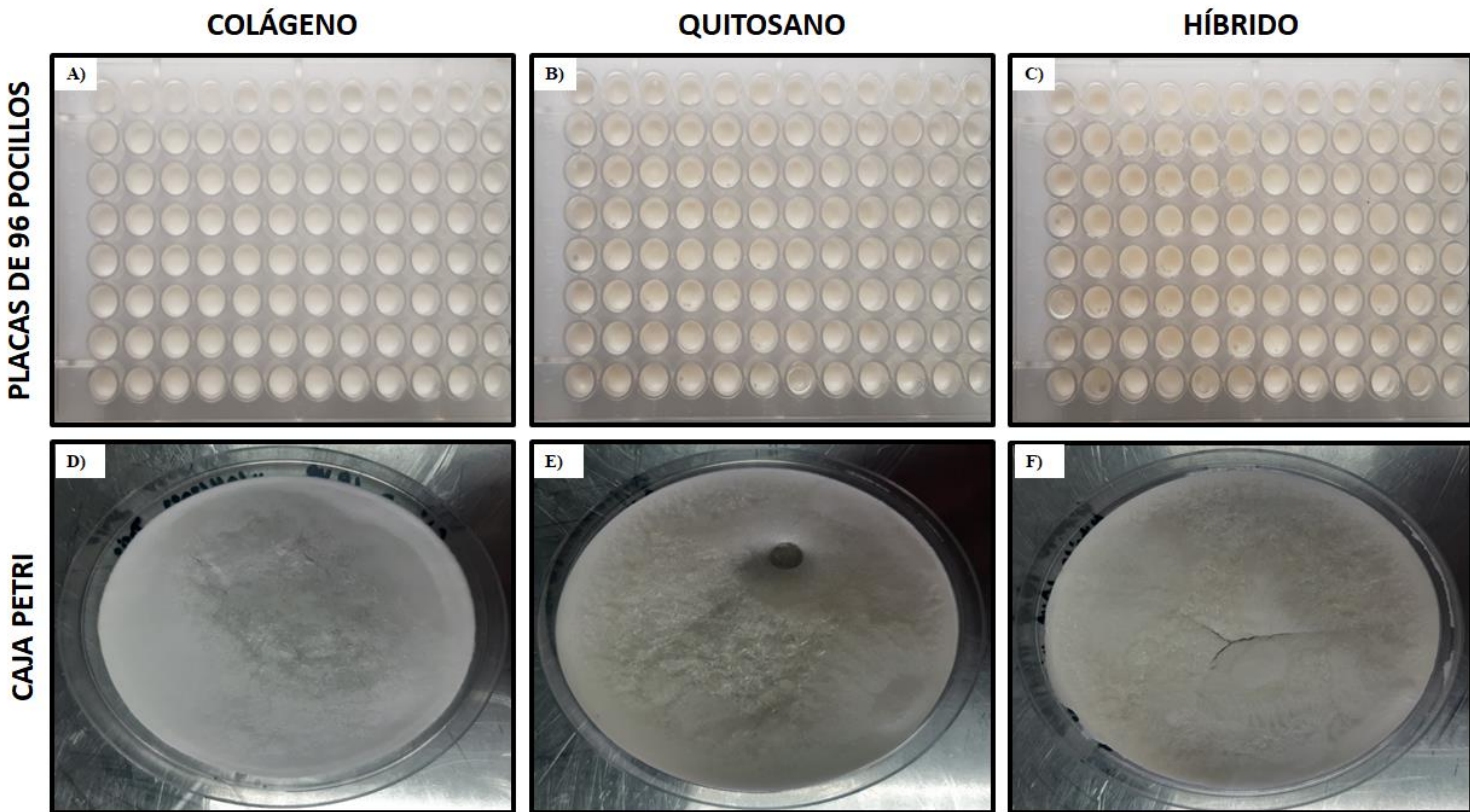


Figura 20. Andamios biológicos elaborados por el método de liofilización.

Resultados obtenidos en la elaboración de andamios biológicos mediante la técnica de liofilización en placas de 96 pocillos y caja Petri.

3.1.1.1. Evaluación morfológica de los andamios biológicos

3.1.1.1.1. Evaluación morfológica de andamios biológicos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño de poro de los andamios biológicos es un parámetro determinante en la mejora del alojamiento celular (adhesión, supervivencia, migración y diferenciación) y el paso del flujo de medio de cultivo (*in vitro*) o sangre (*in vivo*) por medio del andamio con el fin de garantizar el suministro de oxígeno y nutrientes a las células. Los andamios biodegradables presentan una interacción directa entre la tasa de degradación y los tamaños de poro, ya que, estos influirán en la formación del tejido y vascularización, este último debido a que la sangre será la encargada de transportar los nutrientes necesarios para el desarrollo del tejido, además de la eliminación de productos generados en la degradación del andamio.

En los resultados de la superficie de los andamios evaluados por SEM se observan en la Figura 21. Los ABs de quitosano se muestran en las Figuras 21A, B y C. Su superficie muestra un comportamiento poroso, irregular y rugoso. Mientras que los ABs de quitosano se muestran en las Figuras 21D, E y F y los ABs híbridos las Figuras 21G, H, I. En estos últimos, se observa una superficie relativamente lisa y porosidad reducida. Para analizar la porosidad interna los ABs fueron congelados con nitrógeno líquido y se cortaron con un bisturí (Figura 22).

La Figura 22A permitió observar la morfología interna de los AB de colágeno, no obstante, las Figuras 22B y C permitieron determinar el tamaño de poro, obteniendo valores entre 30 y 126 μm y un tamaño promedio de 75.43 μm . La Figura 22D muestra el interior de AB de quitosano, permitiendo observar una morfología porosa e irregular. La Figura 22E y F permitió definir el tamaño de los poros con valores entre 34 y 133 μm , con un tamaño promedio de 80.22 μm . En cuanto al AB híbrido (Figura 22G, H y I), se muestra una superficie más rugosa y medianamente porosa,

permitiendo definir el tamaño de poro entre 17 y 389 μm , y tamaño promedio de 126.01 μm . En base a lo mencionado, se evidencia que el colágeno presenta una mayor cantidad de poros, pero con un tamaño menor, mientras que el quitosano, los poros son de mayor tamaño, pero en menor proporción. Finalmente, los ABs híbridos muestran un tamaño y cantidad de poros mayor en contraste con los ABs de colágeno y quitosano. Evidenciando que la combinación de polímeros afecta significativamente la morfología de los andamios.

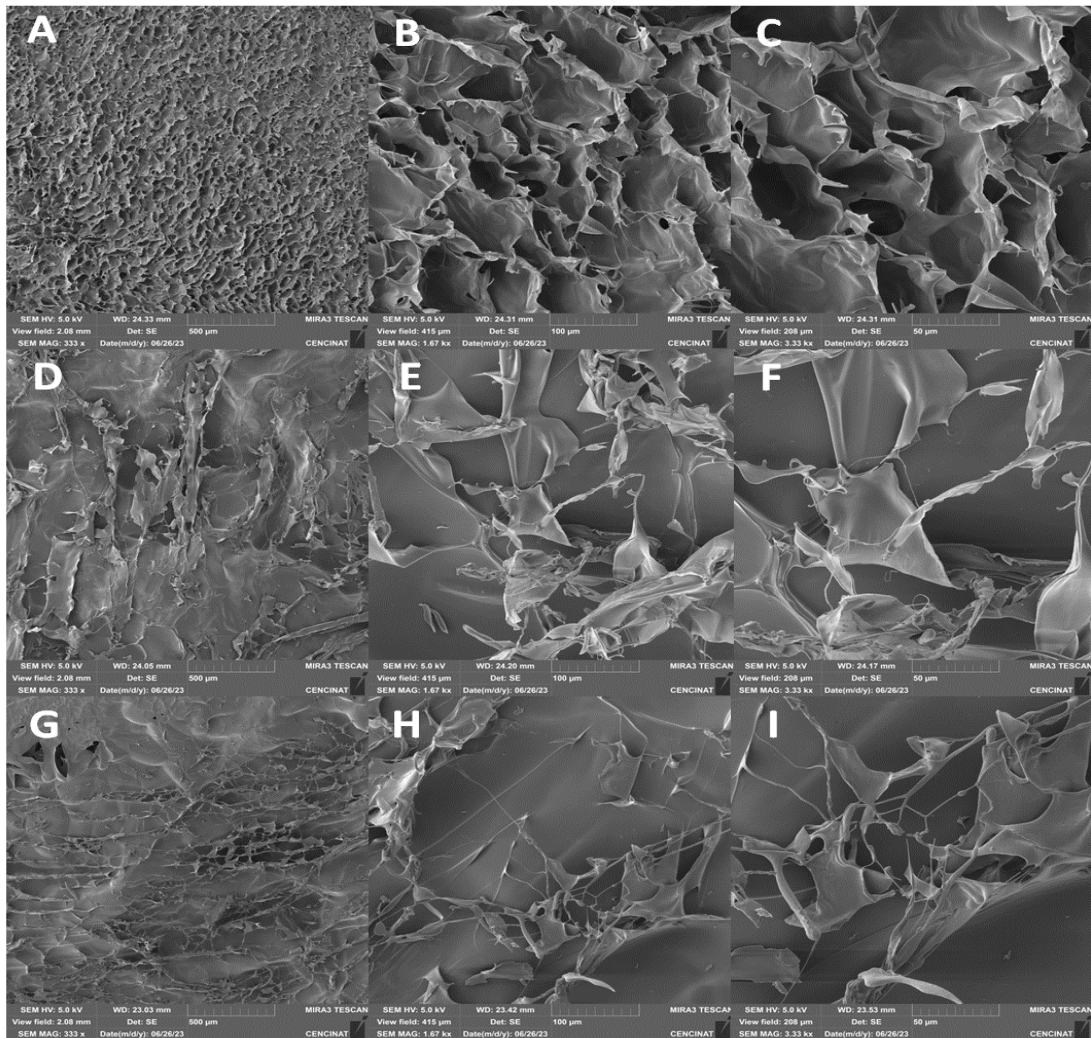


Figura 21. Superficie de los ABs liofilizados.

Observaciones morfológicas de la superficie de los ABS por SEM (A, B, C) AB de colágeno, (D, E, F) AB de quitosano y (G, H, I) AB híbrido a MAG de 333x, 1.67 kx y 3.33 kx.

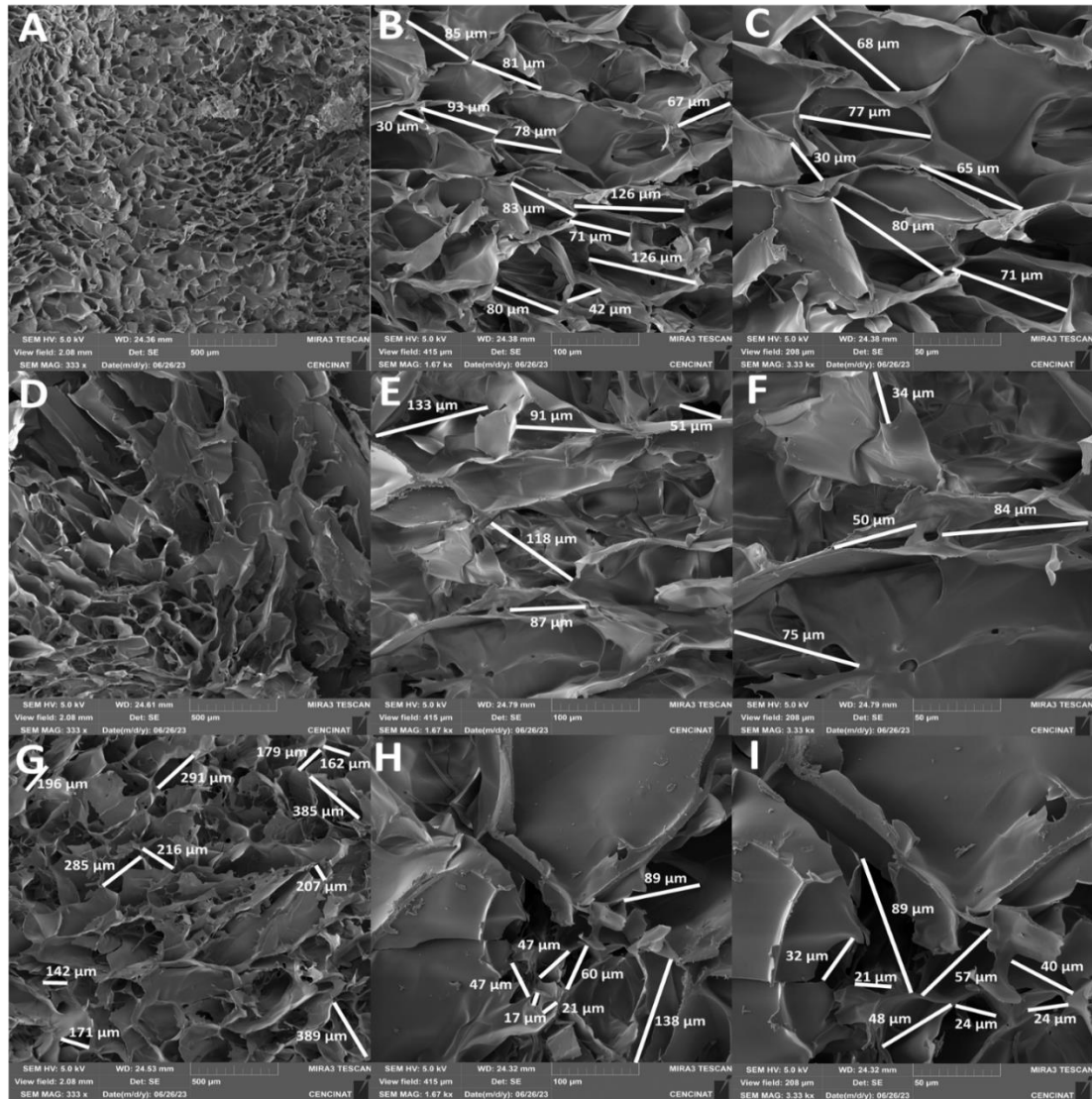


Figura 22. Evaluación de la morfología de los ABs liofilizados cortados.

Observaciones morfológicas de los poros de los ABs y medición de poros. AB de colágeno a MAG 333x (A). Tamaño de los poros de AB colágeno a MAG 1.67 kx y 3.33 kx (B, C). AB de quitosano a MAG 333x y tamaño de poros a MAG 1.67 kx y 3.33 kx (E, F). Tamaño poros de AB híbrido a MAG 333x (G), 1.67 kx (H) y 3.33kx (I).

El control de los poros y su estructura será un factor determinante en la aplicación exitosa en los diferentes campos de la ingeniería de tejidos. Por lo que, se debe considerar su estructura tanto macroporosa (poros de mayor tamaño) como microporosa (poros de menor tamaño) en los andamios biológicos. De acuerdo con el tamaño de poro de los andamios, estos podrán ser usado en diversos ampos de la IT. Tal es el caso de la infiltración y migración de células de osteoblastos, donde se

estableció que tamaño de poros de 100 a 150 μm se considera ideal, sin embargo, un tamaño de poro superior a 300 μm favorece la vascularización y regeneración de hueso nuevo, pero sus propiedades mecánicas disminuyen (Kirillova et al., 2021). Mientras que Haghbin et al., (2020) menciona que un rango de tamaño de poro de 1 – 20 μm favorece la adhesión inicial de los condrocitos.

Adicionalmente, Y. Han et al., (2021) demostró que el tamaño de poro influye directamente en la adhesión y proliferación de diferentes células, ya que, en células madre mesenquimales de médula ósea se observó mayor viabilidad en andamios con poros de 200 μm , mientras que en condrocitos el tamaño fue de 100 – 200 μm y en células madre tendinosas su viabilidad fue superior en tamaños de 300 μm . En el mismo estudio se observó que tamaños de poro de 100 y 200 μm indujeron una proliferación y expresión génica condrogénica y cartilaginosa, no obstante, tamaños pequeños de 50 y elevados de 400 μm fue inferior.

En el caso de la regeneración de tejido de piel, se establece que el rango de tamaño óptimo es de 100 a 200 μm , permitiendo una siembra de células en una alta densidad, facilitando así el suministrado eficiente de oxígeno y nutrientes (F. Han et al., 2014) Por otra parte Loh & Choong, (2013) indica que el tamaño de poro 20 – 125 μm en colágeno-glicosaminoglicano permitió la regeneración de tejido dérmico y epidérmico. No obstante, cada uno de los tamaños también está determinado por el porcentaje de porosidad de los andamios.

Otro parámetro que considerar en la obtención de un tamaño de poro determinado es el método de elaboración de los andamios, ya que como se mencionó, el uso de la técnica de liofilización permite la obtención de poros entre 20 – 200 μm (Collins et al., 2021), que en base a los resultados obtenidos, los ABs de colágeno y quitosano se encuentran dentro de dicho rango, no obstante, como se irá viendo, la combinación de polímeros afecta significativamente las propiedades de los ABs, por lo que, la

variación en el tamaño de poro es evidente. Por lo que, en cuanto a lo mencionado, los ABs de colágeno pueden podrían ser empleados en la regeneración condrogénica, cartilaginosa y epidérmica, mientras que los ABs híbrido al poseer un mayor tamaño de poro favorece la regeneración de hueso nuevo y tendones.

3.1.1.1.2. Evaluación de la porosidad de los andamios biológicos

El porcentaje de porosidad de los andamios está relacionada con la proporción del volumen total del andamio ocupado por espacios porosos. Este parámetro es crucial en ingeniería de tejidos, ya que influye en las características biológicas y mecánicas del andamio, por lo tanto, encontrar un equilibrio en el porcentaje de porosidad es fundamental (Lutzweiler et al., 2020). Este parámetro juega un papel significativo en la resistencia mecánica, degradación, difusión de nutrientes, adhesión y proliferación celular. Se expresa en un rango del 0% al 100%, donde un valor de 0% indica una ausencia total de porosidad y un valor de 100% indica que el andamio es completamente poroso (Bartoš et al., 2018; Ma, 2003).

La evaluación de este parámetro se realizó mediante de un método indirecto conocido como desplazamiento líquido o infiltración del material, en el que emplea una solución no disolvente del polímero, en este caso, el etanol, solución que penetra fácilmente en el andamio biológico sin provocar contracción o hinchazón del material de estudio (Bartoš et al., 2018; Loh col., 2013).

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 23. En el caso de los ABs de colágeno, se observó un porcentaje de porosidad superior, con un valor de 89.07 %, le siguen los ABs de quitosano con un 87.21 %, y finalmente los ABs híbridos, con un valor de 79.94 %.

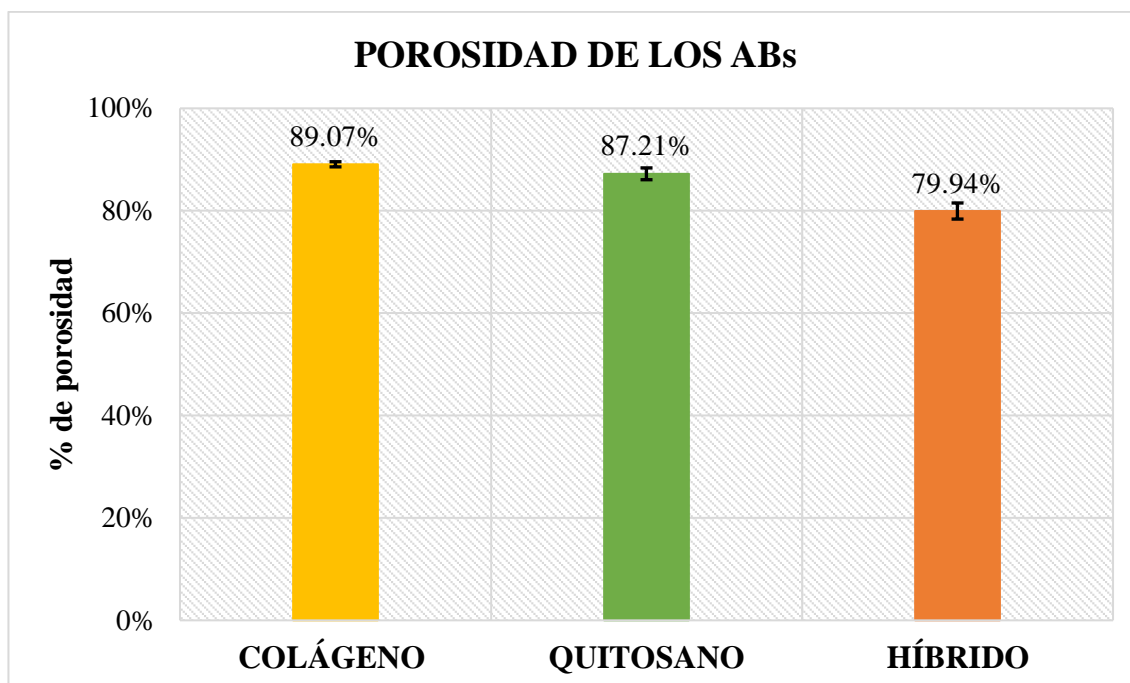


Figura 23. Resultados de la evaluación de porosidad de ABs biológicos.

Mediante el método de infiltración de etanol se obtuvo los siguientes resultados: los ABs de colágeno tienen una porosidad de 89.07% con una desviación estándar de 0.005, los de quitosano 87.21% con una desviación estándar de 0.012, y los híbridos 79.94% con una desviación estándar de 0.016.

El porcentaje de porosidad requerido en los andamios biológicos dependerá del diseño, método de fabricación del andamio y requisitos específicos de aplicación, por lo que, obtener un porcentaje de porosidad será determinante en la proliferación celular y por ende regeneración del tejido. En general, los andamios biológicos utilizados en ingeniería de tejidos deben presentar un porcentaje de porosidad entre el 70 % y 90 %, valor que varía de acuerdo con el tejido (Lutzweiler et al., 2020).

Según Ma, (2003) & Han et al., (2014) los andamios usados en ingeniería de tejido de la piel deben presentar una porosidad del 90 %, valores que demostró son determinantes en la diferenciación y proliferación de células epiteliales favoreciendo la regeneración del tejido tisular.

Un estudio realizado por Deng et al., (2021) demostró que un porcentaje de porosidad superior al 80% en andamios de colágeno recombinante y quitosano es eficiente para la propagación y migración de fibroblastos (NIH 3T3), permitiendo la regeneración del tejido conectivo. Además, se determinó que un nivel de porosidad entre 80 % y 90 % en andamios de quitosano combinado con 2 polímeros (gelatina y nano biovidrio) favorece la osteogénesis, que es la diferenciación, formación y desarrollo de tejido óseo a partir del cultivo de células madre mesenquimales de cordón umbilical humano (MSCs) (Maji et al., 2016). Por otra parte, se determinó que una porosidad de entre 75 % y 90 % permite la condrogénesis facilitando que las células se adhieran, proliferen y se diferencien en condrocitos, células responsables de generar la matriz extracelular del cartílago (Griffon et al., 2006).

Cabe mencionar que, la concentración del polímero en la solución será un parámetro determinante en el porcentaje de porosidad del andamio (Deng et al., 2021; Collins et al., 2021), por lo que, mediante la variación de la concentración se podría conseguir porcentajes de porosidad variados y eficientes para utilizar el mismo polímero en diferentes tejidos.

En base a lo descrito, los resultados obtenidos indican que los andamios de colágeno y quitosano pueden ser emplear en la regeneración de tejido epitelial, óseo, conectivo y cartilaginoso. Mientras que, los andamios híbridos podrían ser empleados en el cultivo de tejido ósea y conectivo (con una baja capacidad) y cartilaginoso. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los posibles usos en base al porcentaje de porosidad obtenida.

Tabla 3. Resumen de los posibles usos de los andamios en base al porcentaje de porosidad.

Tipo de ABs	Tejido			
	Epitelial	Óseo	Conectivo	Cartilaginoso
Colágeno	++	++	++	++
Quitosano	+	++	++	++
Híbrido	-	+	+	++

La simbología utilizada indicada: (-) nula capacidad, (+) baja capacidad y (++) alta capacidad de regeneración de cada uno de los tejidos.

3.1.2. Análisis de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas

3.1.2.1. Evaluación de la capacidad máxima de hinchazón

A diferencia de los apósitos tradicionales, los andamios biológicos deben mantener un ambiente húmedo con el fin de garantizar una curación efectiva y rápida, por ejemplo, en el caso de heridas en la piel. Este ambiente mejora significativamente el intercambio de sustancias en la herida (absorción de exudados), reduce el dolor, disminuye la formación de cicatrices y previene la contaminación bacteriana, por estas razones, los andamios empleados en ingeniería de tejidos deben tener la capacidad suficiente de absorber exudados y mantener humedad en la herida (Nokoorani et al., 2021). La capacidad máxima de hinchazón o absorción está directamente relacionada con el porcentaje de porosidad y la presencia de grupos hidrófilos en la estructura química de los biomateriales (Rather, Bhat, & Shalla, 2022).

Para evaluar la capacidad máxima de hinchazón de los andamios biológicos, se realizó mediciones sumergiendo los andamios en agua, PBS y sangre durante un período de 60 min. En la Figura 24. se presentan los resultados obtenidos para evaluar la capacidad máxima de hinchazón de los ABs en agua. El quitosano presenta una mayor capacidad de hinchazón, con un aumento de peso del 2623 % en solo 5 segundos hasta

alcanzar un 2466 % al fin de la prueba y un pico máximo de 2662 %. Por otro lado, el caso de colágeno presentó su pico máximo a los 5 segundos de prueba con 542 %, no obstante, su capacidad se reduce con el tiempo finalizando en 126 %. Mientras que el híbrido fue superior al colágeno, que, aunque muestra un porcentaje cercano al colágeno con 577 % a los 5 segundos de prueba, este alcanzó un pico de 810 % y finalizó en 524 %. Evidenciando que los perfiles de hinchazón de los andamios son diferentes.

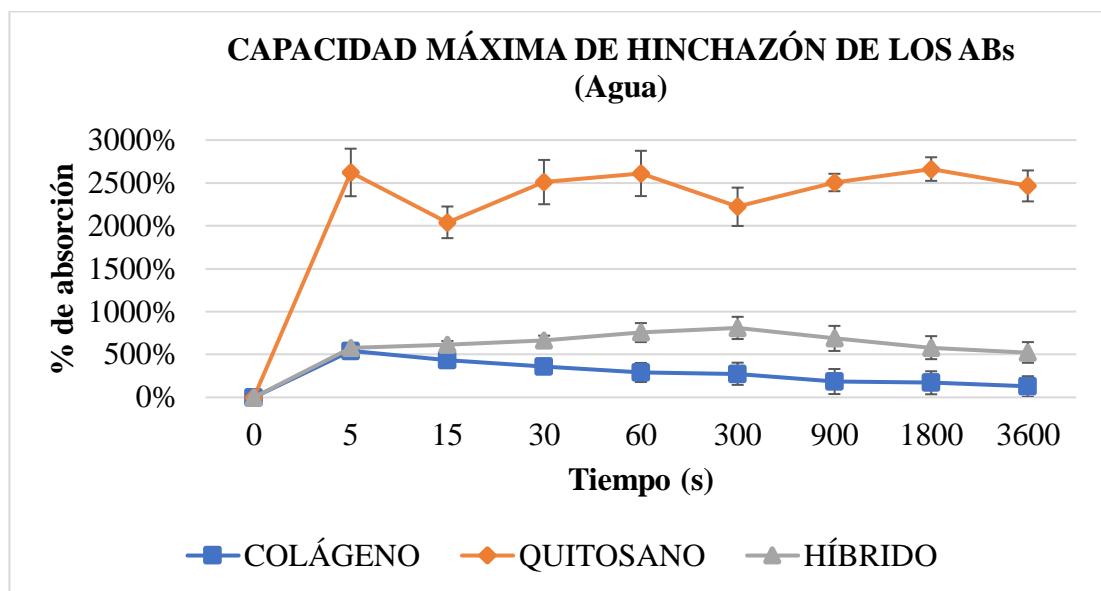


Figura 24. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (Agua).

La figura muestra los resultados obtenidos para la capacidad máxima de hinchazón de los ABs en agua, mostrando que el quitosano posee una mayor capacidad con un valor máximo de 2662%, mientras que los ABs de colágeno e híbrido muestran una reducción considerable alcanzando valores máximos de 542 % y 810 %.

La Figura 25 muestra una vez más que los andamios de quitosano presentan una mayor capacidad de hinchazón, con una absorción de 1084 % su peso en los primeros 5 segundos del experimento con un pico máximo de 1201 % y un porcentaje final de 1170 %. Los andamios de colágeno alcanzaron su pico máximo a los 5 segundos con un porcentaje de 366 y un valor final de 148 %. Por otra parte, los andamios híbridos tuvieron un aumento significativo llegando a porcentaje de 659 % respecto su peso inicial. No obstante, estos andamios no lograron completar el tiempo de prueba dado

que a los 900 segundos su manipulación fue imposible dado que mostró un proceso de degradación.

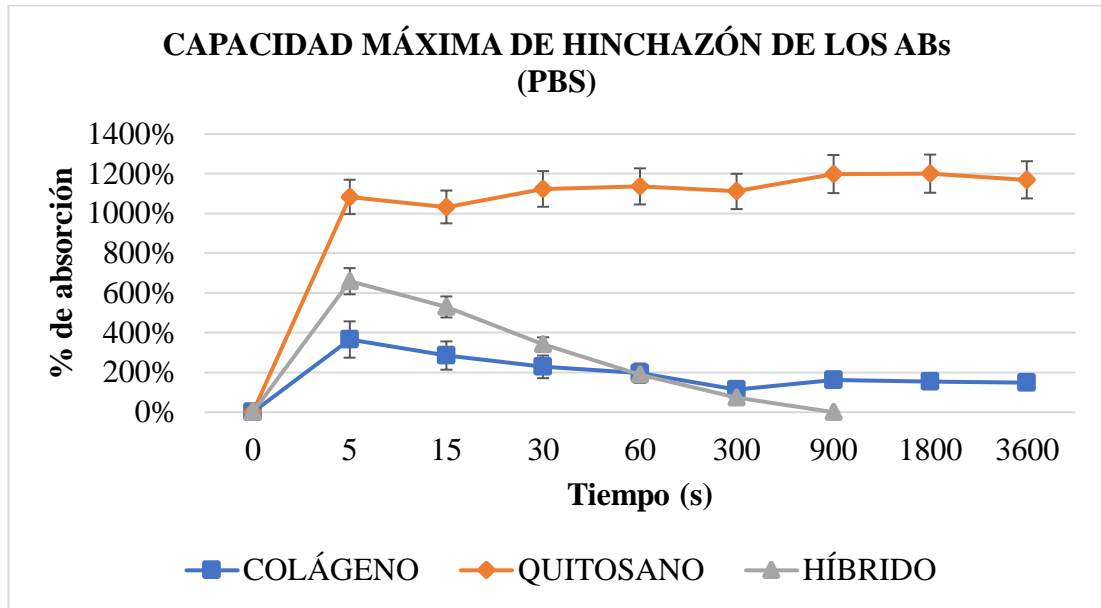


Figura 25. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (PBS).

La figura muestra nuevamente la prevalencia de los ABs de quitosano con un % de absorción, aunque en este caso, su capacidad es menor con un valor máximo de 1201 %, los ABs de colágeno, su valor máximo fue de 366 % y finalmente, los ABs híbridos no lograron finalizar la prueba debido a su degradación provocando que su manipulación sea imposible, no obstante, se consiguió un valor máximo de 659 %.

Por otra parte, la Figura 26. muestra la capacidad máxima de hinchazón en sangre. A diferencia de las pruebas mostradas. Los andamios muestran un perfil de hinchazón diferente, donde el colágeno presenta el mayor porcentaje de absorción con un pico de 601 % a los 5 segundos de prueba, sin embargo, muestra sus valores se reducen con el tiempo hasta un lapso de 300 segundos, donde el andamio fue imposible de manipular debido a su degradación. Los andamios de quitosano tuvieron una tendencia de crecimiento los primeros 60 segundos de prueba, teniendo un pico de 643 % y un valor final de 321%. El híbrido muestra una tendencia similar pero inferior al quitosano, donde a los 60 segundos se alcanzó el pico de absorción con 456 % y un valor final de 305 %. Denotando que el quitosano influye sobre el colágeno.

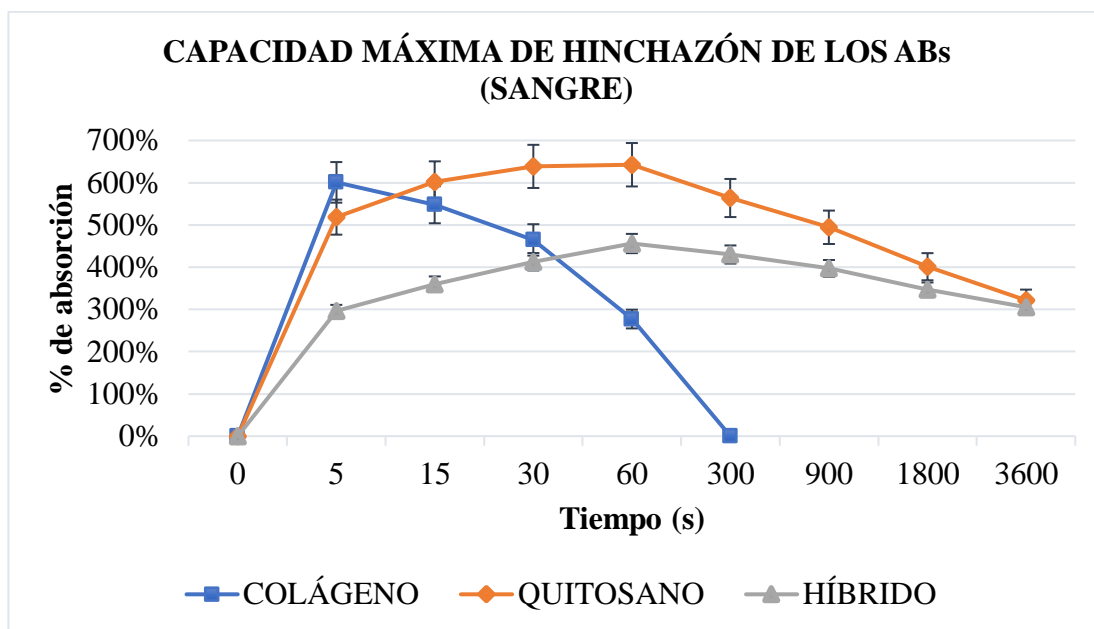


Figura 26. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (Sangre).

La figura evidencia un cambio claro en los perfiles de capacidad máxima de hinchazón, provocando que, en este caso, los ABs de colágeno sean imposibles de manipular a los 300 segundos de prueba. No obstante, aunque los ABs de quitosano muestre un mayor % de absorción un valor máximo de 643 %, se denota en al final de la prueba, este se asemeja al perfil de los ABs híbridos.

En base a lo mencionado, los andamios de quitosano muestran una mayor capacidad de hinchazón en todos los ambientes evaluados. Esto se debe a que el quitosano, al ser un polímero natural derivado de la quitina, presenta una composición química de unidades lineales de glucosamina que contienen grupos hidroxilo (-OH) y amino (-NH₂) lo que le confiere propiedades hidrófilas mediante la interacción con moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno, lo que se traduce en una mayor capacidad de absorción (Nokoorani et al., 2021; Patel et al., 2018). Esta característica se evidencia en la investigación realizada por Nokoorani et al., (2021), donde la capacidad máxima de hinchazón para andamios de quitosano fue de 1233 % en agua; adicionalmente, demostró que la variación de la concentración del polímero es un parámetro determinante, ya que una menor concentración del polímero conlleva una reducción en la ganancia de peso, alcanzando una capacidad de 1013 %. Por lo tanto, la variación en la concentración del polímero puede tener un impacto en este parámetro.

Cabe mencionar que, la capacidad máxima de hinchazón de este biopolímero será dependiente de porcentaje de desacetilación dado a que este influye a la cantidad de unidades de glucosamina, por lo que, considerando que el quitosano empleado presenta un porcentaje de desacetilación del 90 %, se estima que aproximadamente el 90 % de su peso total este formado de glucosamina. Por ende, los grupos hidroxilo y amino se encontrarán en mayor proporción influenciando en una mejor capacidad de absorción. En el caso de la evaluación en PBS, se obtuvieron resultados similares a los mostrados por Felfel et al., (2019) donde estable un rango entre 800 a 1200% cuando el andamio de quitosano fue sumergido en PBS.

Por otra parte, el grado de reticulación, tamaño e interconexión de poros y la presencia de grupos hidrófilo son factores determinantes en la capacidad de hinchazón de los andamios (Song et al., 2017). Según Amirrah et al., (2022) el colágeno puro presenta una capacidad de hinchazón aproximada del 650 % debido a la presencia de los grupos hidroxilo en los residuos de prolina e hidroxiprolina proporcionándole la capacidad de absorber y retener agua. No obstante, dicha capacidad dependerá de la fuente de colágeno, ya que, se ha reportado que para fuentes ovinas, bovinas y porcinas las capacidades de hinchazón fueron de 2500 %, 2750 % y 2700 %, respectivamente (Ghodbane & Dunn, 2016).

Un factor importante en la reducción de la capacidad de hinchazón se debe a que la prolina e hidroxiprolina comprende aproximadamente el 23 % del contenido de aminoácidos presentes en el colágeno, mientras que, la glicina es el aminoácido más abundante ocupando un tercio del total (Albaugh et al., 2017). Lo que sugiere que la capacidad de hinchazón de los andamios elaborados con este polímero será considerablemente inferior. Los resultados revelan una clara variación de la capacidad de hinchazón de estos andamios. Esto se puede observar en estudios previos, donde (Takallu et al., 2019) evaluó la capacidad máxima de hinchazón alcanzó del colágeno tipo I puro donde consiguió una ganancia de 650% respecto su peso inicial. En el caso de la evaluación en sangre sí se obtuvo un valor similar al reportado, esto debido a

que el colágeno al tratarse de la proteína principal del tejido conectivo muestra biocompatibilidad lo que lo hace mayormente susceptible a la interacción con factores de crecimiento y componentes sanguíneos como los factores de coagulación. Provocando que la capacidad de hinchazón reportada en la Figura 26. sea considerablemente mayor a los perfiles en agua y PBS. No obstante, debido a su susceptibilidad a la degradación enzimática (Kirillova et al., 2021) su manipulación fue imposible con el paso del tiempo.

La combinación de colágeno tipo I y quitosano crea una estructura química híbrida donde se combina las características de ambos polímeros. En cuanto a las interacciones moleculares, su combinación supone una mejora en las características hidrofílicas debido a la presencia de los grupos hidroxilo y amino, favoreciendo su estabilidad y capacidad de absorción. En la Figura 24, se observa que, aunque se tenga una mejora en la capacidad de hinchazón del andamio con respecto al colágeno, es evidentemente inferior a los andamios de quitosano. Como se mencionó anteriormente, la combinación de los biopolímeros afecta significativamente en las características del andamio, por lo que, en un estudio realizado por Shah et al., (2019) evaluó la capacidad máxima de hinchazón de una biopelícula constituido de la combinación colágeno/quitosano, obteniendo un pico máximo de 112 % su peso inicial, no obstante, reporta que debido al cambio en su composición química (grupos hidroxilo, carboxilo o aminos) provocó un aumento en la capacidad de absorción de agua provocando que este se disuelva fácilmente en la solución de PBS. Razón por la que, los híbridos fueron imposible de manipular a los 900 segundos de prueba. En el caso del perfil de capacidad de hinchazón en sangre se asemeja al perfil de los andamios de quitosano.

La capacidad máxima de hinchazón del andamio también es un parámetro determinante en el tipo de tejido que se desea regenerar, no obstante, la composición y ambiente en donde se localiza el tejido también influirá de manera significativa, ya que, en el caso de la regeneración de córnea lesionada, la presencia de sales provoca que el andamio sea mayormente susceptible a degradación (Shah et al., 2019).

Además, una capacidad de hinchazón elevada podría afectar de manera significativa el proceso de adhesión celular pues, las moléculas de agua pueden formar un obstáculo entre el andamio y el tejido, ya que, se enmascaran grupos funciones y por lo tanto se obstaculiza la adhesión (S. Chen et al., 2021).

Esta característica además será altamente dependiente al pH en medios acuosos, ya que influye en las interacciones electrostáticas y propiedades de ionización debido a la presencia de los grupos hidroxilo o amino provocando un cambio en su capacidad de retener agua y su capacidad de hinchazón (Lee et al., 2012). En condiciones de pH ácido, los grupos funcionales adquiere una carga positiva neta provocando que se repelan iones cargados positivamente como es el caso del agua, provocando una reducción en la capacidad de hinchazón. Mientras que, en pH básico, los grupos funciones son desprotonados generando una carga negativa neta, aumentando la capacidad de atraer y retener más agua (Felfel et al., 2019).

Aunque no hay un valor específico para la capacidad máxima de hinchamiento y su aplicación en diferentes tejidos, es importante tener en cuenta que está relacionada con el tamaño de los poros, la interconectividad y el volumen del andamio. Cuando ocurre el hinchamiento, se produce un aumento en el tamaño de los poros y la porosidad total, lo que maximiza el área interna del andamio. Durante el cultivo celular, un mayor grado de hinchamiento facilita la infiltración de las células y una mejor unión a la superficie del andamio. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este incremento en el hinchamiento puede reducir las propiedades mecánicas del andamio (Farshi et al., 2014).

3.1.2.2. Biodegradabilidad de los andamios biológicos

La biodegradabilidad de los andamios biológicos es una característica indispensable en la ingeniería de tejidos, actúan como plantillas temporales que simulan la matriz

extracelular, permitiendo la adhesión, proliferación y diferenciación celular para dar paso a un tejido biológicamente funcional (Guarino et al., 2014). El uso de andamios no biodegradables podría llegar a ser útil en ciertos casos de regeneración de tejidos, no obstante, su presencia a largo plazo podría provocar una reacción de cuerpo extraño, además se requería una segunda intervención quirúrgica para eliminar por completo el andamio, por dicha razón, se busca el uso de biopolímeros naturales o sintéticos biodegradables para la construcción de andamios biológicos (Madaghiele et al., 2014).

Con el fin de evaluar el porcentaje de degradación de los andamios, se consideró el uso de sangre completa observando así su biocompatibilidad y estabilidad en un entorno biológico relevante. El uso de esta sustancia biológica permite simular las condiciones *in vivo*, la sangre posee una gran cantidad de componentes como enzimas, factores de coagulación y células sanguíneas que interactúan con el andamio afectando su proceso de degradación. Permitiendo así obtener información sobre su comportamiento e integridad estructural y funcional durante un período de tiempo específico (Jimenez et al., 2022).

Los resultados obtenidos para la degradación de los diferentes tipos de andamios se muestran en la Figura 27. Los datos muestran que el proceso de degradación se tiene relación a la capacidad de hinchazón de los andamios evaluados en sangre, ya que, se observa que el proceso de biodegradación es mucho más rápido en el colágeno, debido que a los 5 días de incubación este fue completamente degradado. Mientras que para los andamios de quitosano e híbrido muestran degradación a los 6 y 7 días, respectivamente.

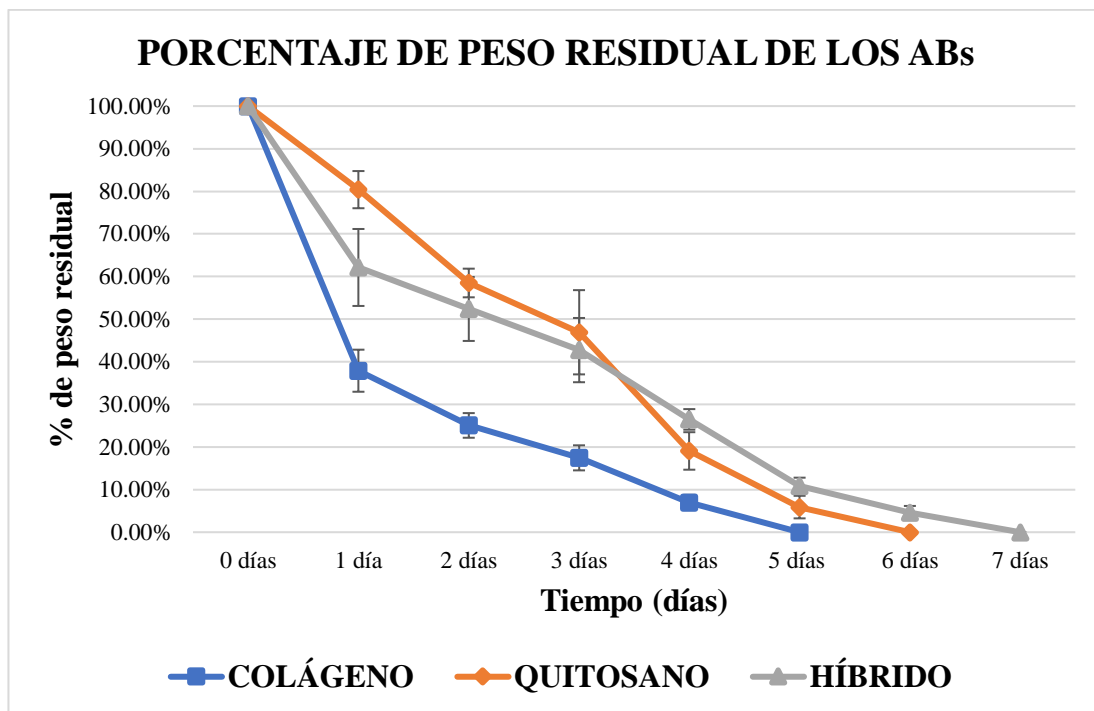


Figura 27. Porcentaje de peso residual de los ABs.

La figura muestra la pérdida de peso de los diferentes ABs respecto al tiempo, mostrando que todos tuvieron una degradación del 100 %, no obstante, se muestra que el colágeno es más susceptible a degradación enzimática (5 días), seguido de los ABs de quitosano (6 días) y nuevamente se muestra que la combinación de estos polímeros afecta las propiedades del andamio permitiendo que este se degrade a los 7 días.

Con el fin de realizar un contraste a la Figura 27 se graficó el porcentaje de biodegradación de los andamios biológicos, donde se evidencia el porcentaje de andamio reducido a lo largo de la prueba Figura 28.

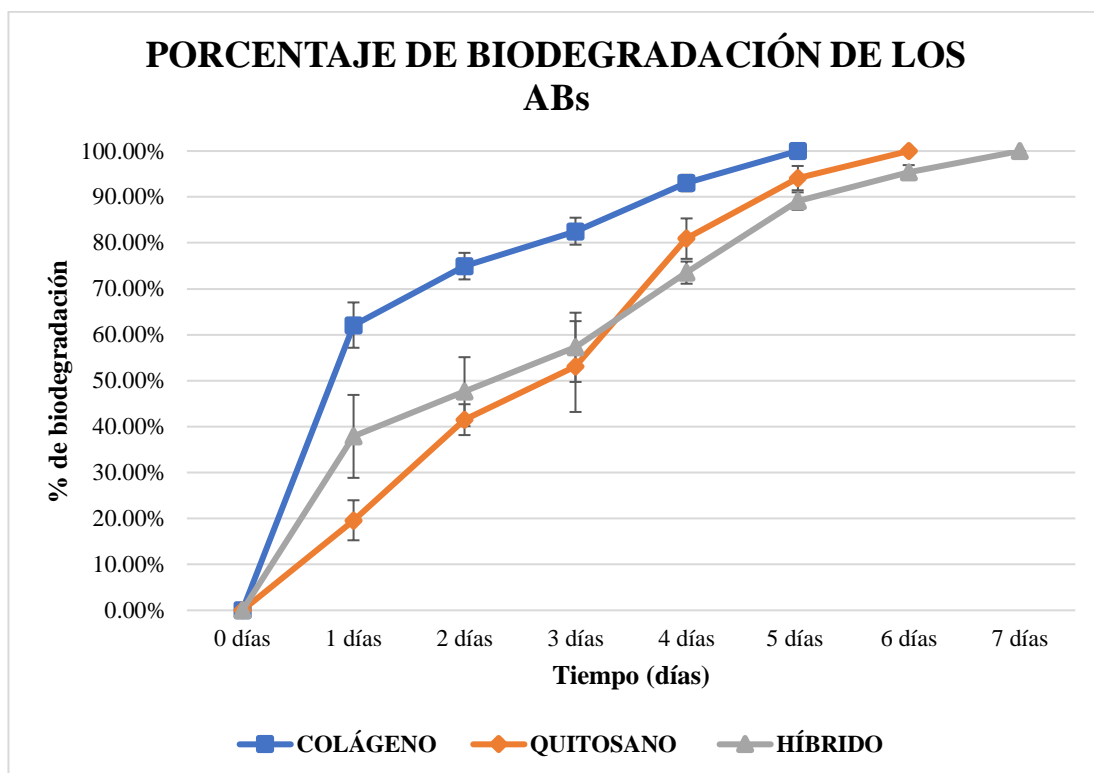


Figura 28. Porcentaje de biodegradación de los ABs.

La biodegradación de los andamios es evidente con el paso del tiempo, provocando que los ABs de colágeno tengan una degradación del 62.10 % en el primer día de prueba, mientras que, el colágeno 37.87 % e híbrido 19.61 %. El colágeno continuo su tendencia de degradación, no obstante, el porcentaje de degradación del quitosano pasa a ser mayor a los 4 días de prueba con 80.93 % y el híbrido es menor con 73.52 %, provocando que este se degrade más lento.

La biodegradabilidad en los andamios facilita que su reemplazo y remodelación gradual del tejido natural sin dejar algún tipo de residuo sólido en el cuerpo. Dicha característica se atribuye generalmente a la presencia de enlaces hidrolíticos o enzimáticamente sensibles. El colágeno es un biopolímero enzimáticamente sensible por medio de enzimas conocidas como metaloproteinasas de matriz (MMPs) (enzimas que tiene la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular), actúan mediante un proceso enzimática llamada proteólisis, donde las enzimas reconocen y se unen a las fibrillas de colágeno para generar fragmentos más pequeños. Algunas de las MMPs más relevantes son las collagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), enzimas con la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos presentes en el colágeno (Kirillova et al., 2021).

De la misma manera, el quitosano es enzimáticamente sensible, donde enzimas conocidas como lisozimas se encargarán de su degradación por medio de la hidrólisis enzimática de residuos acetilados. Estas enzimas son producidas por varias células como los neutrófilos, macrófagos, glándulas exocrinas y tejidos epiteliales, esto se debe a que actúan en la defensa del organismo frente a infecciones bacterianas, encontrándose en fluidos biológicos como la leche materna, saliva, lágrimas y secreciones nasales. No obstante, tanto las metaloproteinasas de matriz y las lisozimas se encuentran dispuestas en la sangre, razón por la cual, se empleó este fluido en la evaluación de la biodegradabilidad de los polímeros seleccionados (Kim et al., 2018).

De acuerdo con lo expuesto, se evidencia que el andamio de colágeno presenta una biodegradación enzimática mucha más rápida debido a la presencia de metaloproteinasa de matriz, específicamente colagenasas encargadas de degradar los enlaces peptídicos del colágeno y, por ende, provocar que este se degrade rápidamente. En el caso de los andamios de quitosano e híbrido la velocidad de biodegradación fue menor. El quitosano al ser enzimáticamente biodegradable por las lisozimas, estas poseen una actividad limitada, ya que, la acción principal de estas enzimas es ejercer actividad antimicrobiana. Por lo que, se la considera complementaria en la degradación del quitosano, especialmente cuando el grado de desacetilación es elevado asemejándose así a la quitina. Razón por la que, la degradación del quitosano es más lenta.

Según Nazir et al., (2021) el comportamiento de degradación *in vitro* de los andamios biológicos se realiza generalmente en tampón fosfato (PBS, pH 7.4) a 37 °C con o sin presencia de enzimas. En dicho artículo, se evaluó la degradación de colágeno tipo I empleando PBS sin y con enzimas, obteniendo que, en condiciones no enzimáticas, el colágeno tubo una degradación del 80 % a los 7 días de evaluación, mientras que la degradación total se produjo a los 14 días de evaluación. Bajo condiciones enzimáticas la degradación total se produjo en un lapso de 10 h.

En base a lo mencionado, la presencia de enzimas proteolíticas en sangre juega un papel fundamental en el proceso de degradación del andamio, las cuales serán secretadas por los macrófagos, células que permanecerán en la interfaz del andamio hasta que concluya el proceso de degradación, en los polímeros naturales muestra un perfil de degradación rápida de aproximadamente 7 – 10 días (Joshi et al., 2020). Mientras que, en el caso de polímeros sintéticos, la tasa de degradación es relativamente lenta, alcanzando una degradación de 12 – 24 meses (Kawase et al., 2015).

Como se mencionó el quitosano es un biopolímero que se biodegrada enzimáticamente por la presencia de lisozimas por medio de la hidrólisis de residuos acetilados, por lo que, a nivel *in vivo* el quitosano se reabsorbe por completo, no obstante, se requiere caracterizar el comportamiento de degradación para su uso en la IT debido a que se requiere una degradación de este para una posterior regeneración tisular (Park et al., 2013) . En un estudio realizado por (Si et al., 2019) determinó que la degradación hidrolítica en PBS sin enzimas es inferior en andamios de colágeno, quitosano y colágeno/quitosano, ya que, en el caso de colágeno, se obtuvo una reducción del 80 % pasado transcurrido 15 días de prueba, mientras que para quitosano e híbrido el porcentaje de degradación estuvo cerca del 50 %. No obstante, en el mismo estudio se evidenció que el aumento en la concentración de quitosano (70 – 90 %) en híbridos provoca una degradación aún más lenta, alcanzado un porcentaje de degradación de menos del 10 % en el mismo período.

3.1.2.3. Evaluación coagulación de sangre entera *in vitro*

El proceso de la regeneración de un tejido producto de una herida es complejo, dividiéndolo en fases predecibles, coagulación sanguínea (hemostasia), inflamación, crecimiento del tejido (proliferación) y remodelación (maduración). La formación del coagulo es un proceso biológico en respuesta a una herida o lesión producida en los vasos sanguíneos, el cual está ligado a la activación de plaquetas y culmina en la

formación de este, teniendo el objetivo de detener el sangrado y promover la cicatrización, no obstante, su formación excesiva o incontrolada podría inducir la formación de trombos (Sutar et al., 2021).

Para evaluar el índice de coagulación se empleó sangre completa y el tiempo de coagulación para todas las muestras se estandarizó en 10 minutos según lo reportado (Gu et al., 2013, Rahmany et al., 2013). Después, se midió el contenido de hemoglobina mediante espectrofotometría a 540 nm, donde un valor de absorbancia mayor indicó un proceso de coagulación más lento y, por ende, una mayor presencia de glóbulos rojos libres o adheridos.

La Figura 29 indica que el BCI para los andamios de colágeno son superiores, con un valor de 95.04 %, los de quitosano con 67.23 % y finalmente, los híbridos con 52.54 %. En base a lo mencionado, los ABs de colágeno presentan un proceso de coagulación más lento en comparación a los ABs de quitosano e híbrido. Este parámetro se contrasta con los resultados obtenidos en la prueba de adhesión de glóbulos rojos, donde se reportó que los ABs de colágeno presentan una mayor concentración de glóbulos rojos, mientras que para los otros tipos de ABs, la concentración fue menor, indicando que los glóbulos rojos no se encontraban adheridos, si no que estos habían formado un coagulo.

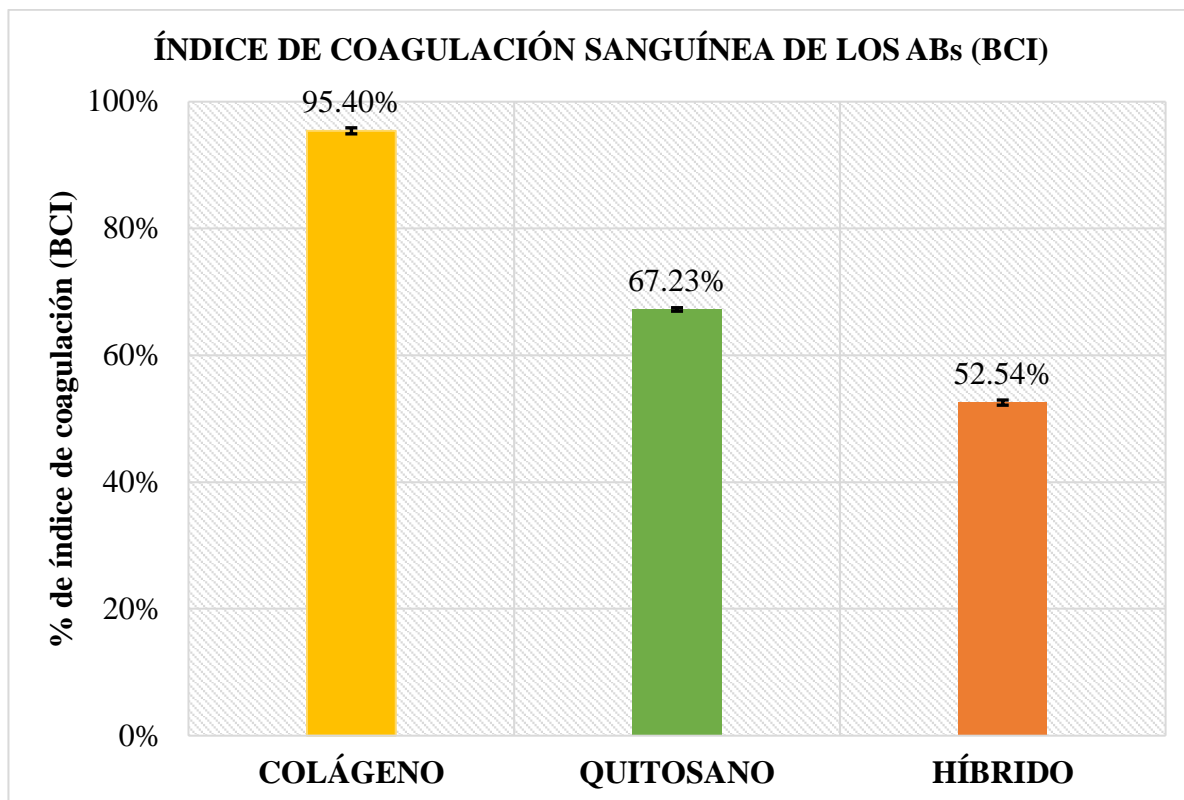


Figura 29. Resultados evaluación coagulación de sangre entera *in vitro*.

La gráfica muestra el BCI obtenido para cada uno de los andamios, en el caso de los ABs de colágeno tienen un BCI de 95.40% con una desviación estándar de 0.005, los ABs de quitosano tienen un BCI de 67.27% con una desviación estándar de 0.003 y los ABs híbridos tienen un BCI de 52.54% con una desviación estándar de 0.004.

3.1.2.4. Evaluación hemólisis *in vitro*

La evaluación de hemólisis *in vitro* determina la cantidad de hemoglobina liberada debido al rompimiento de las membranas de los eritrocitos o glóbulos rojos al entrar en contacto con un material extraño, por lo que, una mayor cantidad de eritrocitos rotos implica un mayor porcentaje de hemólisis (Weber et al., 2018).

Para realizar dicha evaluación se utilizó una prueba colorimétrica fotométrica mediante el reactivo de Drabkin, el cual emplea una combinación de dos compuestos: ferrocianuro de potasio (III), encargado de oxidar la hemoglobina liberada por los

eritrocitos formando metahemoglobina, y cianuro de potasio, el cual se une a la metahemoglobina formando cianmetahemoglobina (forma oxidada estable de la hemoglobina) que es directamente proporcional a la concentración de glóbulos rojos en sangre (Totea et al., 2014).

Este parámetro se encuentra regulado por las normas ISO 10993-4 y ASTM F 756-00 donde se indica que el grado de hemólisis para los biomateriales exógenos usados en procedimientos médicos deben ser igual o menor al 5 %, considerándose así de bajo riesgo biológico (Haghjooy et al., 2016; Jimenez et al., 2022). Las normas establecen rangos específicos para estos valores, indicando que un valor superior al 5% se considera al biomaterial como hemolítico, entre 5 y 2 % como ligeramente hemolítico y menos del 2 % como no hemolítico.

En la Figura 30 se muestra la comparación de los porcentajes de hemólisis obtenidos para cada uno de los andamos. El grado de hemólisis para el colágeno muestra un valor de 2.90 %, los de quitosano 1.90 % y los híbridos 0.37 %. En base a los resultados, los andamios biológicos de colágeno se clasifican como ligeramente hemolítico (valor entre 5 y 2 %); y como no hemolítico para quitosano e híbridos (valor inferior al 2%).

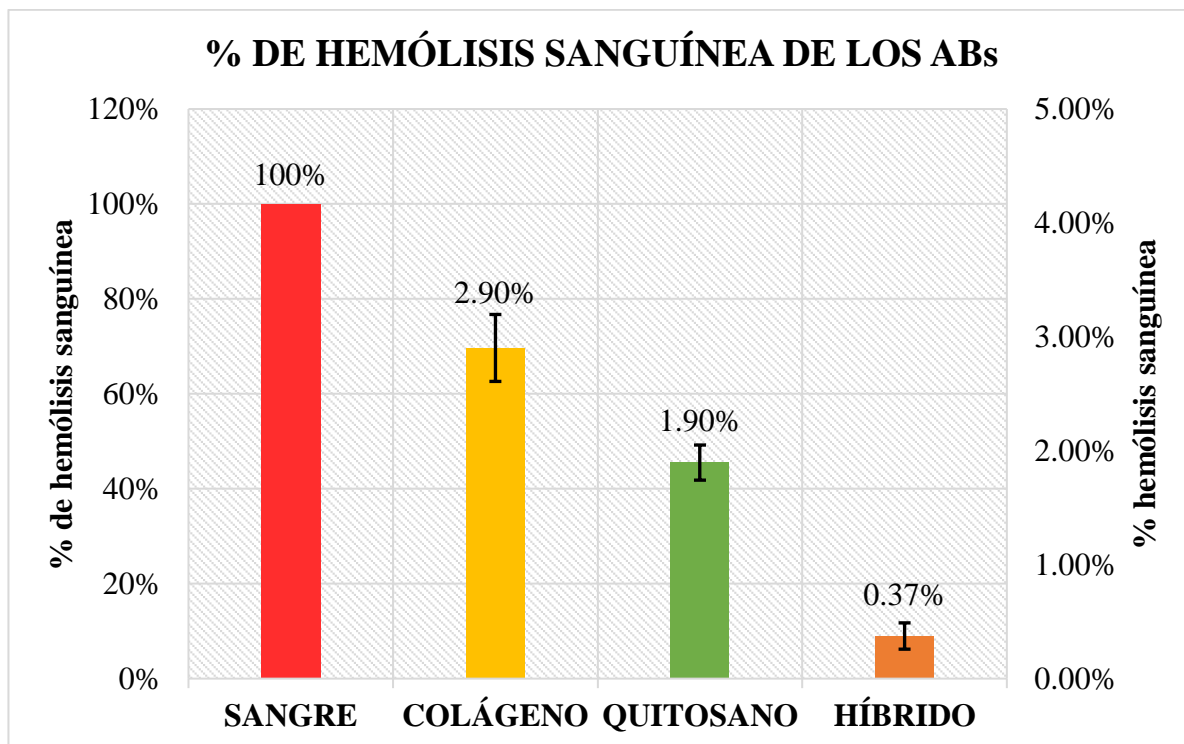


Figura 30. Capacidad hemolítica (%) de los andamios biológicos *in vitro*.

La gráfica expone el porcentaje de hemólisis sanguínea obtenida para cada uno de los ABs, los de colágeno tienen un valor de hemólisis de 2.90 % con una desviación estándar de 0.003, los de quitosano 1.90 % con una desviación estándar de 0.002 y los híbridos 0.37 % con una desviación estándar de 0.001.

La evaluación del porcentaje de hemólisis es un parámetro que indica la liberación de hemoglobina debido al estrés osmótico producto del contacto con un material extraño, considerando como una medida del grado de citotoxicidad del biomaterial. El daño de estas células sanguíneas puede traer consigo varios efectos como una reducción en el transporte de oxígeno a órganos y tejidos (*in vivo*), puede inducir toxicidad, alteración de las funciones renales, e incluso la formación de trombos en un factor tisular (Weber et al., 2018).

El rompimiento de los glóbulos rojos genera la liberación de una molécula de señalización llamada difosfato de adenosina (ADP, por sus siglas en inglés), juega un factor importante en las respuesta fisiológica y bioquímica en diferentes tipos de

células, especialmente en células sanguíneas y del sistema inmunológico. Dentro de los efectos provocados por la liberación de ADP se tiene: activación y agregación plaquetaria, inflamación, perturbación en las cascadas de coagulación e incluso trombosis alterando el ciclo de cicatrización (León, 2021).

Por lo que, los andamios biológicos usados en la regeneración de lesiones dérmicas deben cumplir con el porcentaje de hemólisis permisible, asegurando así que este no causará daño a los glóbulos rojos circulantes al momento de realizar el trasplante y, por ende, no influir en la activación de vías de coagulación (Jaganathan et al., 2016).

En un estudio realizado por Guo et al., (2018), demostró que el uso de oligosacáridos de quitosano (COS, por sus siglas en inglés) presentan una mejor hemocompatibilidad dado que el porcentaje de hemólisis para el andamio fue de 1.42 % considerando una concentración de 1 mg polímero /mL, mientras que una concentración de 0.1 mg/mL se obtuvo un valor de 0.30 %. Por lo que, la variación en la concentración de los polímeros en la elaboración de los andamios es nuevamente un factor determinante.

3.1.2.5. Evaluación de adhesión glóbulos rojos *in vitro*

La adhesión de los glóbulos rojos cumple múltiples funciones cruciales en los andamios biológicos, que abarcan la vascularización, el transporte de nutrientes, la estabilidad y el soporte de los andamios, así como la señalización celular. La vascularización y el transporte de nutrientes están estrechamente vinculados, ya que el suministro de oxígeno y nutrientes a través del flujo sanguíneo facilita el crecimiento celular en los andamios, lo que promueve la proliferación y la función celular (Rademakers et al., 2019).

Además, la adhesión de los glóbulos rojos confiere estabilidad y soporte al andamio al formar coágulos que lo fijan y eviten su desplazamiento. Esta interacción con la matriz mejora las propiedades mecánicas del andamio y promueve la formación de tejido. Por último, la adhesión de los glóbulos rojos actúa como un mecanismo de señalización, ya que los eritrocitos contienen moléculas bioactivas y factores de señalización que desencadenan diversas respuestas celulares y promueven la regeneración tisular (Zheng et al., 2021). Cuando estos factores son liberados por los eritrocitos, tienen un impacto directo en la respuesta celular y la regeneración de tejidos (S. Chen et al., 2021).

No obstante, la cantidad ideal de glóbulos rojos que se deben adherir a los andamios biológicos dependerá del contexto y tipo objetivo. En varios casos, la adhesión de los glóbulos rojos se lo considera importante como parte del proceso de vascularización, por lo que, una alta cantidad es recomendable facilitando así la formación de vasos sanguíneos. Mientras que, en andamios destinados a aplicaciones de desarrollo de tejidos, la adhesión de glóbulos rojos se lo considera como mínima o incluso no deseada, dado que se busca generar un entorno de cultivo más controlado y específico para las células, como es el caso de células madre o células especializadas (Guizouarn & Barshtein, 2020).

Para determinar la adhesión de glóbulos rojos en el andamio, se utilizó un Kit de cuantificación de hemoglobina. Para lo cual se sumergieron los andamios en sangre completa con citrato para posteriormente retirarlos y liberar las células sanguíneas de los andamios mediante su lisis utilizando agua desionizada (solución hipotónica), siendo que la liberación de hemoglobina provocado por la lisis será proporcional a la cantidad de glóbulos rojos adheridos al andamio.

En la Figura 31 se muestra la concentración de hemoglobina obtenida para cada uno de los andamios. Al comparar los resultados con la muestra control (sangre completa)

se evidencia que el colágeno tiene un total de 3447.15 mg de eritrocitos/dL de sangre, es decir, equivale a $\approx 20\%$ de los eritrocitos presentes en la muestra de sangre, mientras que, los ABs de quitosano e híbrido presentan un total 1422.23 y 1277.43 mg de eritrocitos/dL de sangre, que equivale a $\approx 8.25\%$ y $\approx 7.41\%$, respectivamente.

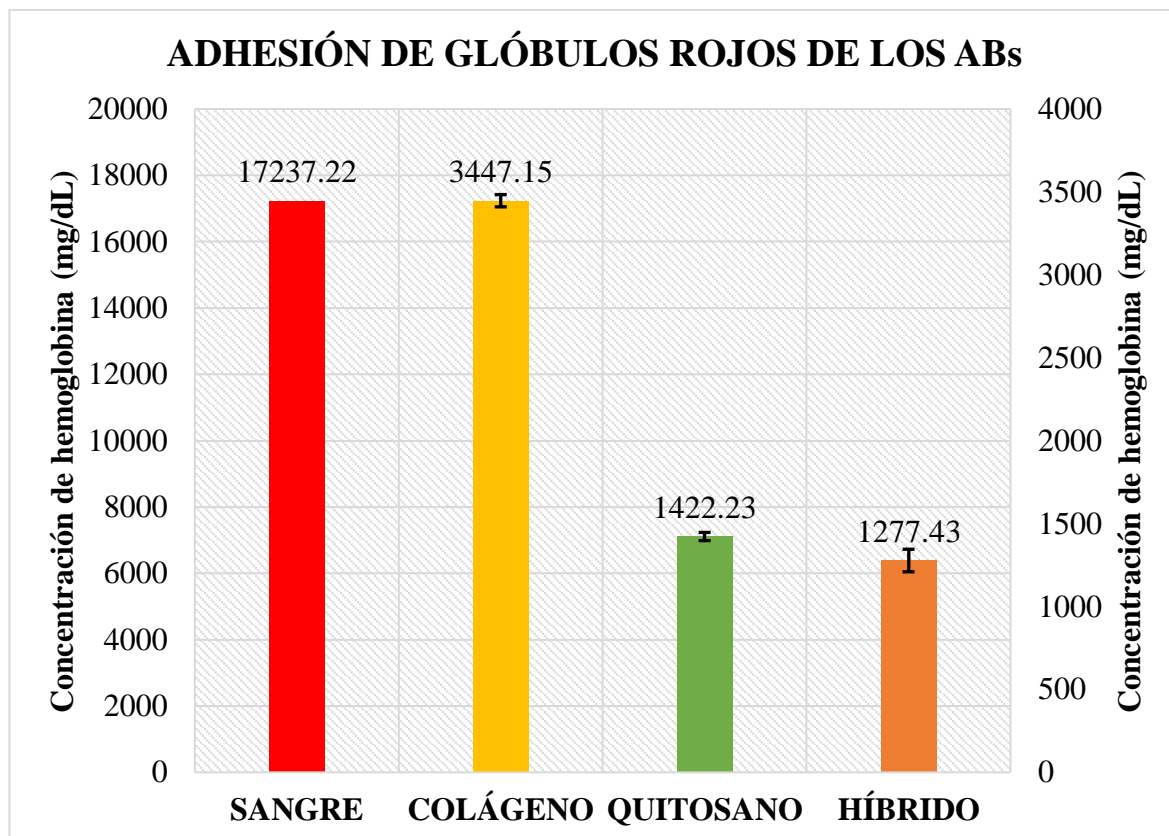


Figura 31. Resultados evaluación de adhesión glóbulos rojos *in vitro*.

Se muestra la concentración de glóbulos rojos adheridos a los diferentes ABs. Se evidencia la concentración normal en una muestra de sangre total siendo de 17237.22 mg/dL, mientras que, en los andamios de colágeno es de 3447.15 mg/dL con una desviación estándar de 36.99, los de quitosano 1422.23 mg/dL con una desviación estándar de 24.64 y los híbridos 1277.23 mg/dL con una desviación estándar de 67.91.

La capacidad de adhesión de glóbulos rojos sobre los andamios biológicos dependerá de factores como la composición química, morfología de la superficie, propiedades de carga y la presencia de señales bioactivas. El colágeno y quitosano son biomateriales que con un alto índice de biocompatibilidad e interacción celular; el colágeno presenta una estructura tridimensional y secuencias específicas de aminoácidos que podrían

interactuar mayormente con diferentes receptores celular, tales como los glóbulos rojos. Mientras que el quitosano puede promover la adhesión celular debido a su carga opuesta al de los glóbulos rojos (carga negativa en su superficie) provocando una interacción electrostática. No obstante, la capacidad de adhesión de glóbulos rojos dependerá de la topografía de la superficie del andamio. Dado que afecta directamente a la interacción célula – andamio, por lo que, mientras mayor sea el área de contacto entre las células y andamios, mayor adhesión de glóbulos rojos será evidente (Talebi, Labbaf, Atari, & Parhizkar, 2021).

Por tal razón, se observa que los ABs de colágeno presentaron una mayor adhesión de glóbulos rojos debido al porcentaje de porosidad e índice de hemólisis *in vitro*, mientras que, los ABs de quitosano e híbridos tiene un porcentaje de porosidad inferior y sus índices de hemólisis los catalogan como no hemolíticos, por lo que es evidente la reducción en la capacidad de adhesión de glóbulos rojos.

3.1.2.6. Evaluación plaquetaria *in vitro*

Las plaquetas dentro del proceso de la hemostasia son de suma importancia, debido a que se requiere que estén activas para que permitan el funcionamiento de los factores de coagulación, de forma que, si un vaso sanguíneo se encuentra dañado, las plaquetas tienen la capacidad de interactuar con las células vasculares, el sistema de coagulación y los componentes de la ECM (Versteeg et al., 2013). En esta etapa, el nivel de adhesión plaquetaria hacia el endotelio afectado aumenta y mediante una cadena de señalización se da el reclutamiento y activación de más plaquetas que promueven la formación de una superficie procoagulante y da origen a un tapón sanguíneo rico en fibrina. Las plaquetas activadas liberan gránulos δ en los que se encuentra contenido histamina, calcio, polifosfatos, serotonina y glutamato que son vitales para el proceso hemostático (Li et al., 2010).

Ante esto, todo biomaterial que va a ser sometido a trasplante debe poseer una buena capacidad de adhesión plaquetaria a la superficie de forma que la concentración de plaquetas sea adecuada en el área de la herida y así facilitar la hemostasia. Se evaluó la adhesión plaquetaria de los tres tipos de andamios mediante el porcentaje de liberación de LDH que representa directamente la cantidad de plaquetas que se encuentra en cada muestra, aunque es un método indirecto. Teniendo valores de 84.24%, 71.20% y 77.70% para los andamios de colágeno, quitosano e híbrido, respectivamente. Donde se puede evidenciar que los andamios de colágeno presentan una mejor capacidad de adhesión de plaquetas con respecto a los otros tipos de andamio, como se observa en la Figura 32.

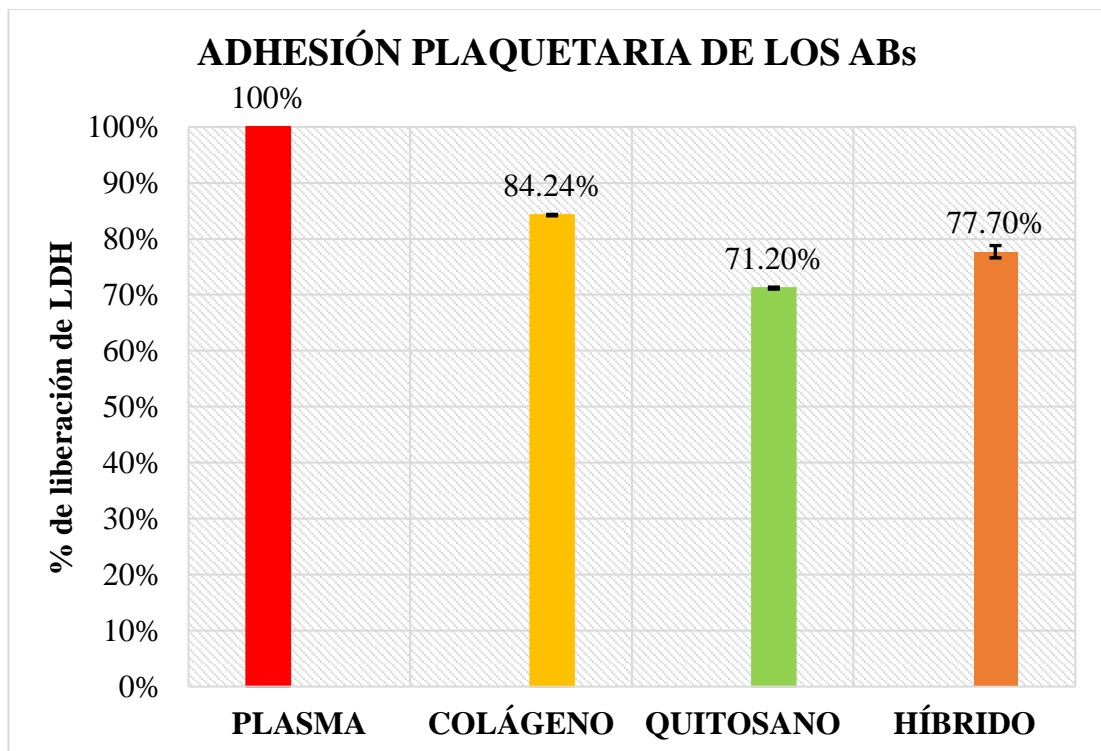


Figura 32. Resultados evaluación de adhesión plaquetaria *in vitro*.

La figura muestra el porcentaje de adhesión de plaquetas a los diferentes ABs. Se muestra que la adhesión es mayor para los andamios de colágeno con un valor de 84.24 % con una desviación estándar de 0.0013, le siguen los híbridos con 77.70 % con una desviación estándar de 0.0018 y andamios de quitosano con 71.20 % con una desviación estándar de 0.011.

La liberación de LDH en la ingeniería de tejidos se considera como un parámetro que da a conocer el daño celular, siendo un indicador de toxicidad o incompatibilidad de

los andamios con las células, ya que la enzima LDH se libera de las células al medio únicamente cuando se ha generado lisis o daño (Cox et al., 2021). Sin embargo, en este caso para determinar la capacidad de adhesión plaquetaria, es posible debido a que mediante la adición de surfactantes como el Tritón X-100 se lisan todas las plaquetas que se encuentran adheridas a los diferentes tipos de andamios y la muestra permite cuantificar la cantidad de plaquetas que se encontraban en la superficie, más no un daño celular.

Es así como de acuerdo con los resultados, se denota que no existe una diferencia considerable entre los tipos de andamio y la capacidad de adhesión. Estos resultados se deben a que los biopolímeros con buenos niveles de biocompatibilidad y degradabilidad son los preferidos por las células sanguíneas al no generar respuestas inflamatorias ni rechazo inmunológico, siendo comúnmente empleados hidrogeles y andamios de colágeno y quitosano (Tang et al., 2019). La superficie es otro factor importante, para generar la interacción célula-andamio, además de que se pueden adicionar ligandos para que los receptores de plaquetas como el fibrinógeno o fibronectina los reconozcan y faciliten la adhesión, esto gracias a las propiedades bioactivas, reduciendo el estrés celular (Versteeg et al., 2013). La porosidad también es vital en esto, una estructura porosa proporciona una mayor cantidad de sitios de anclaje para que se dé la colonización de las plaquetas, además de permitir la difusión de nutrientes y oxígeno, manteniendo activas a las plaquetas (Koupenova et al., 2018). Además, se recomienda la adición de factores de crecimiento, que estimulen la diferenciación de las plaquetas, mejorando su funcionalidad en la regeneración tisular.

3.1.3. Comparación de dos métodos de esterilización para andamios biológicos

La esterilización en la IT es un proceso vital, previo a la fase de cultivo celular y pruebas *in vivo*, debido a que permite que los andamios queden libres de contaminación por microorganismos como bacterias, levaduras y virus (Dai, Ronholm, Tian, Sethi, & Cao, 2016b). Cuando se trata de andamios con buenos niveles de biodegradabilidad, se debe elegir con cuidado la técnica de esterilización, debido a que

se puede afectar gravemente las propiedades estructurales y químicas. Por ello existen técnicas ampliamente utilizadas para este tipo de andamios como son el uso de desinfectantes (etanol, óxido de etileno) y la radiación (gama, haz de electrones y ultravioleta); no obstante, el uso de desinfectantes se considera más como técnicas de desinfección (Griffin et al., 2018b). En este caso, las técnicas aplicadas para la esterilización de los andamios biológicos de colágeno, quitosano e híbrido fueron la radiación UV y etanol, este último se probó a concentraciones del 65 y 70%. De tal forma, para evaluar las técnicas de esterilización se realizó la inoculación de los andamios biológicos previamente esterilizados en Medio Agar Sangre. El Medio Agar Sangres es un agar altamente nutritivo, utilizado para el cultivo de organismos exigentes y como identificador de bacterias hemolíticas, no obstante, a diferencia de agares como el TSA o SDA, el medio seleccionado aporta un ambiente apropiado para el crecimiento de organismos relacionados con humanos (Sandle, 2019) como *S. aureus* dado que es el principal patógeno relacionado con infecciones de la piel (Giudice, 2020).

De acuerdo con los resultados obtenidos como se observa en la Figura 33, no existe contaminación de ningún tipo para ambas técnicas de esterilización, de tal forma que los tratamientos realizados fueron efectivos para los andamios. En el caso de la esterilización por UV, los andamios fueron introducidos por un tiempo de 30 min a una longitud de onda de 260 nm, obteniendo buenos resultados. La irradiación UV se considera que posee un nivel de inactivación medio, mayormente efectivo para bacterias y virus envueltos, con un tiempo de contacto recomendado de 2 h (Dai, Ronholm, Tian, Sethi, & Cao, 2016c). Otro factor para considerar en esta técnica es la longitud de onda específica, que debe encontrarse entre 200 y 280 nm, aunque se ha determinado que una longitud de 260 nm es la más letal para todo tipo de microorganismos (Gerchman et al., 2019).

Es así como la irradiación UV se considera uno de los métodos más utilizados debido a que es una técnica rápida, de bajo costo y no genera residuos tóxicos, pero también

presenta desventajas debido a que afecta considerablemente las propiedades estructurales y bioquímicas, mayormente en los andamios formados por biopolímeros naturales (Walker et al., 2018). Mientras mayor tiempo de exposición tengan los andamios el nivel de afección también será mayor. Por ejemplo, (Pérez Davila, González Rodríguez, Chiussi, Serra, & González, 2021) reporta que para andamios de ácido poliláctico (PLA) se requirió de 12 h, sin embargo, se evidenció disminución del peso molecular y una tasa de degradación elevada. Mientras que (Braghirolli et al., 2014) reporta que para andamios de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) se probaron tiempos de 30 min hasta 2 horas, obteniendo resultados positivos desde el tiempo mínimo de 30 min, sin embargo, se observó cambios morfológicos, degradación acelerada y un aumento en la resistencia a la tracción.

En el caso de los andamios basados en biomateriales basados en proteínas y carbohidratos como son el colágeno y quitosano, respectivamente es necesario producir un entrecruzamiento para mejorar la estabilidad y resistencia mecánica. Usando la irradiación UV como método para entrecruzar y además como tratamiento de esterilización (Adamiak & Sionkowska, 2022). En el caso del colágeno, puede generar uniones entre la tirosina y fenilalanina, de esta forma se pueden obtener enlaces en el interior de las cadenas polipeptídicas (Sionkowska et al., 2015). Por otro lado, como método de esterilización no es muy recomendable ya que el colágeno posee niveles de degradación altos y la irradiación UV lo acelera mediante un proceso de fotodegradación, por lo que difícilmente se puede tener un control específico sobre el grado de transformación (Dai et al., 2016). Para el caso del quitosano, la irradiación UV destruye su matriz debido a la alta energía de la radiación y el proceso de fotodegradación se produce de manera inicial en la superficie, por lo que no es tan evidente la afección causada (Kiechel & Schauer, 2013).

Esto se refleja en los resultados obtenidos en la Figura 33 J, K, L donde se observó una degradación en los andamios de colágeno, quitosano e híbrido luego del proceso de irradiación UV, sin embargo, no se determinó el nivel de afección causado en las

propiedades como porosidad y superficie. En el caso del colágeno, la degradación se pudo notar visualmente, mientras que para el quitosano no se lo pudo hacer de la misma forma, esto debido a que se requiere de tiempos prolongados de exposición (2 horas en adelante) para que los enlaces covalentes del quitosano se rompan y los cambios sean evidentes (Dai et al., 2016); lo que sí se puede denotar es un cambio en la coloración a una tonalidad amarillenta debido a la fácil pigmentación por el color de la luz. En una investigación se determinó el nivel de influencia de la irradiación UV sobre los andamios de colágeno teniendo resultados similares, donde se evaluó por un rango de tiempo de 0,5 a 8 h y se comprobó que la exposición UV modifica las propiedades superficiales como es la rugosidad, en el caso de las propiedades mecánicas como la resistencia a la tracción, las muestras luego de 0,5 y 1 h de exposición fueron demasiados frágiles y se produjo desintegración de las mismas, esto debido a que produce pérdida de agua (Adamiak & Sionkowska, 2022).

Estas diferencias de acuerdo con la literatura para obtener resultados positivos de irradiación UV da paso a sugerir que las condiciones varían dependiendo el tipo de andamio, por lo cual se debe tomar precauciones previo a su implementación. No obstante, en un estudio reciente se determinó que para fibras electrohiladas, aplicar esterilización UV es beneficiosa ya que altera la química de la superficie mientras mantiene la morfología, de esta forma se produce una amplia gama de grupos radicales que benefician no solo el anclaje de las señales químicas para la adhesión y proliferación celular, sino también, atenúa las limitaciones como la solubilidad en agua y garantiza una red polimérica insoluble final (Evrova et al., 2019).

La otra técnica de esterilización es por etanol que se encuentra dentro de los métodos químicos, para esto los andamios fueron introducidos en etanol a concentraciones del 65 y 70% durante 5 minutos y lavados posteriormente con PBS por 5 veces, que mediante el ensayo microbiológico se evidenció su esterilidad, al no observarse ningún tipo de contaminación. Se considera que la esterilización por etanol tiene un nivel de inactivación medio que actúa sobre micobacterias, bacterias vegetativas, virus

envueltos y hongos, donde las concentraciones recomendadas son de 60 a 80% únicamente por minutos (Dai et al., 2016). Se pueden producir variaciones que van a depender del método de elaboración de los andamios, esto debido a que el mecanismo de desinfección consiste en remojar el andamio (superficie e interior) de tal forma que se desnaturalizan las proteínas y ataca el sistema enzimático de los microorganismos (Shearer et al., 2006). La ventaja que presenta sobre los otros métodos es que daña menos la estructura de los andamios, sin embargo, al no ser efectivo para las esporas bacterianas se considera como una técnica de desinfección y no de esterilización (Łopianiak & Butruk-Raszeja, 2020).

Pese a que esta técnica se considera que no posee efectividad, debido a los cambios que produce en los andamios, se utiliza con mayor frecuencia por su fácil aplicación que no requiere de uso de equipos, es de bajo costo y no genera ningún tipo de residuo; si bien inactiva un sin número de microorganismos, los virus hidrofílicos y las esporas bacterianas presentan resistencia, por lo que la capacidad limitada de acción sigue siendo una preocupación importante (Dai et al., 2016). Según Marreco et al., (2004) en su investigación demuestra que el etanol al 70% durante 5 minutos fue efectivo para la esterilización de membranas de quitosano, sin embargo, generó un aumento en la resistencia a la tracción. Por otro lado, (Selim et al., 2011) mostró que, bajo las mismas condiciones, andamios elaborados de PLGA solo permanecieron estériles por 2 días, pasado dicho tiempo se contaminaron, además que se disminuyó la resistencia y la morfología cambió considerablemente. En otra investigación para andamios de PLGA, se demostró que es necesario un tiempo de 0,5 h para la obtención de andamios estériles, no obstante, demasiado tiempo en contacto generó alteraciones morfológicas que impidieron la adhesión y proliferación celular (Braghirolli et al., 2014).

Para el caso de andamios elaborados con colágeno, la afección radica en la degradación de las proteínas, por lo que la disminución en el contenido de colágeno es significativa dando una apariencia transparente, esto se puede observar claramente en la Figura 33 D, G en donde los andamios tomaron una tonalidad blanquecina y transparente. Con

respecto a los andamios de quitosano, el daño estructural que se produce es menor debido a que no se genera ningún tipo de degradación, pero si provoca una reducción significativa en la porosidad, por lo que etapas como la del cultivo celular pueden verse afectadas. En las Figuras 33 E, F, H, I se pueden observar que los andamios no han sufrido ningún tipo de modificación y mantienen características similares a las de los controles. Cuando se realiza esterilización con etanol, se recomiendan lavados con PBS con el objetivo de remover residuos de la solución de etanol y que esta no genere reacciones o resultados alterados. El PBS se considera una solución inerte en el área de la biomédica, debido a que no genera ningún tipo de reacción al entrar en contacto con otra sustancia e inclusive con los andamios biológicos, si no que más bien ayuda a mantener las características y propiedades de estos. Según Cen et al., (2009) recomienda que para andamios de colágeno y quitosano la esterilización con CO₂ supercrítico es el que mejores resultados ha mostrado, sin comprometer las propiedades mecánicas y biológicas de los mismos.

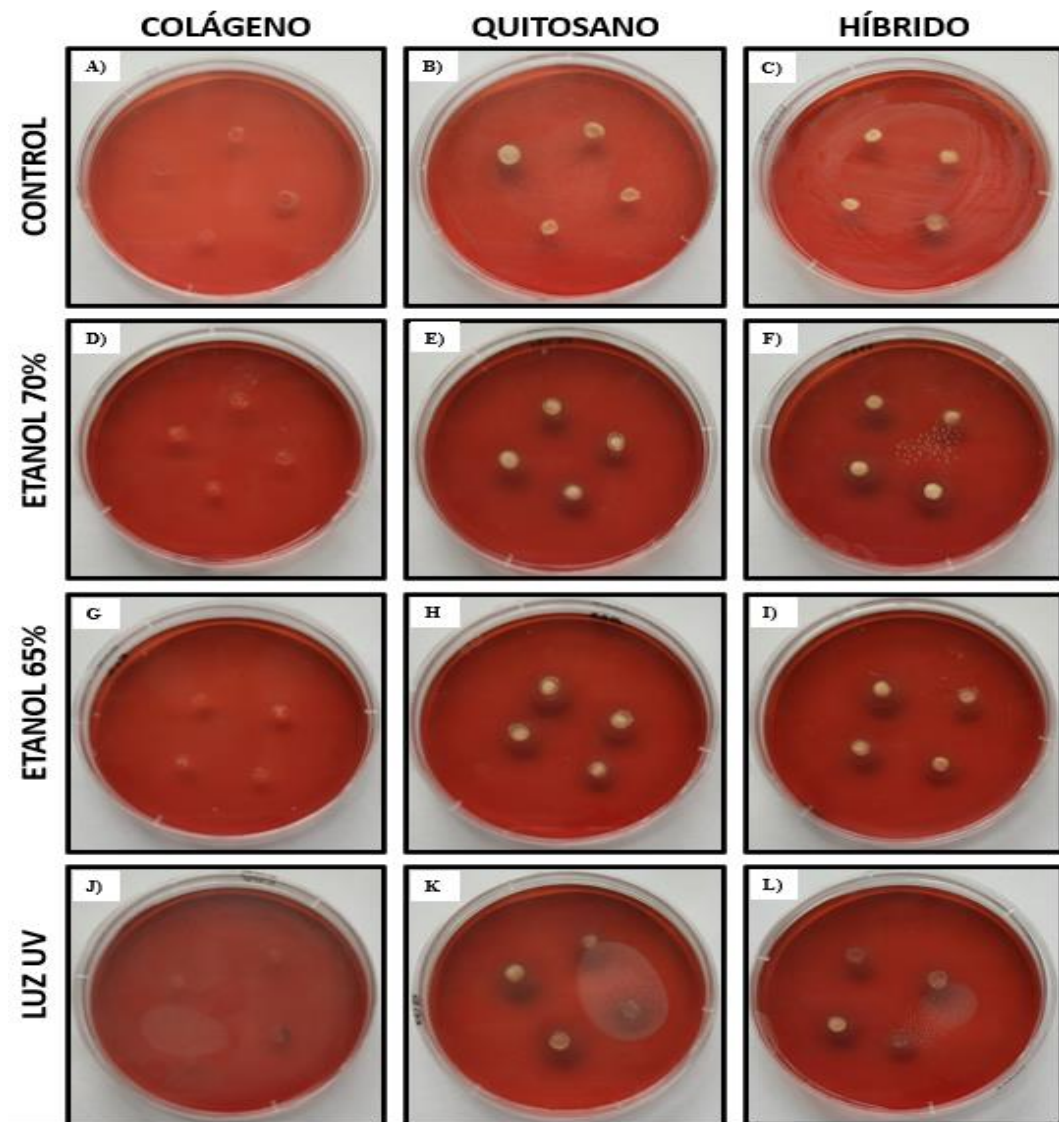


Figura 33. Evaluación de métodos de esterilidad en Agar Sangre

3.1.3.1. Evaluación de la inhibición celular

El ensayo de resazurina permite realizar mediciones rápidas, sencillas y sensibles sobre la viabilidad celular de mamíferos, así como de bacterias. Las células vivas tienen un metabolismo activo, por lo que pueden producir una reacción de reducción de resazurina (colorante no fluorescente - azul) a resorufina (colorante fluorescente - rosado) (Gong et al., 2020). Además, este reactivo se considera poco citotóxico, por lo que no genera alteraciones en los resultados, siendo ampliamente utilizado para el monitoreo de proliferación celular e inhibición bacteriana en andamios biológicos y

otros biomateriales empleados en el proceso de cultivo celular (Zhou et al., 2013). Sin embargo, se debe tener en consideración aspectos como: 1) la elevada concentración celular y el tiempo de incubación, debido a que puede agotar la reserva de la resazurina y perderse la correlación entre la reacción de reducción y la concentración celular y 2) las células vivas pueden provocar una segunda reducción de resofurina en hidrosesofurina que no presenta coloración, dando resultados aberrantes en los que una concentración celular o bacteriana pueden dar señales débiles, mientras que concentraciones bajas pueden dar señales altas (Uzarski et al., 2017).

En este caso se aplicó el ensayo de resazurina para determinar la proliferación bacteriana presente en los diferentes tipos de ABs que fueron expuestos a *S. aureus* en Caldo Mueller Hinton (MH). Para ello se realizaron diferentes tratamientos como se expone en la Figura 35, donde se utilizaron andamios esterilizados y no esterilizados, los cuales fueron sembrados en 200µL de Caldo MH y otros bajo las mismas condiciones, pero inoculando *S. aureus*. Con esto se pudo evaluar la efectividad de los métodos de esterilización y a su vez la actividad antimicrobiana de los biopolímeros empleados.

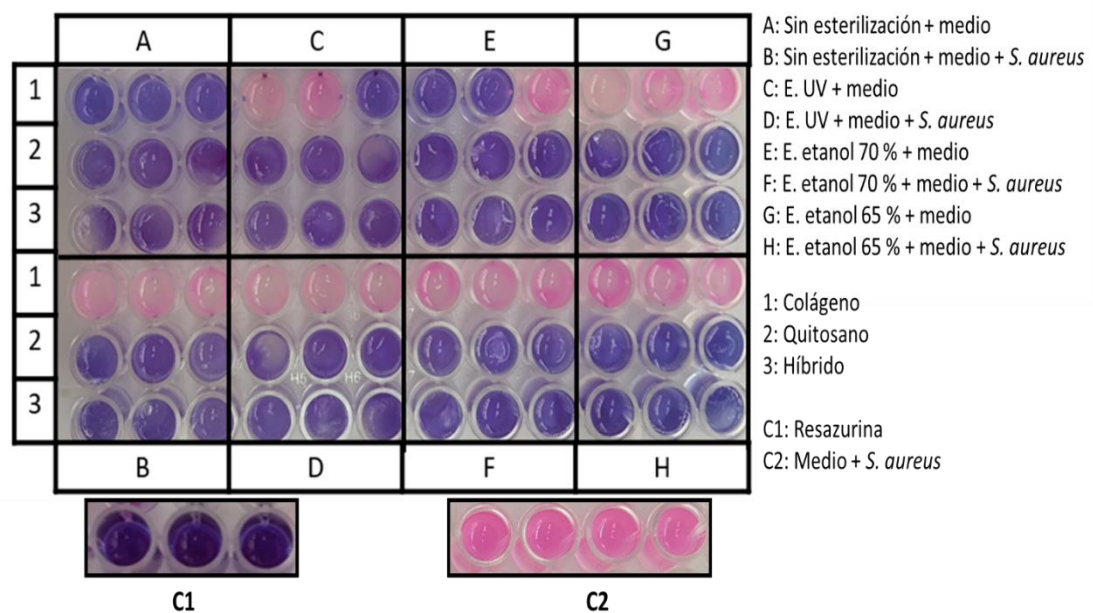


Figura 34. Evaluación de inhibición celular (Resazurina).

En los tratamientos C, E y G que corresponden a los métodos de esterilización de luz UV, etanol 70 y 65% respectivamente, donde los ABs solo están en contacto con Caldo MH, se puede denotar que las filas 2 y 3 de ABs de quitosano e híbrido presentan una coloración violeta indicativo de que no existe contaminación bacteriana; sin embargo, no sucede lo mismo con la fila 1 que corresponde a los ABs de colágeno en donde la mayoría muestran contaminación bacteriana, especialmente el tratamiento G que corresponde a la esterilización con etanol 65%. No obstante, el tratamiento A que son andamios sin esterilizar en Caldo MH no muestra contaminación para ninguno de los tipos de ABs, esto puede deberse a que como se mencionó en el apartado anterior los métodos de esterilización afectan directamente a las propiedades de los andamios y en el caso del colágeno provoca pérdida de morfología y peso, facilitando su contaminación bacteriana.

Por otro lado, los tratamientos D, F, H corresponden a los ABs esterilizados por los tres métodos, donde los mismos se encuentran inoculados en Caldo MH con *S. aureus*, evidenciando que las filas 2 y 3 que son ABs de quitosano e híbrido muestran coloración violeta azulada significando que no existe proliferación bacteriana, pese a que se encontraban en presencia, mostrando así actividad antimicrobiana; mientras que la fila 1 que son ABs de colágeno muestran proliferación bacteriana por su coloración rosada, el mismo comportamiento se ve para el tratamiento B, donde pese a que los ABs no se encontraban estériles los ABs de quitosano e híbrido no muestran presencia bacteriana, pero los ABs de colágeno sí. Con esto se evidencia la capacidad antimicrobiana que posee el quitosano.

Para contrastar los resultados obtenidos en el ensayo de la Resazurina, se determinó el porcentaje de proliferación bacteriana (*S. aureus*) dado en cada uno de los tratamientos como se evidencia en la Figura 36, teniendo para los ABs de colágeno 90.61, 80.72 y 84.49% de proliferación frente al control de bacterias más medio con 62.36%, es decir que los ABs de colágeno son una matriz rica para *S. aureus* y no demuestran actividad antimicrobiana. Por otro lado, los ABs de quitosano muestran valores inferiores de

20.89, -14.22 y 13.47%, lo que demuestra que tiene propiedades antimicrobianas que impide la proliferación bacteriana. Mientras que los ABs híbridos denotan un nivel intermedio con valores de 38.13, -25.15 y -41.59% esto debido a la presencia de quitosano en su composición.

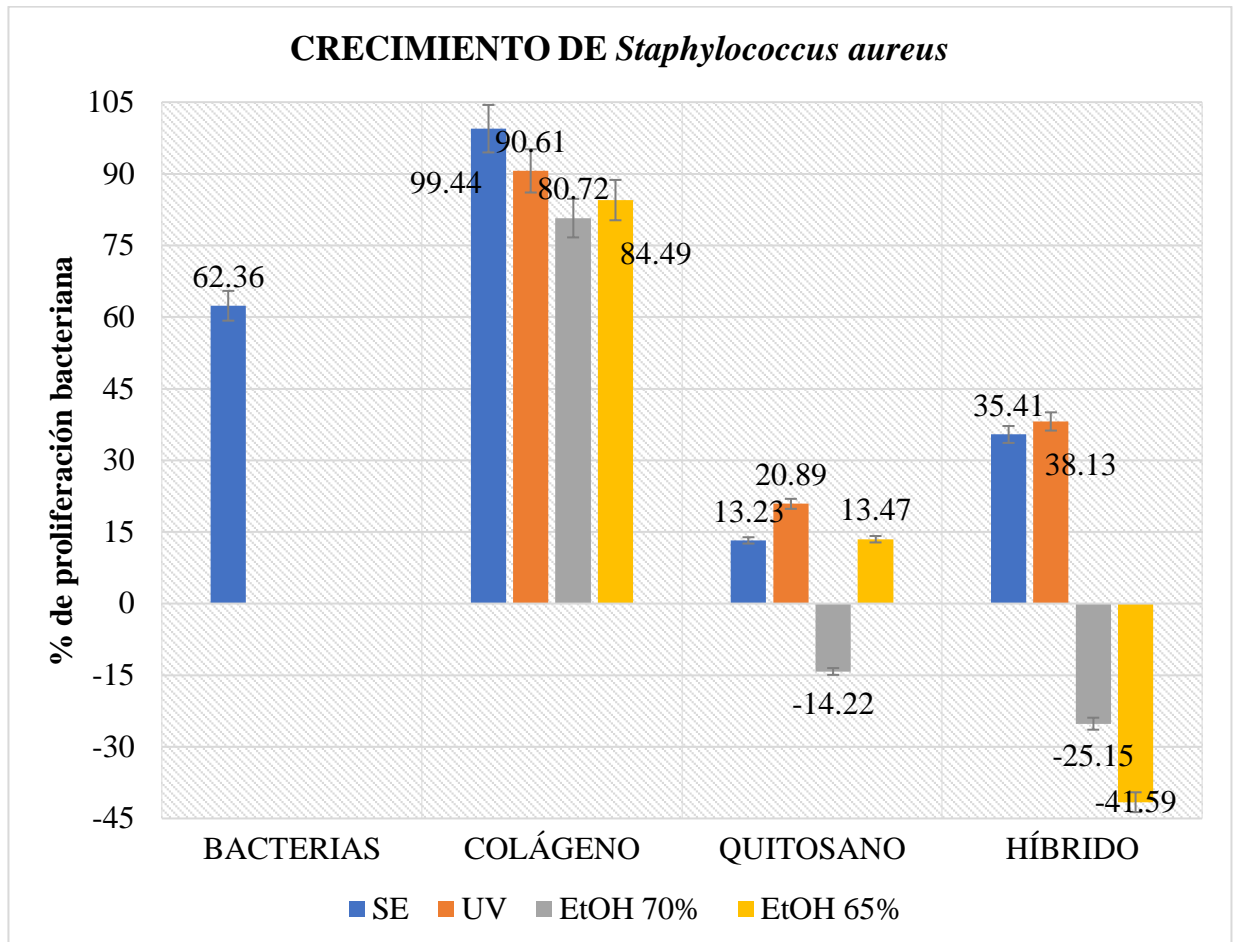


Figura 35. Porcentaje de proliferación de *S. aureus*.

En la IT una de las mayores problemáticas son las infecciones bacterianas, específicamente en el tejido epitelial complicando el proceso de curación de las heridas debido a la contaminación, principalmente por *Escherichia coli* y *S. aureus* causantes de sepsis crónica, así como también *Candida* spp. Que es un hongo comúnmente identificado en infecciones (Kadam et al., 2019). Si bien los polímeros naturales como el colágeno pueden acelerar el proceso de cicatrización, también genera una problemática, debido a que *S. aureus* presenta moléculas de adhesión a la superficie celular generando unión a la matriz como la adhesina de unión a colágeno y adhesina

de amplia especificidad que facilita la unión *S. aureus* a macromoléculas como el colágeno (Warowicka, Kościński, Waszczyk, & Goździcka-Józefiak, 2022). En el caso de los ABs biológicos, una vez que las bacterias logran la adhesión a estos, se da la colonización y elaboran factores de virulencia que desencadenan en la descomposición de los componentes presentes, facilitando la invasión bacteriana (Warowicka et al., 2022).

El quitosano es un biopolímero que posee actividad antimicrobiana de forma intrínseca, esto se debe a la carga positiva dispuesta en el C-2 del monómero de glucosamina producto de un pH inferior a 6, provocando que sea mayormente soluble y presente una mejor actividad antimicrobiana respecto a la quitina (Serrano et al., 2022). La acción del quitosano radica principalmente en la superficie externa de las bacterias, cuando la concentración es menor (<0.2 mg/mL), el quitosano policatiónico afecta la superficie bacteriana con carga negativa provoca su aglutinamiento, mientras que una concentración elevada imparte una carga positiva neta mantiene las bacterias en suspensión (Desai et al., 2023). Este biopolímero puede actuar de diferentes maneras frente a la presencia bacteriana; actúa como un agente quelante uniéndose a trazas de metales que inhiben la producción y toxinas y crecimiento bacteriano (Mohandas et al., 2018), también actúa como un agente aglutinante de agua e inhibe la actividad de ciertas enzimas; la unión del quitosano al ADN provoca la penetración hacia los núcleos de los microorganismos provocando la inhibición de la síntesis de ARNm.

Se ha evidenciado que el quitosano presenta actividad antimicrobiana respecto a una gran cantidad de bacterias, no obstante, en el caso específico de *S. aureus* se demostró que una concentración de 1 – 1.5 % del biopolímero provoca su inactivación completa después de 2 días de incubación considerando un pH de 5.5 or 6.5, no obstante una concentración de 500 ppm inhibió por completo su crecimiento en 2 horas de incubación. Mientras que en otros estudios se demostró que una concentración de 0.02% demostró un efecto letal a *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Proteus vulgaris*. En

base a lo expuesto, se evidencia que la concentración de quitosano es un factor determinante en la capacidad inhibitoria (Rabea et al., 2003), razón por la que, en el presente estudio la inhibición total de *S. aureus* no se consiguió (Figura 35) debido a que el tiempo de incubación fue de 24 horas, no obstante, se muestra una reducción considerable respecto a los ABs de colágeno. Así mismo, se muestra que el colágeno en los ABs híbridos influyen sobre la actividad antimicrobiana, provocando que el crecimiento bacteriano sea mayor en comparación al los ABs de quitosano.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se elaboraron andamios basados en colágeno y quitosano a concentraciones del 1% biopolímero y 0,5% agarosa, obteniendo ABs completamente secos, con una coloración blanquecina para los ABs de colágeno y levemente amarillenta para los ABs de quitosano e híbrido. Además, se evidenció que los ABs de colágeno son frágiles, a diferencia de los otros ABs que mostraban mayor rigidez, teniendo los ABs híbridos mejor características visuales. El ensayo de inserción en etanol reveló que los ABs de colágeno son los más porosos con un 89.07%, lo que se confirmó con las imágenes de SEM. Los ABs de colágeno presentan una porosidad elevada con un tamaño de poros promedio de 75.43 μm . Los ABs de quitosano es medianamente poroso con 87.21% y un tamaño promedio de poros de 80.22 μm . Mientras que los ABs híbridos tienen 79.94% de porosidad, con un tamaño promedio de poros de 126.01 μm .
- Los ABs requieren cumplir con ciertas características para que sean aptos en el desarrollo de tejidos, por ejemplo, ser biocompatibles y no generar reacciones al entrar en contacto con el ser humano, especialmente con la sangre. Los tres tipos de ABs mostraron buena hemocompatibilidad, ya que dependiendo del tipo de tejido al que vayan a ser empleados varían los parámetros. Para el tejido epitelial, en base a los resultados obtenidos se evidencia que los ABs de colágeno son mejores, debido a que presenta una degradación a los 5 días, con una tasa de coagulación (BCI) del 95.40% evitando la formación de trombos al encontrarse dentro del organismo, sin embargo, presentó un 2.90% de hemólisis considerándolo como ligeramente hemolítico, aunque se encuentra dentro del rango máximo de 5%, aquí el ABs híbrido muestra un perfil no hemolítico de 0.37%. Para la adhesión plaquetaria y de glóbulos rojos, de igual forma los ABs de colágeno mostraron los mejores resultados con una concentración de glóbulos rojos de 3447.15 mg/dL y una

adhesión de plaquetas del 84.24% promoviendo la vascularización, transporte de nutrientes y activación del sistema de coagulación. Sin embargo, la adición del quitosano mejora las características mecánicas.

- La esterilización en los ABs les confiere inocuidad y que se encuentren libres de fuentes de patógenos y además es una condición necesaria previo al cultivo de células humanas, por lo que se aplicó dos métodos de esterilización: luz UV por 30 min y etanol al 65 y 70% mostrando que fueron efectivos, debido a que no se evidenció contaminación bacteriana al ser inoculados en Medio Agar Sangre. Además, mediante el ensayo de inhibición bacteriana se observó que los ABs de quitosano y colágeno/quitosano inhiben el crecimiento de *S. aureus*, debido a que el quitosano posee actividad antimicrobiana de forma natural y con la bibliografía se comprobó que se requiere de una concentración del 1% de quitosano para la inactivación de las bacterias, contribuyendo al mantenimiento de la esterilidad.
- Finalmente, si bien es cierto los tres andamios elaborados podrían ser aplicados para el desarrollo de distinto tipos de tejidos, los resultados obtenidos en cuanto a de porosidad, hemocompatibilidad y biocompatibilidad también sugieren que la combinación de biopolímeros puede mejora las características de los ABs elaborados. Por ejemplo, los andamios de colágeno sufren una rápida degradación (4 días) pero al combinarlo con quitosano esta rápida degradabilidad disminuye (7 días) mejorando así sus propiedades mecánicas. Por su parte, los andamios de quitosano presentan menor porosidad, pero al combinarlo con colágeno la porosidad y el tamaño de poros aumenta lo que beneficiaría la adhesión y migración celular. Por tanto, estudios sobre elaboración y combinación de biopolímeros es una arista importante para la ingeniería de tejidos.
- Según los resultados alcanzados, los ABs de colágeno podrían ser aplicados para el desarrollo de tejido epitelial, donde se requiere una porosidad del 80 y 90% favoreciendo la propagación y migración de células epiteliales. Los ABs

de quitosano podrían ser aplicados para tejido óseo y cartilaginoso donde se requiere una porosidad del 70% para la adhesión y proliferación de fibroblastos y condrocitos y los ABs colágeno/quitosano. Finalmente, los ABs híbridos se pueden emplear para tejido óseo, cartilaginoso y conectivo conforme a los valores de porosidad presentados del 79.94%, aunque presenta características interesantes para el tejido epitelial, sugiriendo hacer mejoras en cuanto a la microestructura que lo haga ideal para sustitutos de piel.

4.2. Recomendaciones

- Elaborar andamios combinando biopolímeros naturales y sintéticos con el propósito de mejorar las características biológicas y mecánicas.
- Extender el tiempo empleado en las pruebas de biodegradabilidad.
- Evaluar el comportamiento de una mayor cantidad de células, incluidas células inmunes para proporcionar una idea del comportamiento *in vitro*.
- Continuar con etapas como la evaluación de la bioactividad de los andamios biológicos.
- Mejorar el ensayo de Resazurina, empleando un fluorómetro para la medición del porcentaje de proliferación celular.
- Aplicar otras técnicas de esterilización sobre los andamios biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaliya, B., Sunooj, K. V., & Lackner, M. (2021). Biopolymer composites: a review. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 40–84. doi: 10.1080/24759651.2021.1881214
- Adamiak, K., & Sionkowska, A. (2022). The influence of UV irradiation on fish skin collagen films in the presence of xanthohumol and propanediol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 282, 121652. doi: 10.1016/j.saa.2022.121652
- Adel, I. M., ElMeligy, M. F., & Elkasabgy, N. A. (2022). Conventional and Recent Trends of Scaffolds Fabrication: A Superior Mode for Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 14(2), 306. doi: 10.3390/pharmaceutics14020306
- Ahmed, M., Verma, A. K., & Patel, R. (2020). Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100315. doi: 10.1016/j.scp.2020.100315
- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A., & Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 97–109. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140
- Akca, G., Özdemir, A., Öner, Z. G., & Şenel, S. (2018). Comparison of different types and sources of chitosan for the treatment of infections in the oral cavity. *Research on Chemical Intermediates*, 44(8), 4811–4825. doi: 10.1007/s11164-018-3338-8
- Akter, F. (2016a). Principles of Tissue Engineering. In *Tissue Engineering Made Easy* (pp. 3–16). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3
- Akter, F. (2016b). Principles of Tissue Engineering. In *Tissue Engineering Made Easy* (pp. 3–16). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3
- Albaugh, V. L., Mukherjee, K., & Barbul, A. (2017). Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing. *The Journal of Nutrition*, 147(11), 2011–2017. doi: 10.3945/jn.117.256404
- Amirrah, I. N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M. F. M. R., Motta, A., & Fauzi, M. B. (2022). A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of

- Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines*, *10*(9), 2307. doi: 10.3390/biomedicines10092307
- Ashammakhi, N., GhavamiNejad, A., Tutar, R., Fricker, A., Roy, I., Chatzistavrou, X., ... Caterson, E. J. (2022). Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *28*(3), 633–664. doi: 10.1089/ten.teb.2021.0012
- Balan, V., & Verestiuc, L. (2014). Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal*, *53*, 171–188. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.01.033
- Bandzerewicz, A., & Gadomska-Gajadhur, A. (2022). Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells*, *11*(5), 914. doi: 10.3390/cells11050914
- Bartoš, M., Suchý, T., & Foltán, R. (2018a). Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? *BioMedical Engineering OnLine*, *17*(1), 110. doi: 10.1186/s12938-018-0543-z
- Bartoš, M., Suchý, T., & Foltán, R. (2018b). Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? *BioMedical Engineering OnLine*, *17*(1), 110. doi: 10.1186/s12938-018-0543-z
- Bedell, M. L., Guo, J. L., Xie, V. Y., Navara, A. M., & Mikos, A. G. (2020). Polymer scaffold fabrication. In *Principles of Tissue Engineering* (pp. 295–315). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-818422-6.00018-6
- Belleghem, S. M. Van, Mahadik, B., Snodderly, K. L., & Fisher, J. P. (2020). Overview of Tissue Engineering Concepts and Applications. In *Biomaterials Science* (pp. 1289–1316). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-816137-1.00081-7
- Bhat, S., & Kumar, A. (2012). Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *114*(6), 663–670. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.005

- Biswal, T. (2021). Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*, *41*, 397–402. doi: 10.1016/j.matpr.2020.09.628
- Bitar, K. N., & Zakhem, E. (2014). Design strategies of biodegradable scaffolds for tissue regeneration. *Biomedical Engineering and Computational Biology*, *6*, 13–20. doi: 10.4137/BECB.S10961
- Bolívar-Monsalve, E. J., Alvarez, M. M., Hosseini, S., Espinosa-Hernandez, M. A., Ceballos-González, C. F., Sanchez-Dominguez, M., ... Trujillo-de Santiago, G. (2021). Engineering bioactive synthetic polymers for biomedical applications: a review with emphasis on tissue engineering and controlled release. *Materials Advances*, *2*(14), 4447–4478. doi: 10.1039/D1MA00092F
- Braghirolli, D. I., Steffens, D., Quintiliano, K., Acasigua, G. A. X., Gamba, D., Fleck, R. A., ... Pranke, P. (2014). The effect of sterilization methods on electronspun poly(lactide- co -glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *102*(4), 700–708. doi: 10.1002/jbm.b.33049
- Budishevskaya, O., Popadyuk, N., Musyanovych, A., Kohut, A., Donchak, V., Voronov, A., & Voronov, S. (2020). *Formation of three-dimensional polymer structures through radical and ionic reactions of peroxychitosan*. doi: 10.1016/B978-0-12-817903-1.00012-7
- Caballero Aguilar, L. M., Silva, S. M., & Moulton, S. E. (2019). Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, *306*, 40–58. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.05.028
- Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017a). Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *5*. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040
- Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017b). Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *5*. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040
- Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017c). Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *5*. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040

- Capuana, E., Lopresti, F., Carfi Pavia, F., Brucato, V., & La Carrubba, V. (2021). Solution-Based Processing for Scaffold Fabrication in Tissue Engineering Applications: A Brief Review. *Polymers*, 13(13), 2041. doi: 10.3390/polym13132041
- Cen, L., Liu, W. E. I., Cui, L. E. I., Zhang, W., Cao, Y., L, R. S. W., ... Tong, S. J. (2009). *Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications*. 63(5), 492–496.
- Chen, G., & Kawazoe, N. (2016). Preparation of Polymer Scaffolds by Ice Particulate Method for Tissue Engineering. In *Biomaterials Nanoarchitectonics* (pp. 77–95). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-37127-8.00006-6
- Chen, S., Gil, C. J., Ning, L., Jin, L., Perez, L., Kabboul, G., ... Serpooshan, V. (2021). Adhesive Tissue Engineered Scaffolds: Mechanisms and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.683079
- Chi Perera, C. J., Castillo Baas, M. G., Alcocer Lara, G. A., Ramos Borges, S. I., Rodríguez Guzmán, A. L., Fernández Cervantes, I., & Rodríguez Fuentes, N. (2020). Characterization and hemocompatibility assessment of porous composite scaffolds with a biomimetic human clavicle macrostructure. *Health and Technology*, 10(2), 423–428. doi: 10.1007/s12553-019-00374-9
- Chocholata, P., Kulda, V., & Babuska, V. (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, 12(4), 568. doi: 10.3390/ma12040568
- Chopra, H., Kumar, S., & Singh, I. (2021). Biopolymer-based Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Current Drug Targets*, 22(3), 282–295. doi: 10.2174/1389450121999201102140408
- Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, 31(21), 2010609. doi: 10.1002/adfm.202010609
- Copes, F., Pien, N., Van Vlierberghe, S., Boccafoschi, F., & Mantovani, D. (2019). Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. doi: 10.3389/fbioe.2019.00166

- Costa, A., Naranjo, J. D., Londono, R., & Badylak, S. F. (2017a). Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9), a025676. doi: 10.1101/cshperspect.a025676
- Costa, A., Naranjo, J. D., Londono, R., & Badylak, S. F. (2017b). Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9), a025676. doi: 10.1101/cshperspect.a025676
- Costantini, M., & Barbetta, A. (2018). Gas foaming technologies for 3D scaffold engineering. In *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds* (pp. 127–149). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-100979-6.00006-9
- Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016a). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, 7, 204173141664881. doi: 10.1177/2041731416648810
- Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016b). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, 7, 204173141664881. doi: 10.1177/2041731416648810
- Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016c). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, 7, 204173141664881. doi: 10.1177/2041731416648810
- Danilevicius, P., Georgiadi, L., Pateman, C. J., Claeysens, F., Chatzinikolaidou, M., & Farsari, M. (2015). The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3D scaffolds. *Applied Surface Science*, 336, 2–10. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.06.012
- Deng, A., Yang, Y., & Du, S. (2021). Tissue Engineering 3D Porous Scaffolds Prepared from Electrospun Recombinant Human Collagen (RHC) Polypeptides/Chitosan Nanofibers. *Applied Sciences*, 11(11), 5096. doi: 10.3390/app11115096
- Desai, N., Rana, D., Salave, S., Gupta, R., Patel, P., Karunakaran, B., ... Kommineni, N. (2023). Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 15(4), 1313. doi: 10.3390/pharmaceutics15041313

- DiNoro, J. N., Paxton, N. C., Skewes, J., Yue, Z., Lewis, P. M., Thompson, R. G., ... Wallace, G. G. (2022). Laser Sintering Approaches for Bone Tissue Engineering. *Polymers*, *14*(12), 2336. doi: 10.3390/polym14122336
- Dong, C., & Lv, Y. (2016a). Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*, *8*(2), 42. doi: 10.3390/polym8020042
- Dong, C., & Lv, Y. (2016b). Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*, *8*(2), 42. doi: 10.3390/polym8020042
- Dufey, V., Tacheny, A., Art, M., Becken, U., & Longueville, F. De. (2016). Expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in BioBLU 0.3 c single-use bioreactors. *Appl Note*, (305), 1–8.
- Ebhodaghe, S. O. (2021). Natural Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *32*(16), 2144–2194. doi: 10.1080/09205063.2021.1958185
- Efraim, Y., Schoen, B., Zahran, S., Davidov, T., Vasilyev, G., Baruch, L., ... Machluf, M. (2019). 3D Structure and Processing Methods Direct the Biological Attributes of ECM-Based Cardiac Scaffolds. *Scientific Reports*, *9*(1), 5578. doi: 10.1038/s41598-019-41831-9
- Elashnikov, R., Rimpelová, S., Vosmanská, V., Kolská, Z., Kolářová, K., Lyutakov, O., & Švorčík, V. (2019). Effect of sterilization methods on electrospun cellulose acetate butyrate nanofibers for SH-SY5Y cultivation. *Reactive and Functional Polymers*, *143*, 104339. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104339
- Elisseeff, J., Badylak, S. F., & Boeke, J. D. (2021). Immune and Genome Engineering as the Future of Transplantable Tissue. *New England Journal of Medicine*, *385*(26), 2451–2462. doi: 10.1056/NEJMra1913421
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, *2019*, 1–13. doi: 10.1155/2019/3429527
- Evrova, O., Kellenberger, D., Scalera, C., Calcagni, M., Giovanoli, P., Vogel, V., & Buschmann, J. (2019). Impact of UV sterilization and short term storage on the

- in vitro release kinetics and bioactivity of biomolecules from electrospun scaffolds. *Scientific Reports*, 9(1), 15117. doi: 10.1038/s41598-019-51513-1
- Farshi Azhar, F., Olad, A., & Salehi, R. (2014). Fabrication and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds. *Designed Monomers and Polymers*, 17(7), 654–667. doi: 10.1080/15685551.2014.907621
- Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Zakir Hossain, K. M., Roberts, G. A. F., & Grant, D. M. (2019). Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, 204, 59–67. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.002
- Garcia, M., Cascalho, M., & Platt, J. (2018). Accommodation in ABO-incompatible organ transplants. *Xenotransplantation*, 25(3), e12418. doi: 10.1111/xen.12418
- Gerchman, Y., Cohen-Yaniv, V., Betzalel, Y., Yagur-Kroll, S., Belkin, S., & Mamane, H. (2019). The involvement of superoxide radicals in medium pressure UV derived inactivation. *Water Research*, 161, 119–125. doi: 10.1016/j.watres.2019.05.084
- Ghodbane, S. A., & Dunn, M. G. (2016). Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(11), 2685–2692. doi: 10.1002/jbm.a.35813
- Giudice, P. (2020). Skin Infections Caused by Staphylococcus aureus. *Acta Dermato Venereologica*, 100(9), adv00110-215. doi: 10.2340/00015555-3466
- Goldenberg, D., McLaughlin, C., Koduru, S. V., & Ravnic, D. J. (2021). Regenerative Engineering: Current Applications and Future Perspectives. *Frontiers in Surgery*, 8. doi: 10.3389/fsurg.2021.731031
- Gong, X., Liang, Z., Yang, Y., Liu, H., Ji, J., & Fan, Y. (2020). A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process. *Regenerative Biomaterials*, 7(3), 271–281. doi: 10.1093/rb/rbaa002
- Griffin, M., Naderi, N., Kalaskar, D. M., Malins, E., Becer, R., Thornton, C. A., ... Seifalian, A. M. (2018a). Evaluation of Sterilisation Techniques for

- Regenerative Medicine Scaffolds Fabricated with Polyurethane Nonbiodegradable and Bioabsorbable Nanocomposite Materials. *International Journal of Biomaterials*, 2018, 1–14. doi: 10.1155/2018/6565783
- Griffin, M., Naderi, N., Kalaskar, D. M., Malins, E., Becer, R., Thornton, C. A., ... Seifalian, A. M. (2018b). Evaluation of Sterilisation Techniques for Regenerative Medicine Scaffolds Fabricated with Polyurethane Nonbiodegradable and Bioabsorbable Nanocomposite Materials. *International Journal of Biomaterials*, 2018, 1–14. doi: 10.1155/2018/6565783
- Griffon, D., Sedighi, M., Schaeffer, D., Eurell, J., & Johnson, A. (2006). Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*, 2(3), 313–320. doi: 10.1016/j.actbio.2005.12.007
- Guarino, V., Raucci, M. G., Ronca, A., Cirillo, V., & Ambrosio, L. (2014). Multifunctional scaffolds for bone regeneration. In *Bone Substitute Biomaterials* (pp. 95–117). Elsevier. doi: 10.1533/9780857099037.2.95
- Guizouarn, H., & Barshtein, G. (2020). Editorial: Red Blood Cell Vascular Adhesion and Deformability. *Frontiers in Physiology*, 11. doi: 10.3389/fphys.2020.00657
- Guo, B., & Ma, P. X. (2014). Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry*, 57(4), 490–500. doi: 10.1007/s11426-014-5086-y
- Guo, X., Sun, T., Zhong, R., Ma, L., You, C., Tian, M., ... Wang, C. (2018). Effects of Chitosan Oligosaccharides on Human Blood Components. *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi: 10.3389/fphar.2018.01412
- Haaparanta, A. M., Järvinen, E., Cengiz, I. F., Ellä, V., Kokkonen, H. T., Kiviranta, I., & Kellomäki, M. (2014). Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(4), 1129–1136. doi: 10.1007/s10856-013-5129-5
- Hagbin, M., Esmailzadeh, J., & Kahrobaee, S. (2020). Freeze Dried Biodegradable Polycaprolactone/Chitosan/Gelatin Porous Scaffolds for Bone Substitute Applications. *Macromolecular Research*, 28(S1), 1232–1240. doi: 10.1007/s13233-020-8170-5

- Haghjooy Javanmard, S., Anari, J., Zargar Kharazi, A., & Vatankhah, E. (2016). In vitro hemocompatibility and cytocompatibility of a three-layered vascular scaffold fabricated by sequential electrospinning of PCL, collagen, and PLLA nanofibers. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(3), 438–449. doi: 10.1177/0885328216652068
- Han, F., Dong, Y., Su, Z., Yin, R., Song, A., & Li, S. (2014). Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *International Journal of Pharmaceutics*, 476(1–2), 124–133. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.036
- Han, Y., Lian, M., Wu, Q., Qiao, Z., Sun, B., & Dai, K. (2021). Effect of Pore Size on Cell Behavior Using Melt Electrowritten Scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.629270
- Hartley, E., Moon, H., & Neves, A. (2022). Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering: A Mini-review. *Reinvention: An International Journal of Undergraduate Research*, 15(1). doi: 10.31273/reinvention.v15i1.801
- Hassan, M., Bai, J., & Dou, D.-Q. (2019). Biopolymers; Definition, Classification and Applications. *Egyptian Journal of Chemistry*, 0–0. doi: 10.21608/ejchem.2019.6967.1580
- Horakova, J., Klicova, M., Erben, J., Klapstova, A., Novotny, V., Behalek, L., & Chvojka, J. (2020). Impact of Various Sterilization and Disinfection Techniques on Electrospun Poly-ε-caprolactone. *ACS Omega*, 5(15), 8885–8892. doi: 10.1021/acsomega.0c00503
- INDOT. (2021). *Informe Estadístico Técnico 2021*. Ecuador.
- Ivanov, A. N., Saveleva, M. S., Kozadaev, M. N., Matveeva, O. V., Sal'kovskiy, Y. E., Lyubun, G. P., ... Norkin, I. A. (2019). New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment. *BioNanoScience*, 9(2), 395–405. doi: 10.1007/s12668-019-00613-3
- Jaganathan, S., Balaji, A., Ismail, A. F., & Rajasekar, R. (2016). Fabrication and hemocompatibility assessment of novel polyurethane-based bio-nanofibrous dressing loaded with honey and *Carica papaya* extract for the management of burn injuries. *International Journal of Nanomedicine, Volume 11*, 4339–4355. doi: 10.2147/IJN.S112265

- Jang, J.-W., Min, K.-E., Kim, C., Shin, J., Lee, J., & Yi, S. (2023). Review: Scaffold Characteristics, Fabrication Methods, and Biomaterials for the Bone Tissue Engineering. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 24(3), 511–529. doi: 10.1007/s12541-022-00755-7
- Jimenez, J., Las Heras, K., Etxabide, A., Uranga, J., de la Caba, K., Guerrero, P., ... Hernandez, R. M. (2022). Green hemostatic sponge-like scaffold composed of soy protein and chitin for the treatment of epistaxis. *Materials Today Bio*, 15, 100273. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100273
- Jiménez-Gómez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020a). Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules*, 25(17), 3981. doi: 10.3390/molecules25173981
- Jiménez-Gómez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020b). Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules*, 25(17), 3981. doi: 10.3390/molecules25173981
- Joshi, S. R., Pendyala, G. S., Shah, P., Mopagar, V. P., Padmawar, N., & Padubidri, M. (2020). Scaffolds--The Ground for Regeneration: A Narrative Review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 10(6), 692–699. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD_198_20
- Jun, I., Han, H.-S., Edwards, J., & Jeon, H. (2018). Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 745. doi: 10.3390/ijms19030745
- Juwarkar, C. (2013). Cleaning and sterilisation of anaesthetic equipment. *Indian Journal of Anaesthesia*, 57(5), 541. doi: 10.4103/0019-5049.120152
- Kadam, S., Nadkarni, S., Lele, J., Sakhalkar, S., Mokashi, P., & Kaushik, K. S. (2019). Bioengineered Platforms for Chronic Wound Infection Studies: How Can We Make Them More Human-Relevant? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. doi: 10.3389/fbioe.2019.00418
- Kang, Y., & Chang, J. (2018). Channels in a porous scaffold: a new player for vascularization. *Regenerative Medicine*, 13(6), 705–715. doi: 10.2217/rme-2018-0022

- Kannan, R., Wei, G., & Ma, P. X. (2022). Synthetic polymeric biomaterials for tissue engineering. In *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers* (pp. 41–74). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-820508-2.00023-4
- Kawase, T., Kamiya, M., Kobayashi, M., Tanaka, T., Okuda, K., Wolff, L. F., & Yoshie, H. (2015). The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(4), 825–831. doi: 10.1002/jbm.b.33262
- Khan, R., & Khan, M. (2013). Use of collagen as a biomaterial: An update. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(4), 539. doi: 10.4103/0972-124X.118333
- Kim, S., Cui, Z.-K., Koo, B., Zheng, J., Aghaloo, T., & Lee, M. (2018). Chitosan–Lysozyme Conjugates for Enzyme-Triggered Hydrogel Degradation in Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(48), 41138–41145. doi: 10.1021/acsami.8b15591
- Kirillova, A., Yeazel, T. R., Asheghali, D., Petersen, S. R., Dort, S., Gall, K., & Becker, M. L. (2021). Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers. *Chemical Reviews*, 121(18), 11238–11304. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01200
- Kołodziejaska, M., Jankowska, K., Klak, M., & Wszola, M. (2021). Chitosan as an Underrated Polymer in Modern Tissue Engineering. *Nanomaterials*, 11(11), 3019. doi: 10.3390/nano11113019
- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023a). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*, 9(2), 100. doi: 10.3390/gels9020100
- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023b). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*, 9(2), 100. doi: 10.3390/gels9020100
- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023c). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*, 9(2), 100. doi: 10.3390/gels9020100

- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023d). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*, 9(2), 100. doi: 10.3390/gels9020100
- Kumar, H., & Kim, K. (2020). *Stereolithography 3D Bioprinting*. doi: 10.1007/978-1-0716-0520-2_6
- Kupiec, J. W. (2022). Grand Challenges in Organ Transplantation. *Frontiers in Transplantation*, 1. doi: 10.3389/frtra.2022.897679
- Laidmäe, I., Ērglis, K., Cēbers, A., Janmey, P. A., & Uibo, R. (2018). Salmon fibrinogen and chitosan scaffold for tissue engineering: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(12). doi: 10.1007/s10856-018-6192-8
- Lee, H.-S., Yee, M. Q., Eckmann, Y. Y., Hickok, N. J., Eckmann, D. M., & Composto, R. J. (2012). Reversible swelling of chitosan and quaternary ammonium modified chitosan brush layers: effects of pH and counter anion size and functionality. *Journal of Materials Chemistry*, 22(37), 19605. doi: 10.1039/c2jm34316a
- León. (2021). *Síntesis y caracterización de un hidrogel a partir de colágena marina-poliuretano integrado con secretoma de células troncales con potencial aplicación en el tratamiento de úlceras venosas*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida.
- León, A., Morales, A., Martínez, V., Vargas, A., Zeugolis, D., & Aguirre, G. (2019). Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. *Molecules*, 24(22), 4031. doi: 10.3390/molecules24224031
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161. doi: 10.1039/c4tb00027g
- Liu, S., Lau, C.-S., Liang, K., Wen, F., & Teoh, S. H. (2022). Marine collagen scaffolds in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 74, 92–103. doi: 10.1016/j.copbio.2021.10.011
- Liu, Z., Wang, Y., Wu, B., Cui, C., Guo, Y., & Yan, C. (2019). A critical review of fused deposition modeling 3D printing technology in manufacturing polylactic

- acid parts. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 102(9–12), 2877–2889. doi: 10.1007/s00170-019-03332-x
- Lizardi-Mendoza, J., Argüelles Monal, W. M., & Goycoolea Valencia, F. M. (2016). Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 3–31). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X
- LogithKumar, R., KeshavNarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S., & Selvamurugan, N. (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 151, 172–188. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.049
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013a). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485–502. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013b). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485–502. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437
- López-Marcial, G. R., Elango, K., & O’Connell, G. D. (2022). Addition of collagen type I in agarose created a dose-dependent effect on matrix production in engineered cartilage. *Regenerative Biomaterials*, 9. doi: 10.1093/rb/rbac048
- Łopianiak, I., & Butruk-Raszeja, B. A. (2020). Evaluation of Sterilization/Disinfection Methods of Fibrous Polyurethane Scaffolds Designed for Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8092. doi: 10.3390/ijms21218092
- Lutzweiler, G., Ndreu Halili, A., & Engin Vrana, N. (2020). The Overview of Porous, Bioactive Scaffolds as Instructive Biomaterials for Tissue Regeneration and Their Clinical Translation. *Pharmaceutics*, 12(7). doi: 10.3390/pharmaceutics12070602
- Ma, L. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24(26), 4833–4841. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00374-0
- Madaghiale, M., Salvatore, L., & Sannino, A. (2014). Tailoring the pore structure of foam scaffolds for nerve regeneration. In *Biomedical Foams for Tissue*

- Engineering Applications* (pp. 101–128). Elsevier. doi: 10.1533/9780857097033.1.101
- Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2016). Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials*, 2016, 1–14. doi: 10.1155/2016/9825659
- Martínez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N., & Cameron, R. E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate Polymers*, 132, 606–619. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.084
- Mashayekhan, S., Hajiabbas, M., & Fallah, A. (2013). Stem Cells in Tissue Engineering. In *Pluripotent Stem Cells*. InTech. doi: 10.5772/54371
- Maurya, A. K., & Mishra, N. (2020). Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. *Functional and Smart Materials*, 63(5), 19–36. doi: 10.1201/9780429298035-2
- Merlin, L. P. (2022). Musculoskeletal tissue engineering. In *Tissue Engineering* (pp. 531–553). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-824064-9.00024-1
- Mironov, V. A., Senatov, F. S., Koudan, E. V., Pereira, F. D. A. S., Kasyanov, V. A., Granjeiro, J. M., & Baptista, L. S. (2022). Design, Fabrication, and Application of Mini-Scaffolds for Cell Components in Tissue Engineering. *Polymers*, 14(23), 5068. doi: 10.3390/polym14235068
- Moerman, F., & Mager, K. (2016). Cleaning and Disinfection in Dry Food Processing Facilities. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (pp. 521–554). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-100155-4.00035-2
- Mohandas, A., Deepthi, S., Biswas, R., & Jayakumar, R. (2018). Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. *Bioactive Materials*, 3(3), 267–277. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.003
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. (2019). *Fundamentals and Applications of Chitosan*. Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-3-030-16538-3_2
- Nazir, R., Bruyneel, A., Carr, C., & Czernuszka, J. (2021). Mechanical and Degradation Properties of Hybrid Scaffolds for Tissue Engineered Heart Valve

- (TEHV). *Journal of Functional Biomaterials*, 12(1), 20. doi: 10.3390/jfb12010020
- Nelson, M., Li, S., Page, S. J., Shi, X., Lee, P. D., Stevens, M. M., ... Jones, J. R. (2021). 3D printed silica-gelatin hybrid scaffolds of specific channel sizes promote collagen Type II, Sox9 and Aggrecan production from chondrocytes. *Materials Science and Engineering: C*, 123, 111964. doi: 10.1016/j.msec.2021.111964
- Nitti, P., Kunjalukkal Padmanabhan, S., Cortazzi, S., Stanca, E., Siculella, L., Licciulli, A., & Demitri, C. (2021). Enhancing Bioactivity of Hydroxyapatite Scaffolds Using Fibrous Type I Collagen. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.631177
- Nokoorani, Y. D., Shamloo, A., Bahadoran, M., & Moravvej, H. (2021a). Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering. *Scientific Reports*, 11(1), 16164. doi: 10.1038/s41598-021-95763-4
- Nokoorani, Y. D., Shamloo, A., Bahadoran, M., & Moravvej, H. (2021b). Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering. *Scientific Reports*, 11(1), 16164. doi: 10.1038/s41598-021-95763-4
- Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*, 2(2), 374–398. doi: 10.3390/ma2020374
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., & Oyen, M. L. (2016). Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 41, 193–203. doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.024
- Orjuela, A., & Clark, J. (2020). Green chemicals from used cooking oils: Trends, challenges, and opportunities. *Elsevier*, (January), 13. doi: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cogsc.2020.100369>

- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), 1863–1887. doi: 10.3390/ma3031863
- Park, H., Choi, B., Hu, J., & Lee, M. (2013). Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4779–4786. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.033
- Patel, S., Srivastava, S., Singh, M. R., & Singh, D. (2018). Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1888–1897. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.056
- Pérez Davila, S., González Rodríguez, L., Chiussi, S., Serra, J., & González, P. (2021). How to Sterilize Polylactic Acid Based Medical Devices? *Polymers*, 13(13), 2115. doi: 10.3390/polym13132115
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019a). Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 262–269. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.198
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019b). Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 262–269. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.198
- Perić Kačarević, Ž., Rider, P., Alkildani, S., Retnasingh, S., Pejakić, M., Schnettler, R., ... Barbeck, M. (2020). An introduction to bone tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*, 43(2), 69–86. doi: 10.1177/0391398819876286
- Piaia, L., Salmoria, G. V., & Hotza, D. (2020). Additive Manufactured Nanocomposites for Bone Tissue Engineering Applications: an Overview. *Materials Research*, 23(1). doi: 10.1590/1980-5373-mr-2019-0487
- Pipattanawarothai, A., Suksai, C., Srisook, K., & Trakulsujaritchok, T. (2017). Non-cytotoxic hybrid bioscaffolds of chitosan-silica: Sol-gel synthesis, characterization and proposed application. *Carbohydrate Polymers*, 178(August), 190–199. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.09.047

- Pramanik, S., Kharche, S., More, N., Ranglani, D., Singh, G., & Kapusetti, G. (2023a). Natural Biopolymers for Bone Tissue Engineering: A Brief Review. *Engineered Regeneration*, 4(2), 193–204. doi: 10.1016/j.engreg.2022.12.002
- Pramanik, S., Kharche, S., More, N., Ranglani, D., Singh, G., & Kapusetti, G. (2023b). Natural Biopolymers for Bone Tissue Engineering: A Brief Review. *Engineered Regeneration*, 4(2), 193–204. doi: 10.1016/j.engreg.2022.12.002
- Qu, M., Jiang, X., Zhou, X., Wang, C., Wu, Q., Ren, L., ... Khademhosseini, A. (2020). Stimuli-Responsive Delivery of Growth Factors for Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 9(7), 1901714. doi: 10.1002/adhm.201901714
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465. doi: 10.1021/bm034130m
- Rademakers, T., Horvath, J. M., Blitterswijk, C. A., & LaPointe, V. L. S. (2019). Oxygen and nutrient delivery in tissue engineering: Approaches to graft vascularization. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(10), 1815–1829. doi: 10.1002/term.2932
- Radwan, J., Janus, Ł., Piątkowski, M., Bogdał, D., & Matýsek, D. (2020). Hybrid Bilayer PLA/Chitosan Nanofibrous Scaffolds Doped with ZnO, Fe₃O₄, and Au Nanoparticles with Bioactive Properties for Skin Tissue Engineering. *Polymers*, 12(1), 159. doi: 10.3390/polym12010159
- Raeiszadeh, M., & Adeli, B. (2020). A Critical Review on Ultraviolet Disinfection Systems against COVID-19 Outbreak: Applicability, Validation, and Safety Considerations. *ACS Photonics*, 7(11), 2941–2951. doi: 10.1021/acsp Photonics.0c01245
- Ramos-Zúñiga, R., Segura-Duran, I., González-Castañeda, R. E., & González Rios, J. A. (2022). The challenges of the bioactive scaffolds in nervous system: From their molecular conformation to their therapeutic efficiency. *Neurology Perspectives*, 2, S3–S18. doi: 10.1016/j.neurop.2021.07.007
- Rather, R. A., Bhat, M. A., & Shalla, A. H. (2022). An insight into synthetic and physiological aspects of superabsorbent hydrogels based on carbohydrate type

- polymers for various applications: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 3, 100202. doi: 10.1016/j.carpta.2022.100202
- Rediguieri, C. F., Sassonia, R. C., Dua, K., Kikuchi, I. S., & de Jesus Andreoli Pinto, T. (2016). Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 82, 181–195. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016
- Ressler, A. (2022). Chitosan-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering Applications: A Short Review. *Polymers*, 14(16), 3430. doi: 10.3390/polym14163430
- Saeedi Garakani, S., Khanmohammadi, M., Atoufi, Z., Kamrava, S. K., Setayeshmehr, M., Alizadeh, R., ... Abbaspourrad, A. (2020). Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 533–545. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.040
- Sahana, T. G., & Rekha, P. D. (2018). Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2857–2867. doi: 10.1007/s11033-018-4296-3
- Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., & Badylak, S. F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 49, 1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.068
- Samrot, A. V., Sathiyasree, M., Rahim, S. B. A., Renitta, R. E., Kasipandian, K., Krithika Shree, S., ... Chinni, S. V. (2023). Scaffold Using Chitosan, Agarose, Cellulose, Dextran and Protein for Tissue Engineering—A Review. *Polymers*, 15(6), 1525. doi: 10.3390/polym15061525
- Sandle, T. (2019). Selection and Application of Culture Media. In *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare* (pp. 103–123). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-814911-9.00007-9
- Sarukawa, J., Takahashi, M., Abe, M., Suzuki, D., Tokura, S., Furuike, T., & Tamura, H. (2011). Effects of chitosan-coated fibers as a scaffold for three-dimensional cultures of rabbit fibroblasts for ligament tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22(4–6), 717–732. doi: 10.1163/092050610X491067

- Schimper, C. B., Pachschröll, P., Maitz, M. F., Werner, C., Rosenau, T., & Liebner, F. (2023). Hemocompatibility of cellulose phosphate aerogel membranes with potential use in bone tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 11*. doi: 10.3389/fbioe.2023.1152577
- Schulze-Tanzil, G. (2015). Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. *Journal of Biochips & Tissue Chips, s2*. doi: 10.4172/2153-0777.S2-004
- Sefat, F., Mozafari, M., & Atala, A. (2019). Introduction to tissue engineering scaffolds. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One* (pp. 3–22). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-102563-5.00001-0
- Serrano, Á., Cano, A., Sabater i Serra, R., anani, M., Aljabali, AlaaAA., Tambuwala, M. M., & Mishra, Y. K. (2022). Scaffolds in the microbial resistant era: Fabrication, materials, properties and tissue engineering applications. *Materials Today Bio, 16*, 100412. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100412
- Serrano-Aroca, Á., Cano-Vicent, A., Sabater i Serra, R., El-Tanani, M., Aljabali, AlaaAA., Tambuwala, M. M., & Mishra, Y. K. (2022). Scaffolds in the microbial resistant era: Fabrication, materials, properties and tissue engineering applications. *Materials Today Bio, 16*, 100412. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100412
- Shah, R., Stodulka, P., Skopalova, K., & Saha, P. (2019). Dual Crosslinked Collagen/Chitosan Film for Potential Biomedical Applications. *Polymers, 11*(12). doi: 10.3390/polym11122094
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Dhar Bhatt, V., & Dhot, P. (2019). Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of Medicine and Life, 12*(3), 225–229. doi: 10.25122/jml-2019-0032
- Sharma, S., & Mittal, N. (2016). A comparative evaluation of natural and artificial scaffolds in regenerative endodontics: A clinical study. *Saudi Endodontic Journal, 6*(1), 9. doi: 10.4103/1658-5984.171995
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009a). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry, 78*(1), 929–958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833

- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009b). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 929–958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Si, J., Yang, Y., Xing, X., Yang, F., & Shan, P. (2019). Controlled degradable chitosan/collagen composite scaffolds for application in nerve tissue regeneration. *Polymer Degradation and Stability*, 166, 73–85. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2019.05.023
- Sola, A., Bertacchini, J., D'Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmiroli, S., & Messori, M. (2019). Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 153–165. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.086
- Solez, K., Fung, K. C., Saliba, K. A., Sheldon, V. L. C., Petrosyan, A., Perin, L., ... Cornell, L. D. (2018). The bridge between transplantation and regenerative medicine: Beginning a new Banff classification of tissue engineering pathology. *American Journal of Transplantation*, 18(2), 321–327. doi: 10.1111/ajt.14610
- Song, X., Zhu, C., Fan, D., Mi, Y., Li, X., Fu, R., ... Feng, R. (2017). A Novel Human-Like Collagen Hydrogel Scaffold with Porous Structure and Sponge-Like Properties. *Polymers*, 9(12), 638. doi: 10.3390/polym9120638
- Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., & Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, 1(2), 93–108. doi: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001
- Su, C., Chen, Y., Tian, S., Lu, C., & Lv, Q. (2022). Research Progress on Emerging Polysaccharide Materials Applied in Tissue Engineering. *Polymers*, 14(16), 3268. doi: 10.3390/polym14163268
- Takallu, S., Mirzaei, E., Azadi, A., Karimizade, A., & Tavakol, S. (2019). Plate-shape carbonated hydroxyapatite/collagen nanocomposite hydrogel via *in situ* mineralization of hydroxyapatite concurrent with gelation of collagen at pH = 7.4 and 37°C. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(6), 1920–1929. doi: 10.1002/jbm.b.34284

- Talebi, A., Labbaf, S., Atari, M., & Parhizkar, M. (2021). Polymeric Nanocomposite Structures Based on Functionalized Graphene with Tunable Properties for Nervous Tissue Replacement. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(9), 4591–4601. doi: 10.1021/acsbomaterials.1c00744
- Tao, M., Ao, T., Mao, X., Yan, X., Javed, R., Hou, W., ... Ao, Q. (2021). Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. *Bioactive Materials*, 6(9), 2927–2945. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.02.010
- Tonelli, F. M. P., de Cássia Oliveira Paiva, N., de Medeiros, R. V. B., Pinto, M. C. X., Tonelli, F. C. P., & Resende, R. R. (2017). Tissue Engineering. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 315–324). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7
- Totea, G., Ionita, D., Demetrescu, I., & Mitache, M. (2014). In vitro hemocompatibility and corrosion behavior of new Zr-binary alloys in whole human blood. *Open Chemistry*, 12(7), 796–803. doi: 10.2478/s11532-014-0535-1
- Upadhyay, R. K. (2017a). Role of Biological Scaffolds, Hydro Gels and Stem Cells in Tissue Regeneration Therapy. *Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access*, 2(1). doi: 10.15406/atroa.2017.02.00020
- Upadhyay, R. K. (2017b). Role of Biological Scaffolds, Hydro Gels and Stem Cells in Tissue Regeneration Therapy. *Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access*, 2(1). doi: 10.15406/atroa.2017.02.00020
- Upadhyay, R. K. (2017c). Role of Biological Scaffolds, Hydro Gels and Stem Cells in Tissue Regeneration Therapy. *Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access*, 2(1). doi: 10.15406/atroa.2017.02.00020
- Walker, S., Schönfelder, J., Tugtekin, S.-M., Wetzell, C., Hacker, M. C., & Schulz-Siegmund, M. (2018). Stabilization and Sterilization of Pericardial Scaffolds by Ultraviolet and Low-Energy Electron Irradiation. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 24(12), 717–729. doi: 10.1089/ten.tec.2018.0285
- Warowicka, A., Kościński, M., Waszczyk, M., & Goździcka-Józefiak, A. (2022). Berberine and its derivatives in collagen matrices as antimicrobial agents. *MRS Communications*, 12(3), 336–342. doi: 10.1557/s43579-022-00181-w

- 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. doi: 10.3389/fbioe.2018.00099
- Ye, L., Swingen, C., & Zhang, J. (2013). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Potential for Basic and Clinical Sciences. *Current Cardiology Reviews*, 9(1), 63–72. doi: 10.2174/157340313805076278
- Zarrintaj, P., Seidi, F., Youssefi Azarfam, M., Khodadadi Yazdi, M., Erfani, A., Barani, M., ... Mozafari, M. (2023). Biopolymer-based composites for tissue engineering applications: A basis for future opportunities. *Composites Part B: Engineering*, 258, 110701. doi: 10.1016/j.compositesb.2023.110701
- Zheng, D., Huang, C., Zhu, X., Huang, H., & Xu, C. (2021). Performance of Polydopamine Complex and Mechanisms in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10563. doi: 10.3390/ijms221910563
- Zheng, X., Li, N., Xu, Y., Zhang, C., Ouyang, Y., & Meng, D. (2022). A bilayer collagen scaffold with bevacizumab stabilizes chondrogenesis and promotes osteochondral regeneration. *Materials & Design*, 221, 110981. doi: 10.1016/j.matdes.2022.110981
- Zhou, X., Holsbeeks, I., Impens, S., Sonnaert, M., Bloemen, V., Luyten, F., & Schrooten, J. (2013). Noninvasive Real-Time Monitoring by AlamarBlue® During In Vitro Culture of Three-Dimensional Tissue-Engineered Bone Constructs. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(9), 720–729. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0601

ANEXOS

Anexo 1. Pesos obtenidos para determinación del % de porosidad de los ABs.

Andamios	n°	Wseco (mg)	Wf (mg)	% porosidad
Colágeno	1	4.5	29	89%
	2	4.6	27.5	88%
	3	4.6	29.9	89%
	4	4.5	29.5	89%
Qitosano	1	3.3	30.9	87%
	2	3.2	28.7	86%
	3	3.1	34.5	89%
	4	3.1	31.2	88%
Híbrido	1	5.8	27.3	79%
	2	6.0	32.5	82%
	3	6.0	27.1	78%
	4	6.0	30.0	80%

Anexo 2. Promedio y desviación estándar del % de porosidad de los ABs.

Andamios	% Porosidad	Desviación estándar
Colágeno	89.07%	0.0050
Qitosano	87.21%	0.0115
Híbrido	79.94%	0.0157

Anexo 3. Pesos obtenidos para la determinación del % de hinchamiento de los ABs.

Pesos de los andamios con respecto a los tiempos de inserción en agua, PBS y sangre.											
	n°	Wo									
			5 (s)	15 (s)	30 (s)	1 (min)	5 (min)	15 (min)	30 (min)	60 (min)	
AGUA	Colágeno	1	4.5	28.5	24.3	20	17.6	17.4	13.7	12.3	10.1
		2	4.4	27.6	23.4	20.3	17.4	16.9	12.9	12.7	9.8
		3	4.9	31.8	25.0	22.6	18.8	17.7	13.5	12.6	11.0

SANGRE	Quitosano	4	4.5	29.7	24.4	20.8	17.6	16.6	12.0	11.8	10.5
		1	3.4	83.2	65.8	82.5	87.7	72.9	86.4	90	81.7
		2	3.0	84.7	67.4	82.9	85.1	73.8	78.6	85.7	77.9
		3	3.4	86.9	69.5	80.2	82.2	72.1	85.6	89.8	83.5
		4	2.8	85.8	65.5	81.0	84.3	71.8	76.8	81.3	78.6
	Híbrido	1	6.9	46.7	49	53.1	63.4	67.8	56.6	50.8	47.3
		2	6.8	48.5	51.9	56.1	65.5	71.2	66.7	57.3	51.9
		3	7.2	45.2	47.8	49.3	51.3	54.7	48.6	40.5	36.8
		4	7.0	48.2	50.9	53.7	57.9	59.5	47.2	40.4	37.5
	Colágeno	1	3.9	22.6	22.4	22.2	21.1	0	0	0	0
		2	4.7	30.6	27.6	25.6	25.2	0	0	0	0
		3	4.7	36.9	34.3	27.8	20.3	0	0	0	0
		4	4.9	38.6	34.3	27.1	0	0	0	0	0
	Quitosano	1	3.8	32.5	36	37.1	37.9	32.6	30.9	27.6	24.6
		2	3.7	22.1	25.1	27.1	26.9	24.8	21.5	17.5	14.6
		3	3.7	15.8	18.3	18.7	19.2	17.5	15.3	12.9	9.8
4		3.7	22	25.5	27.4	26.9	24.2	21.1	16.9	14	
Híbrido	1	7.1	28.8	32.8	35.5	37.8	36	34.5	30	27.3	
	2	6.6	24.4	28	33.2	34.9	32.8	29.8	26.9	23.9	
	3	6.8	31.1	33.4	36.2	39	36.5	33.6	30.2	25.9	
	4	6.8	23.9	31.5	35.1	40.1	39.4	37.9	34.8	33.6	
PBS	Colágeno	1	4.4	20.2	20.1	14.8	14.5	12	14.2	15.8	13.5
		2	4.3	20.4	16.5	15.1	15	10.8	14.4	13	13.7
		3	3.4	14.2	10.2	8.7	4.9	3.4	2.8	3	2.7
		4	4.2	21.5	16.8	15.5	15.2	9.9	13.1	11.4	12.1
	Quitosano	1	2.9	34.4	34.8	38.5	40.5	34.4	35.8	38	37.5
		2	2.6	29.3	27.5	30	29.8	29.2	32.4	29.8	31.2
		3	2.8	36.2	32.1	32.7	32.3	32.1	34.8	35.7	35.2
		4	2.8	31.6	31.6	34.9	35	38.9	41.2	41.2	37.2

Híbrido	1	6.6	53.8	41.2	18.5	9.5	0.5	0	0	0
	2	6.7	59.2	48.1	30.7	11.7	2.4	0	0	0
	3	6.7	42.9	36.2	33.5	28.9	22.2	7.7	0	0
	4	6.6	46.1	42	35.1	26.7	21.4	17.6	1.9	0.9

Anexo 4. Porcentajes de hinchamiento obtenidos para los ABs.

% de hinchamiento de los andamios con respecto a los tiempos de inserción en agua, PBS y sangre.											
	n°	Wo	5 (s)	15 (s)	30 (s)	1 (min)	5 (min)	15 (min)	30 (min)	60 (min)	
AGUA	Colágeno	1	4.5	533%	440%	344%	291%	287%	204%	173%	124%
		2	4.4	527%	432%	361%	295%	284%	193%	189%	123%
		3	4.9	549%	410%	361%	284%	261%	176%	157%	124%
		4	4.5	560%	442%	362%	291%	269%	167%	162%	133%
	Quitosano	1	3.4	2347%	1835%	2326%	2479%	2044%	2441%	2547%	2303%
		2	3.0	2723%	2147%	2663%	2737%	2360%	2520%	2757%	2497%
		3	3.4	2456%	1944%	2259%	2318%	2021%	2418%	2541%	2356%
		4	2.8	2964%	2239%	2793%	2911%	2464%	2643%	2804%	2707%
	Híbrido	1	6.9	577%	610%	670%	819%	883%	720%	636%	586%
		2	6.8	613%	663%	725%	863%	947%	881%	743%	663%
		3	7.2	528%	564%	585%	613%	660%	575%	463%	411%
		4	7.0	589%	627%	667%	727%	750%	574%	477%	436%
SANGRE	Colágeno	1	3.9	479%	474%	469%	441%	-100%	-100%	-100%	-100%
		2	4.7	551%	487%	445%	436%	-100%	-100%	-100%	-100%
		3	4.7	685%	630%	491%	332%	-100%	-100%	-100%	-100%
		4	4.9	688%	600%	453%	-100%	-100%	-100%	-100%	-100%
	Quitosano	1	3.8	755%	847%	876%	897%	758%	713%	626%	547%
		2	3.7	497%	578%	632%	627%	570%	481%	373%	295%
		3	3.7	327%	395%	405%	419%	373%	314%	249%	165%
		4	3.7	495%	589%	641%	627%	554%	470%	357%	278%
	Híbrido	1	7.1	306%	362%	400%	432%	407%	386%	323%	285%
		2	6.6	270%	324%	403%	429%	397%	352%	308%	262%
		3	6.8	357%	391%	432%	474%	437%	394%	344%	281%

PBS	Colágeno	4	6.8	251%	363%	416%	490%	479%	457%	412%	394%
		1	4.4	359%	357%	236%	230%	173%	223%	259%	207%
		2	4.2	374%	284%	251%	249%	151%	235%	202%	219%
		3	4.6	318%	200%	156%	44%	0%	-18%	-12%	-21%
	Quitosano	4	4.6	412%	300%	269%	262%	136%	212%	171%	188%
		1	2.9	1086%	1100%	1228%	1297%	1086%	1134%	1210%	1193%
		2	3.3	1027%	958%	1054%	1046%	1023%	1146%	1046%	1100%
		3	3.3	1193%	1046%	1068%	1054%	1046%	1143%	1175%	1157%
	Híbrido	4	3.0	1029%	1029%	1146%	1150%	1289%	1371%	1371%	1229%
		1	5.5	715%	524%	180%	44%	-92%	-100%	-100%	-100%
		2	5.9	784%	618%	358%	75%	-64%	-100%	-100%	-100%
		3	5.9	540%	440%	400%	331%	231%	15%	-100%	-100%
	4	6.3	598%	536%	432%	305%	224%	167%	-71%	-86%	

Anexo 5. Promedio de los % de hinchamiento de los ABs.

Promedio de % de hinchamiento de los andamios con respecto a los tiempos de inserción en agua, PBS y sangre.										
		0 (s)	5 (s)	15 (s)	30 (s)	60 (s)	180 (s)	900 (s)	1800 (s)	3600 (s)
AGUA	Colágeno	0%	542%	431%	357%	290%	275%	185%	170%	126%
	Quitosano	0%	2623%	2041%	2510%	2611%	2222%	2505%	2662%	2466%
	Híbrido	0%	577%	616%	662%	755%	810%	688%	580%	524%
SANGRE	Colágeno	0%	601%	548%	465%	277%	0%	0%	0%	0%
	Quitosano	0%	519%	602%	639%	643%	564%	495%	401%	321%
	Híbrido	0%	296%	360%	413%	456%	430%	397%	346%	305%
PBS	Colágeno	0%	366%	285%	228%	196%	115%	163%	155%	148%
	Quitosano	0%	1084%	1033%	1124%	1137%	1111%	1199%	1201%	1170%
	Híbrido	0%	659%	530%	343%	189%	75%	0%	-93%	-97%

Anexo 6. Desviación estándar de los % de hinchamiento de los ABs.

Desviación estándar del % de hinchamiento de los andamios con respecto a los tiempos de inserción en agua, PBS y sangre.										
		0 (s)	5 (s)	15 (s)	30 (s)	60 (s)	180 (s)	900 (s)	1800 (s)	3600 (s)
AGUA	Colágeno	0	0.149	0.146	0.086	0.049	0.122	0.170	0.139	0.048
	Qitosano	0	2.773	1.846	2.584	2.639	2.236	1.015	1.376	1.806
	Híbrido	0	0.359	0.413	0.578	1.109	1.294	1.460	1.342	1.207
SANGRE	Colágeno	0	1.031	0.785	0.206	2.565	0.000	0.000	0.000	0.000
	Qitosano	0	1.768	1.861	1.923	1.962	1.573	1.647	1.599	1.614
	Híbrido	0	0.467	0.275	0.148	0.302	0.370	0.441	0.460	0.599
PBS	Colágeno	0	0.390	0.648	0.500	1.022	0.781	1.208	1.171	1.132
	Qitosano	0	0.779	0.588	0.802	1.167	1.215	1.152	1.339	0.549
	Híbrido	0	1.102	0.727	1.123	1.503	1.771	1.264	0.144	0.068

Anexo 7. Pesos obtenidos para la determinación del % de degradabilidad de los ABs.

		Pesos para evaluación de degradabilidad								
		n°	0 días	1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	1	4.2	1.6	1.0	0.7	0.3	0.0			
	2	4.5	1.7	1.1	0.9	0.4	0.0			
	3	4.1	1.8	1.2	0.8	0.3	0.0			
	4	4.4	1.4	1.0	0.6	0.2	0.0			
Qitosano	1	3.5	2.6	1.9	1.3	0.6	0.2	0.0		
	2	3.4	2.8	2.0	1.4	0.5	0.1	0.0		
	3	3.2	2.7	2.0	1.9	0.8	0.3	0.0		
	4	3.6	2.9	2.1	1.8	0.7	0.2	0.0		
Híbrido	1	6.1	3.6	2.9	2.3	1.5	0.7	0.3	0.0	
	2	5.4	3.8	3.2	2.7	1.4	0.5	0.2	0.0	
	3	6.3	3.2	2.8	2.2	1.6	0.6	0.2	0.0	
	4	6.0	4.1	3.5	2.9	1.8	0.8	0.4	0.0	

Anexo 8. Pesos residuales obtenidos para el % de biodegradabilidad de los ABs.

		Peso residual para evaluación de degradabilidad						
		1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	1	0.38	0.24	0.17	0.07	0.00	0.00	0.00
	2	0.38	0.24	0.20	0.09	0.00	0.00	0.00
	3	0.44	0.29	0.20	0.07	0.00	0.00	0.00
	4	0.32	0.23	0.14	0.05	0.00	0.00	0.00
Quitosano	1	0.74	0.54	0.37	0.17	0.06	0.00	0.00
	2	0.82	0.59	0.41	0.15	0.03	0.00	0.00
	3	0.84	0.63	0.59	0.25	0.09	0.00	0.00
	4	0.81	0.58	0.50	0.19	0.06	0.00	0.00
Híbrido	1	0.59	0.48	0.38	0.25	0.11	0.05	0.00
	2	0.70	0.59	0.50	0.26	0.09	0.04	0.00
	3	0.51	0.44	0.35	0.25	0.10	0.03	0.00
	4	0.68	0.58	0.48	0.30	0.13	0.07	0.00

Anexo 9. Porcentaje de peso residual obtenido para los ABs.

		% peso residual de los andamios biológicos							
		0 días	1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	1	100.00%	38.10%	23.81%	16.67%	7.14%	0.00%	0.00%	0.00%
	2	100.00%	37.78%	24.44%	20.00%	8.89%	0.00%	0.00%	0.00%
	3	100.00%	43.90%	29.27%	19.51%	7.32%	0.00%	0.00%	0.00%
	4	100.00%	31.82%	22.73%	13.64%	4.55%	0.00%	0.00%	0.00%
Quitosano	1	100.00%	74.29%	54.29%	37.14%	17.14%	5.71%	0.00%	0.00%
	2	100.00%	82.35%	58.82%	41.18%	14.71%	2.94%	0.00%	0.00%
	3	100.00%	84.38%	62.50%	59.38%	25.00%	9.38%	0.00%	0.00%
	4	100.00%	80.56%	58.33%	50.00%	19.44%	5.56%	0.00%	0.00%
Híbrido	1	100.00%	59.02%	47.54%	37.70%	24.59%	11.48%	4.92%	0.00%
	2	100.00%	70.37%	59.26%	50.00%	25.93%	9.26%	3.70%	0.00%
	3	100.00%	50.79%	44.44%	34.92%	25.40%	9.52%	3.17%	0.00%
	4	100.00%	68.33%	58.33%	48.33%	30.00%	13.33%	6.67%	0.00%

Anexo 10. Promedio del % de peso residual obtenido para los ABs.

Promedio del % de peso residual								
	0 días	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	100.00%	37.90%	25.06%	17.45%	6.97%	0.00%		
Quitosano	100.00%	80.39%	58.49%	46.92%	19.07%	5.90%	0.00%	
Híbrido	100.00%	62.13%	52.39%	42.74%	26.48%	10.90%	4.62%	0.00%

Anexo 11. Desviación estándar del % de peso residual de los ABs.

Desviación estándar del % de peso residual								
	0 días	1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	0	0.049	0.029	0.029	0.018	0.000		
Quitosano	0	0.044	0.034	0.099	0.044	0.026	0.000	
Híbrido	0	0.090	0.075	0.075	0.024	0.019	0.015	0.000

Anexo 12. Porcentaje de degradabilidad de los ABs.

Porcentaje de degradabilidad de los ABs								
		1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	1	61.90%	76.19%	83.33%	92.86%	100.00%	100.00%	100.00%
	2	62.22%	75.56%	80.00%	91.11%	100.00%	100.00%	100.00%
	3	56.10%	70.73%	80.49%	92.68%	100.00%	100.00%	100.00%
	4	68.18%	77.27%	86.36%	95.45%	100.00%	100.00%	100.00%
Quitosano	1	25.71%	45.71%	62.86%	82.86%	94.29%	100.00%	100.00%
	2	17.65%	41.18%	58.82%	85.29%	97.06%	100.00%	100.00%
	3	15.63%	37.50%	40.63%	75.00%	90.63%	100.00%	100.00%
	4	19.44%	41.67%	50.00%	80.56%	94.44%	100.00%	100.00%
Híbrido	1	40.98%	52.46%	62.30%	75.41%	88.52%	95.08%	100.00%
	2	29.63%	40.74%	50.00%	74.07%	90.74%	96.30%	100.00%
	3	49.21%	55.56%	65.08%	74.60%	90.48%	96.83%	100.00%
	4	31.67%	41.67%	51.67%	70.00%	86.67%	93.33%	100.00%

Anexo 13. Promedio del % de biodegradación de los ABs.

Promedio del % de biodegradación								
	0 días	1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	0.00%	62.10%	74.94%	82.55%	93.03%	100.00%		
Quitosano	0.00%	19.61%	41.51%	53.08%	80.93%	94.10%	100.00%	
Híbrido	0.00%	37.87%	47.61%	57.26%	73.52%	89.10%	95.38%	100.00%

Anexo 14. Desviación estándar del % de biodegradación de los ABs.

DS Porcentaje de biodegradación								
Andamios	0 días	1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
Colágeno	0	0.049	0.029	0.029	0.018	0		
Quitosano	0	0.044	0.034	0.099	0.044	0.026	0	
Híbrido	0	0.090	0.075	0.075	0.024	0.019	0.015	0

Anexo 15. Valores de absorbancias obtenidas para el % de BCI de los ABs.

Andamios	n°	A [Hemoglobina] (Is)	A [Blanco] (Io)	A [Solución] (Ir)	A [Blanco] (Ior)	Índice de coagulación (BCI)
Colágeno	1	0.1663	0.0353			94.93%
	2	0.1678	0.0365			95.14%
	3	0.1659	0.0341			95.51%
	4	0.1661	0.0336			96.01%
Quitosano	1	0.1382	0.0457			67.03%
	2	0.1311	0.0383			67.25%
	3	0.1493	0.0568	0.2221	0.0841	67.03%
	4	0.1326	0.0393			67.61%
Híbrido	1	0.1432	0.0709			52.39%
	2	0.1204	0.0475			52.83%
	3	0.1147	0.0417			52.90%
	4	0.1129	0.0411			52.03%

Anexo 16. Promedio y desviación estándar del % de BCI de los ABs.

Andamios	Índice de coagulación (BCI)	Desviación estándar
Colágeno	95.40%	0.0048
Quitosano	67.23%	0.0027
Híbrido	52.54%	0.0041

Anexo 17. Valores de absorbancias obtenidos para el % de hemólisis de los ABs.

Muestras	n°	[Hemoglobina] (Is)	A Control positivo (Ir)	A Control negativo (Io)	%Hemolisis
Colágeno	1	0.0057	0.1757		3.24%
	2	0.0045			2.56%
	3	0.0053			3.02%
	4	0.0049			2.79%
Quitosano	1	0.0036	0.1872	0	1.92%
	2	0.0039			2.08%
	3	0.0032			1.71%
	4	0.0035			1.87%
Híbrido	1	0.0007	0.1872		0.37%
	2	0.0006			0.32%
	3	0.0010			0.53%
	4	0.0005			0.27%
Sangre	1	0.1872			100.00%

Anexo 18. Promedio y desviación estándar del % de hemólisis de los ABs.

Muestras	% Hemólisis	Desviación estándar
Sangre	100.00%	0
Colágeno	2.90%	0.0029

Qitosano	1.90%	0.0015
Híbrido	0.37%	0.0012

Anexo 19. Valores de absorbancias para la determinación de la concentración de hemoglobina de los ABs.

	n°	A (Muestra) (Is)	Factor de conversión	[Hemoglobina] g/dl	[Hemoglobina] mg/dl
Colágeno	1	0.1190	29.4	3.50	3498.6
	2	0.1170		3.44	3439.8
	3	0.1160		3.41	3410.4
	4	0.1170		3.44	3439.8
Qitosano	1	0.0476	29.4	1.40	1399.44
	2	0.0491		1.44	1443.54
	3	0.0491		1.44	1443.54
	4	0.0477		1.40	1402.38
Híbrido	1	0.0455	29.4	1.34	1337.70
	2	0.0415		1.22	1220.10
	3	0.0454		1.33	1334.76
	4	0.0414		1.22	1217.16
Sangre	1	0.5863		17.24	17237.22

Anexo 20. Promedio y desviación estándar de la concentración de hemoglobina de los ABs.

Muestras	[Hemoglobina] mg/dl	Desviación estándar
Sangre	17237.22	0.00
Colágeno	3447.15	36.99
Qitosano	1422.23	24.64
Híbrido	1277.43	67.92

Anexo 21. Valores de absorbancias obtenidos para el % de liberación de LDH de los ABs.

	n°	[LDH] (<i>I_s</i>)	Normalización	A Control positivo (<i>I_r</i>)	A Control negativo (<i>I_o</i>)	%liberación de LDH
Colágeno	1	1.6316	0.0163			84.13%
	2	1.6324	0.0163			84.35%
	3	1.6324	0.0163			84.35%
	4	1.6316	0.0163			84.13%
Quitosano	1	1.5854	0.0159			71.42%
	2	1.5847	0.0158			71.23%
	3	1.5839	0.0158	0.016893	0.013257	71.01%
	4	1.5843	0.0158			71.12%
Híbrido	1	1.6025	0.0160			76.13%
	2	1.6088	0.0161			77.86%
	3	1.6097	0.0161			78.11%
	4	1.6118	0.0161			78.69%
Plasma	1	1.6893	0.016893			100%

Anexo 22. Promedio y desviación estándar del % de liberación de LDH de los ABs.

Muestras	% de liberación de LDH	Desviación estándar
Plasma	100%	0
Colágeno	84.24%	0.00127
Quitosano	71.20%	0.00176
Híbrido	77.70%	0.01101

Anexo 23. Valores de las absorbancias obtenidos para el ensayo de resazurina (proliferación bacteriana).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	0.869	0.856	0.774	0.892			1.583	1.645	1.455	1.790	1.618	
2				2.562	2.711	2.607						
3	0.783	0.939	0.985	0.851	0.832	0.863	1.491	1.486	1.025	1.036	0.964	1.002
4	2.816	2.230	2.656	2.319	2.213	1.899	2.371	2.493	2.654	3.036	2.417	2.747
5	2.089	1.874	2.267	2.304	1.841	1.878	3.158	3.076	2.767	3.268	3.315	2.665
6	0.900	1.118	1.036	1.052	1.064	1.368	1.352	1.367	1.244	1.180	1.207	1.394
7	2.306	2.533	2.400	1.988	2.200	2.678	3.021	2.953	2.596	2.240	2.104	2.884
8	2.478	1.776	1.908	1.907	2.209	1.914	3.041	2.801	3.259	3.218	3.307	3.375

Anexo 24. Promedio de las absorbancias obtenidas para los diferentes tratamientos de los ABs.

	Sin esterilización	Luz UV	Etanol 70%	Etanol 65%
Colágeno	0.902	0.849	1.334	1.001
Quitosano	2.567	2.144	2.506	2.733
Híbrido	2.077	2.008	3.000	3.083
Colágeno	1.018	1.161	1.321	1.260
Quitosano	2.413	2.289	2.857	2.409
Híbrido	2.054	2.010	3.034	3.300

Anexo 25. Determinación de los % de proliferación bacteriana con respecto a los ABs.

	Bacterias	Resazurina	Colágeno	Quitosoano	Híbrido
SE + <i>S. aureus</i>	1.618	2.627	1.018	2.413	2.054
UV + <i>S. aureus</i>			1.161	2.289	2.010
E70% + <i>S. aureus</i>			1.321	2.857	3.034
E65% + <i>S. aureus</i>			1.260	2.409	3.300

Anexo 26. Valores obtenidos de % de proliferación bacteriana con respecto a los controles.

	Bacterias	Resazurina	Colágeno	Quitosoano	Híbrido
SE + <i>S. aureus</i>	100	162.360939	62.91718171	149.1347342	126.946848
UV + <i>S. aureus</i>			71.7552534	141.4709518	124.2274413
E70% + <i>S. aureus</i>			81.64400494	176.5760198	187.5154512
E65% + <i>S. aureus</i>			77.87391842	148.8875155	203.9555006

Anexo 27. Porcentaje de proliferación bacteriana en los ABs.

	Bacterias	Colágeno	Quitosoano	Híbrido
SE	62.36	99.44	13.23	35.41
UV		90.61	20.89	38.13
EtOH 70%		80.72	-14.22	-25.15
EtOH 65%		84.49	13.47	-41.59

Anexo 28. Permiso del Comité de Bioética