UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Caracterización biológica de andamios elaborados con policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de microesferas.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Articulado al proyecto de investigación "Desarrollo de modelos celulares tridimencionales para investigación biomédica y medicina regenerativa" aprobado mediante la Resolución: UTA-CONIN-2025-0029-R

Autor: Wendy Sabrina Ramos Llagua

Tutor: Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción 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, 23 de Junio de 2025.

Firmado electrónicamente por:
LORENA DE LOS ANGELES NUNEZ VILLACIS
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

1804256905

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Wendy Sabrina Ramos Llagua, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Wendy Sabrina Ramos Llagua

1805726088

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo 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 mis derechos de autor.



Wendy Sabrina Ramos Llagua

1805726088

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción 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:

Firmado electrónicamente por:
MANUEL ISRAEL GUANOQUIZA RIVERA
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MARIA EUGENIA GARCIA PAZMINO
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. María Eugenia García Pazmiño

C.I. 2100248505

Firmado electrónicamente por:
DANIEL ALFONSO CABRERA VALLE
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle

C.I. 1802561595

Ambato, 07 de Julio 2025.

DEDICATORIA

A **Dios**, por sostenerme cuando sentí que me caía, por abrir caminos cuando todo parecía cerrarse y por no soltarme, incluso cuando yo misma dudaba.

A mi mami, **Jesica**, mi pilar eterno, mi refugio y mi fuerza, por ser quien me enseñó que las batallas se ganan con esfuerzo, que cada desafío trae consigo una lección, y que la perseverancia y el amor son las claves para convertir los sueños en realidad.

A mis abuelitos maternos**, mamita Tere y papito Juan**, por ser raíz, ejemplo y amor incondicional. Ustedes me han enseñado que el verdadero tesoro es la familia, y que el amor que nace en el hogar es el que más perdura.

A **Edison, Joel, Evelyn y Karen**, a quienes llevo en el alma como hermanos, por abrazarme con el alma cuando sentía que me rompía por dentro. Por permitirme ser yo, sin exigencias, sin máscaras, sin miedo.

A todos a quienes me brindaron un poco de su ser, espíritu y fe. ¡Lo logramos!

Wendy

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la **Dra. Lorena Núñez**, mi tutora de tesis, por su invaluable guía, dedicación, apoyo y sabios consejos a lo largo de este proceso. Su expertise, paciencia y su maravilloso carisma fueron fundamentales para el éxito de este trabajo. También extiendo mi gratitud a la **Ing**. **Leslie**, por su apoyo constante y asistencia en cada etapa de la investigación.

Quiero agradecer de todo corazón a mi **mami Jesica**, una mujer fuerte, valiente y ejemplar, que ha sido mi guía y mi mayor inspiración. Gracias por acompañarme no solo en esta etapa, sino en cada paso de mi vida, por brindarme su apoyo incondicional y su amor inagotable. Gracias por ser mi fuerza, mi ejemplo, mi mayor motivo para seguir adelante y por enseñarme que todo se consigue con mucho esfuerzo propio.

A mi hermano **Edison**, gracias por llenar mi vida de enseñanzas, por hacer que mi corazón jamás se sintiera vacío. En los momentos más difíciles, tu presencia fue mi refugio, tus palabras un consuelo y tu apoyo incondicional, mi mayor fortaleza. Gracias por ser esa persona en la que siempre puedo confiar, por ser mi paz en medio del caos, mi lugar seguro.

A **Liz**, mi compañera inseparable de esta travesía, por ser luz en los días grises, consuelo en las dificultades y alegría constante en cada paso compartido.

A mis amigos **Erick, Antony, Ángel y Alex** gracias por estar conmigo desde el primer día, sobre todo en los momentos más difíciles, cuando sentí que no podía más, siempre estuvieron ahí con un abrazo sincero y esas palabras que me devolvían la calma. Los quiero con todo mi corazón, llevaré siempre su amistad y la esencia de cada uno como uno de los regalos más valiosos de esta etapa.

A mi compañero de tesis, **Sebas**, gracias por brindarme tu comprensión y apoyo durante todo este proceso.

A las quienes estuvieron a cargo de los **Laboratorios de la UOIDDE** y a mis **donadores de sangre**, gracias por brindarme las herramientas académicas, recursos y el espacio para desarrollar este proyecto.

Finalmente, a todas las personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a que este proyecto llegara a su fin: ¡mil gracias!

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ..... **II**
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ..... **III**
DERECHOS DE AUTOR ..... **IV**
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... **V**
DEDICATORIA ..... **VI**
AGRADECIMIENTO ..... **VII**
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS ..... **VIII**
ÍNDICE DE TABLAS ..... **XI**
ÍNDICE DE FIGURAS ..... **XII**
ÍNDICE DE ANEXOS ..... **XIII**
ÍNDICE DE ECUACIONES ..... **XV**
RESUMEN EJECUTIVO ..... **XVI**
ABSTRACT ..... **XVII**
CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO **1**
1.1. Antecedentes investigativos 1
1.1.1. Planteamiento del problema y justificación 1
1.1.2. Estructura y composición de tejido óseo 2
1.1.2.1. Matriz extracelular ósea 3
1.1.2.2. Células de tejido óseo 4
1.1.3. Ingeniería de tejido óseo 6
1.1.3.1. Células empleadas para ingeniería de tejidos 7
1.1.3.2. Factores de crecimiento 8
1.1.3.3. Andamios Biológicos 10
1.1.4. Biomateriales para andamios de tejido óseo 12
1.1.4.1. Biopolímeros naturales 12
1.1.4.2. Biopolímeros sintéticos 14
1.1.4.3. Porógenos 16
1.1.5. Propiedades de los andamios biológicos 17
1.1.6. Métodos de fabricación de andamios biológicos 19
1.1.6.1. Liofilización 19
1.1.6.2. Electrospray 20
1.1.6.3. Electrohilado 20

1.1.6.4. Impresión 3D 21
1.1.6.5. Lixiviación de porógenos 21
1.2. Objetivos 22
1.2.1. Objetivo general 22
1.2.2. Objetivos específicos 22
CAPÍTULO II – METODOLOGÍA 23
2.1. Materiales 23
2.1.1. Reactivos 23
2.1.2. Materiales fungibles 23
2.1.3. Equipos 24
2.2. Métodos 24
2.2.1. Construcción de andamios biológicos de policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de microesferas. 24
2.2.1.1. Preparación de microesferas 25
2.2.1.2. Construcción de andamios a base de policaprolactona y quitosano. . 25
2.2.1.3. Formación de poros por lixiviación de microesferas 25
2.2.2. Evaluación de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos mediante pruebas hemostáticas. 26
2.2.2.1. Ensayos biológicos 26
2.2.2.2. Evaluación de coagulación *in vitro* 26
2.2.2.3. Evaluación de hemólisis *in vitro* 27
2.2.2.4. Evaluación de la adhesión de glóbulos rojos 27
2.2.2.5. Evaluación de la adhesión plaquetaria *in vitro* 28
2.2.3. Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de policaprolactona y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares. 28
2.2.3.1. Preparación de medios de cultivo 28
2.2.3.2. Determinación de la neutralización de los andamios biológicos 29
2.2.3.3. Determinación de la esterilidad de los andamios biológicos 29
2.2.3.4. Inhibición bacteriana 29
2.2.3.5. Análisis estadístico 30
CAPÍTULO III – RESULTADOS Y DISCUSIÓN 31
3.1. Análisis y discusión de resultados 31

3.1.1. Construcción de andamios biológicos de policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de microesferas. 31
3.1.1.1. Preparación de microesferas 31
3.1.1.2. Construcción de andamios a base de policaprolactona y quitosano. . 32
3.1.1.3. Formación de poros por lixiviación de microesferas 34
3.1.2. Evaluación de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos mediante pruebas hemostáticas. 35
3.1.2.1. Evaluación de coagulación *in vitro* 35
3.1.2.2. Evaluación de hemólisis *in vitro* 40
3.1.2.3. Evaluación de la adhesión de glóbulos rojos *in vitro* 42
3.1.2.4. Evaluación de la adhesión plaquetaria *in vitro* 45
3.1.3. Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de policaprolactona y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares. 47
3.1.3.1. Determinación de la neutralización de los andamios biológicos 47
3.1.3.2. Determinación de la esterilidad de los andamios biológicos 48
3.1.3.3. Inhibición bacteriana 50
CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 54
4.1. Conclusiones 54
4.2. Recomendaciones 55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56
ANEXOS 73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales factores de crecimiento asociados con la regeneración de tejido óseo. 9
Tabla 2. Composición de ABs por lixiviación de microesferas. 32
Tabla 3. Prueba de Dunn para comparación múltiple de rangos de hemólisis 42
Tabla 4. Prueba de Dunn para comparación múltiple de rangos de adhesión de glóbulos rojos 44
Tabla 5. Prueba de Dunn para comparación múltiple de rangos de adhesión plaquetaria. 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Proceso desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano 14
Figura 2 Reacciones de polimerización de la ϵ-caprolactona (CL) para la obtención de la poli(ϵ-caprolactona) (PCL)..... 16
Figura 3 Preparación del agente porógeno para la elaboración de ABs..... 32
Figura 4 ABs porogénicos elaborados mediante lixiviación de microesferas. 34
Figura 5 Impacto en la tonalidad de los ABs previo y posterior al proceso de lixiviación..... 35
Figura 6 Porcentaje de coagulación sanguínea en ABs con diferentes concentraciones de microesferas..... 37
Figura 7 Influencia de la concentración de microesferas en la funcionalidad de los ABs..... 38
Figura 8 Distribución del porcentaje de coagulación por concentración de microesferas. 39
Figura 9 Análisis de residuales para los valores de coagulación sanguines en ABs. 40
Figura 10 Porcentaje de hemolisis *in vitro* en ABs con diferentes concentrciones de microesferas. 41
Figura 11 Concentración de glóbulos rojos (mg/dl)..... 43
Figura 12 Adhesión plaquetaria *in vitro* medida por a partir de la liberación de LDH en ABs. 46
Figura 13 Evaluación de la inhibición antimicrobiana mediante el ensayo de resarzurina. 51
Figura 14 Prueba post hoc de Tukey..... 52
Figura 15 Comparación de la proliferación bacteriana (%) en andamios biológicos bajo diferentes condiciones de neutralización y esterilización. 52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Estandarización de ABs a placas de 96 pocillos 73
Anexo 2. Valores de absorbancia obtenidos para determinación del BCI. 73
Anexo 3. Media y desviación estándar del % BCI. 74
Anexo 4. Concentración hemolítica aplicada en ABs PCL/QS 25%, 50% y 75% de microesferas 74
Anexo 5. Valores de absorbancia obtenidos para determinación del % Hemolisis. .. 75
Anexo 6. Media y desviación estándar del % Hemólisis. 75
Anexo 7. Valores de absorbancia obtenidos para determinación del % Hemoglobina. 76
Anexo 8. Media y desviación estándar de la concentración de hemoglobina. 76
Anexo 9. Valores de absorbancias obtenidos del porcentaje de liberación de LDH.. 76
Anexo 10. Esterilización de ABs bajo 1h en luz UV. 77
Anexo 11. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de coagulación *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk. 77
Anexo 12. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de coagulación *in vitro* mediante la prueba de Levenne. 78
Anexo 13. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de hemólisis *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk. 78
Anexo 14. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de hemólisis *in vitro* mediante la prueba de Levenne. 79
Anexo 15. Estadística descriptiva para la prueba de Kruskal-Wallis en la aplicación del ensayo de hemólisis. 79
Anexo 16. Prueba de Kruskal-Wallis aplicad en el ensayo de hemolisis. 79
Anexo 17. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de adhesión de glóbulos *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk..... 80
Anexo 18. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de adhesión de glóbulos rojos *in vitro* mediante la prueba de Levenne. 80
Anexo 19. Estadística descriptiva para la prueba de Kruskal-Wallis en la aplicación del ensayo de adhesión de glóbulos rojos. 81
Anexo 20. Prueba de Kruskal-Wallis aplicad en el ensayo de adhesión de glóbulos rojos..... 81

Anexo 21. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de adhesión plaquetaria *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk 82
Anexo 22. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de adhesión de adhesión plaquetaria *in vitro* mediante la prueba de Levenne. 83
Anexo 23. Estadística descriptiva para la prueba de Kruskal-Wallis en la aplicación del ensayo de adhesión plaquetaria. 83
Anexo 24. Prueba de Kruskal-Wallis aplicad en el ensayo de adhesión plaquetaria. 84
Anexo 25. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de inhibición antimicrobiana mediante la prueba de Shapiro-Wilk..... 84
Anexo 26. Prueba de Homogeneidad mediate la prueba de Levenne aplicado al ensayo de inhibición antimicrobiana. 85
Anexo 27. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de inhibición antimicrobiana mediante la prueba de Levenne. 85
Anexo 28. Protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos CEISH-FCS-UTA 090-CEISH-UTA-2025, con código 090-CEISH-UTA-2025. 85

ÍNDICE DE ECUACIONES

(1) Indice de Coagulacion Sanguinea (BCI) 27
(2) Porcentaje de Hemólisis 27
(3) Concentración de hemoglobína 28
(4) Liberación de LDH 28

RESUMEN EJECUTIVO

Las enfermedades óseas como osteoporosis, osteomielitis y osteonecrosis representan un reto crucial en salud pública. En Ecuador, los tratamientos convencionales con autoinjertos y aloinjertos enfrentan problemas de disponibilidad. Durante 2023, únicamente 9.98 por ciento de los tejidos donados correspondieron a tejido óseo, y no existen estadísticas confiables sobre tasas de rechazo en pacientes. La ingeniería de tejidos surge como alternativa revolucionaria mediante biomateriales que estimulan la regeneración ósea sin requerir trasplantes. Esta investigación evalúa andamios fabricados con policaprolactona y quitosano, combinando polímeros sintéticos y naturales. La mezcla ofrece propiedades antibacterianas y hemocompatibles óptimas para promover adhesión, crecimiento y proliferación celular. Los ensayos in vitro analizarán parámetros fundamentales: índice de coagulación sanguínea, niveles de hemólisis, adhesión de eritrocitos y plaquetas, junto con capacidad antimicrobiana. Estos estudios determinarán la biocompatibilidad de los andamios al contacto con componentes sanguíneos. Los hallazgos proporcionarán evidencia científica sobre su eficacia para regeneración ósea, estableciendo bases para futuras investigaciones con cultivos celulares. Este proyecto supera las limitaciones de los métodos tradicionales al desarrollar soluciones innovadoras en medicina regenerativa. Los biomateriales estudiados podrían convertirse en una opción terapéutica accesible, segura y efectiva para pacientes con patologías óseas. Su implementación clínica potencial mejoraría significativamente la calidad de vida de numerosos pacientes, reduciendo la dependencia de trasplantes y minimizando riesgos asociados. La investigación no solo aborda un problema crítico de salud pública, sino que también posiciona a Ecuador en la vanguardia de desarrollos biotecnológicos aplicados a medicina regenerativa, con proyección internacional y potencial impacto social.

Palabras clave: Andamios biológicos, policaprolactona, quitosano, hemocompatibilidad, regeneración ósea.

ABSTRACT

Bone diseases such as osteoporosis, osteomyelitis, and osteonecrosis represent a crucial public health challenge. In Ecuador, conventional treatments with autografts and allografts face availability issues. In 2023, only 9.98 percent of donated tissue was bone, and there are no reliable statistics on patient rejection rates. Tissue engineering is emerging as a revolutionary alternative through biomaterials that stimulate bone regeneration without requiring transplants. This research evaluates scaffolds made with polycaprolactone and chitosan, combining synthetic and natural polymers. The mixture offers optimal antibacterial and hemocompatible properties to promote cell adhesion, growth, and proliferation. In vitro tests will analyze key parameters: blood coagulation index, hemolysis levels, red blood cell and platelet adhesion, along with antimicrobial capacity. These studies will determine the biocompatibility of the scaffolds in contact with blood components. The findings will provide scientific evidence of their efficacy for bone regeneration, laying the groundwork for future research using cell cultures. This project overcomes the limitations of traditional methods by developing innovative solutions in regenerative medicine. The biomaterials studied could become an accessible, safe, and effective therapeutic option for patients with bone pathologies. Their potential clinical implementation would significantly improve the quality of life of numerous patients, reducing dependence on transplants and minimizing associated risks. The research not only addresses a critical public health problem but also positions Ecuador at the forefront of biotechnological developments applied to regenerative medicine, with international reach and potential social impact.

Keywords: Biological scaffolds, polycaprolactone, chitosan, hemocompatibility, bone regeneration.

CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Planteamiento del problema y justificación

Las lesiones de tejido óseo actualmente se están convirtiendo en uno de los problemas de salud más frecuentes a nivel mundial. El tejido esquelético, en conjunto con el tejido muscular desempeñan un papel fundamental como estructura de soporte y protección de los órganos internos **(Grabska et al., 2020).** Estas lesiones pueden ser de carácter congénito o adquirido, entre las que destacan patologías como la osteoporosis, caracterizada por fracturas debido a la disminución de la masa ósea **(Long et al., 2023);** la osteomielitis, caracterizada por ser una infección inflamatoria progresiva que afecta tanto a la corteza como a la médula **ósea (Bizuneh et al., 2023);** la osteonecrosis, provocada por la muerte de osteocitos por falta de circulación sanguínea **(Ng et al., 2023),** entre otros.

En Ecuador, los métodos convencionales de reparación de tejido óseo se enfocan en autoinjertos y aloinjertos **(Velasco et al., 2023).** Según las estadísticas del Instituto Nacional de Donación y Trasplante Órganos, Tejidos y Células (INDOT), en 2023 hubo alrededor de 267 donantes, de los cuales se obtuvieron 561 tejidos, de ellos el 9.98% fue de tejido óseo **(INDOT, 2023).** No obstante, estos métodos convencionales presentan limitaciones en términos de resistencia, rigidez, integración, adaptabilidad a fuerza de cargas, rechazo inmunológico, entre otros **(Tabrizian et al., 2024).** La ingeniería de tejidos (IT) emerge como una alternativa de regeneración, ya que el desarrollo de sustitutos de soporte con biopolímeros naturales y sintéticos pretenden imitar la matriz extracelular (ECM) para la proliferación celular y regeneración del tejido. Esta alternativa, no solo reduce la utilización de trasplantes, sino que genera un entorno mecánico apropiado para adhesión, proliferación, diferenciación y metabolismo celular **(Ma et al., 2020).** El quitosano (QS) es un biopolímero natural con características hemocompatibles y antibacterianas, mientras que la policaprolactona (PCL), biopolímero sintético, destaca por su flexibilidad, biocompatibilidad y una tasa de degradación controlada. El QS y la PCL en conjunto

poseen propiedades complementarias que los hacen adecuados para la medicina regenerativa. No obstante, es esencial confirmar su viabilidad mediante ensayos biológicos que aseguren la biocompatibilidad, biodegradabilidad, esterilidad y proliferación celular.

En base a estos antecedentes, el presente estudio pretende evaluar las propiedades biológicas de andamios elaborados con QS y PCL mediante ensayos *in vitro* de hemocompatibilidad. En este sentido, se evaluarán parámetros clave, dentro de los cuales se incluyen la capacidad de coagulación, el grado de hemólisis, la adhesión eritrocitaria y plaquetaria, así como la actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos proporcionarán información fundamental para determinar la viabilidad de estos biomateriales en aplicaciones de ingeniería de tejidos, particularmente en futuros ensayos de cultivo celular.

1.1.2. Estructura y composición de tejido óseo

El tejido óseo es una especialización del tejido conectivo que posee células y una matriz extracelular, caracterizada por estar mineralizada o calcificada. Se trata de un tejido crucial no solo como soporte muscular y esquelético, sino también por sus diversas funciones fisiológicas, como la producción de sangre, el almacenamiento de minerales, la regulación del pH y la preservación de células progenitoras **(Kargozar et al., 2019).**

Estructuralmente, se distingue por la presencia de tejido laminar (cortical) y tejido esponjoso (trabecular). El tejido laminar es una matriz sólida de alta densidad y resistencia, con una microarquitectura definida por osteonas (canales de Havers), canales de Volkmann, lagunas y canalículos. Esta estructura confiere una porosidad aproximada del 10%, lo que le permite proteger al cuerpo contra impactos **(Khalaf et al., 2022).** Por su parte, el tejido esponjoso presenta una red trabecular de baja densidad, compuesta por placas delgadas interconectadas con espacios intertrabeculares, lo que genera una porosidad significativamente mayor ($50\% - 90\%$) **(Rezwan et al., 2006).**

Ambos tipos de tejido son fundamentales en el diseño de biomateriales, ya que combinan propiedades de resistencia y adaptabilidad. El hueso cortical, con su alta densidad, actúa como barrera para el crecimiento de vasos sanguíneos y la remodelación tisular, preservando la integridad estructural. En cambio, el hueso esponjoso, gracias a su porosidad, facilita una rápida vascularización y una remodelación más ágil **(Le et al., 2017).**

1.1.2.1. Matriz extracelular ósea

El hueso es un material compuesto cuya matriz extracelular se caracteriza por una organización compleja y jerárquica, compuesta por una combinación de minerales, colágeno, agua, lípidos y proteínas no colágenas. La proporción de estos componentes varía según el tipo y la localización del hueso, lo que determina sus propiedades funcionales y **mecánicas (Morgan & Gerstenfeld, 2021).** Desde el punto de vista estructural, la matriz ósea se divide en dos fases principales: la fase orgánica y la fase inorgánica.

La fase orgánica está compuesta principalmente por colágeno tipo I, la proteína estructural más abundante y relevante en el hueso. Esta molécula se organiza en forma de triple hélice dextrógira, constituida por tres cadenas polipeptídicas, que se alinean de forma escalonada para formar fibrillas delgadas. Estas fibrillas se agrupan posteriormente en fibras más grandes, generando espacios interfibrilares donde ocurre la mineralización ósea **(Selvaraj et al., 2024).** Además del colágeno, la fase orgánica contiene glucoproteínas y proteoglicanos como osteonectina (ON), osteocalcina (OC) y osteopontina (OP), así como glucosaminoglucanos. Estos componentes cumplen funciones fundamentales en la regulación de la mineralización, la adhesión celular y la modulación de las propiedades mecánicas del tejido óseo **(Alba et al., 2002).** Además, está formada por tres cadenas polipeptídicas que se enrollan en una triple hélice dextrógira, se alinean de manera escalonada, creando fibrillas delgadas que luego se agrupan en fibras más grandes. Entre estas fibrillas, existen espacios o poros que pueden albergar proteínas no colágenas o minerales, como los cristales de hidroxiapatita en los huesos que es la clave para la generación de tejido óseo **(Morgan & Gerstenfeld, 2021).**

La fase inorgánica está compuesta principalmente por cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que se generan a partir de la combinación de fosfato y carbonato de calcio, e incorporan durante su cristalización iones como magnesio, fluoruro y sulfato. Estos cristales se depositan de forma ordenada en los espacios interfibrilares del colágeno tipo I, proporcionando rigidez y resistencia a la compresión **(Burr, 2019).** Esta organización nanocompuesta permite al hueso cumplir simultáneamente funciones mecánicas como soporte y protección y funciones metabólicas como el almacenamiento de minerales y la participación en la homeostasis del calcio. Además, esta arquitectura favorece la remodelación continua del tejido, un proceso regulado por la actividad celular coordinada de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos embebidos en la matriz mineralizada **(Von Euw et al., 2019).**

En términos de peso, aproximadamente el 60 % de la matriz corresponde a la fase inorgánica, el 30 % a la fase orgánica, y el 10 % restante a agua. Por volumen, estas proporciones son cercanas al $40\ \%, 25\ \%\ y\ 35\ \%$, respectivamente **(Morgan & Gerstenfeld, 2021).** Esta distribución refleja un diseño biomecánico eficiente, donde la fase mineral confiere rigidez y resistencia a la compresión, la fase orgánica proporciona flexibilidad y tenacidad, y el agua facilita la difusión de nutrientes y la lubricación molecular.

1.1.2.2. Células de tejido óseo

El metabolismo óseo constituye un proceso dinámico finamente regulado por señales ambientales de naturaleza química, mecánica y eléctrica. Estas señales modulan directamente el microambiente óseo, coordinando el equilibrio entre la formación de nuevo tejido y la reabsorción del hueso antiguo mediante la interacción de poblaciones celulares especializadas. Este mecanismo de remodelación constante resulta fundamental para mantener la homeostasis ósea y adaptar la estructura esquelética a las demandas fisiológicas del organismo. Existe tres tipos celulares principales que regulan este proceso: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos **(Kenkre & Bassett, 2018).**

Los osteoblastos son células especializadas derivadas de progenitores mesenquimales, cuya función principal es la síntesis y secreción de la matriz orgánica del hueso, denominada osteoide. Esta matriz constituye el andamiaje inicial sobre el cual ocurre la mineralización del tejido óseo, proceso en el que se depositan sales de calcio y fósforo que se transforman en cristales de hidroxiapatita, confiriendo rigidez y resistencia al hueso **(Isojima & Sims, 2021).** Debido a su alta actividad biosintética, los osteoblastos expresan marcadores específicos como la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, cuyos niveles en sangre se **(Mizoguchi & Ono, 2021).**

La diferenciación de los osteoblastos está finamente regulada por mecanismos genéticos y moleculares. Entre los principales factores de transcripción involucrados se encuentran RUNX2 y OSX, esenciales para la progresión del linaje osteogénico. Asimismo, rutas de señalización como la mediada por proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y la vía Wnt desempeñan un papel clave en la regulación de la maduración osteoblástica **(Mizoguchi & Ono, 2021).** Una vez completada su función de formación de matriz ósea, los osteoblastos pueden seguir tres destinos celulares distintos: diferenciarse en osteocitos al quedar completamente incorporados en la matriz mineralizada; transformarse en células de recubrimiento óseo que regulan el intercambio iónico en la superficie del hueso; o entrar en apoptosis como mecanismo de recambio celular **(Mizoguchi & Ono, 2021).**

Por otro lado, los osteocitos son células altamente especializadas que se localizan dentro de la matriz ósea mineralizada, en cavidades denominadas lagunas. Desde estas lagunas, los osteocitos extienden prolongaciones citoplasmáticas delgadas a través de canalículos, formando una red interconectada que permite la comunicación intercelular y el intercambio de nutrientes, señales bioquímicas y productos de desecho con otras células óseas **(Tresguerres et al., 2020).** Esta red canalicular constituye un sistema funcional clave para el mantenimiento del tejido óseo.

Su función principal es actuar como sensores mecánicos, capaces de detectar cambios en las cargas mecánicas del hueso y traducir estas señales físicas en respuestas bioquímicas. De esta manera, los osteocitos regulan la actividad de los osteoblastos (formadores de hueso) y osteoclastos (resorbentes de hueso), modulando

dinámicamente el equilibrio entre formación y resorción ósea **(Bonewald & Johnson, 2008).** Esta regulación se lleva a cabo mediante la secreción de moléculas clave como la esclerostina, un potente inhibidor de la osteogénesis, y a través del sistema RANKL/OPG, el cual controla la diferenciación y activación de osteoclastos **(Nijweide et al., 2002).**

Por su parte, los osteoclastos son células multinucleadas responsables de la resorción ósea. Estas células desempeñan un papel fundamental tanto en el modelado óseo, que da forma al esqueleto durante el crecimiento, como en el remodelado óseo, que mantiene la integridad del hueso en el adulto **(Kenkre & Bassett, 2018).** Los osteoclastos maduros presentan estructuras especializadas como la zona de sellado y el borde rugoso, que les permiten adherirse firmemente a la superficie del hueso, acidificar el microambiente local y degradar la matriz ósea mineralizada.

La diferenciación y activación de los osteoclastos están reguladas por señales provenientes de otras células óseas, particularmente por el ligando RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), ambos secretados por osteoblastos y osteocitos. Alteraciones en estos mecanismos pueden conducir a enfermedades óseas metabólicas, como la osteoporosis, caracterizadas por un desbalance entre resorción y formación ósea **(Aubin & Triffitt, 2002).**

1.1.3. Ingeniería de tejido óseo

La IT emergió como disciplina científica en la década de 1970, a partir de investigaciones pioneras en sistemas de liberación controlada de fármacos mediante polímeros para modular procesos tumorales (Langer y Folkman). En los años 80, se establecieron modelos experimentales basados en cultivos celulares sobre matrices artificiales, lo que permitió estudiar sistemáticamente las interacciones célula-material y los mecanismos de proliferación tisular **(Boer & Blittersmijk, 2023).** Estos avances consolidaron un marco conceptual integrador, uniendo áreas de investigación previamente disociadas y sentando las bases de un campo inherentemente multidisciplinario. Desde sus inicios, la IT ha estado impulsada por demandas clínicas

no resueltas, orientando la investigación hacia el desarrollo de biomateriales, estrategias de biofabricación y sistemas celulares funcionales, ya sea en configuraciones autólogas o combinatorias **(Ospina et al., 2023).**

El desarrollo de la ingeniería de tejido óseo (ITO) representa la convergencia de principios de ingeniería, ciencia de biomateriales y modulación bioquímica para optimizar procesos biológicos **(Martin & Martin, 2019)**. Este enfoque constituye un paradigma de innovación biomédica, donde la sinergia entre biología, ciencia de materiales e ingeniería aborda necesidades médicas insatisfechas. La ITO ha establecido estrategias viables y reproducibles para la formación ósea, con el objetivo de mejorar la calidad de vida en pacientes con enfermedades o defectos óseos **(Ochoa et al., 2015).** En el marco de la medicina regenerativa, la ITO busca cultivar células en matrices tridimensionales mediante la aplicación de factores de crecimiento, creando condiciones óptimas que estimulen la regeneración del tejido en áreas afectadas **(Zenebe, 2022).**

1.1.3.1. Células empleadas para ingeniería de tejidos

La regeneración eficaz del tejido óseo mediante estrategias de ingeniería tisular depende de la interacción coordinada entre células progenitoras osteogénicas, factores bioactivos osteoinductores y matrices biocompatibles **(Gou et al., 2024).** Entre las fuentes celulares más prometedoras destacan las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), debido a su capacidad de autorrenovación, multipotencialidad y potencial de diferenciación osteogénica, lo que las convierte en una herramienta clave para la reparación de defectos óseos **(Seong et al., 2010).**

Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSC, por sus siglas en inglés) representan una población heterogénea con elevada capacidad proliferativa y de diferenciación osteoblástica **(Gao et al., 2024).** Su potencial osteogénico las hace particularmente útiles en la regeneración de tejido óseo, ya que expresan marcadores como RUNX2, osteocalcina y fosfatasa alcalina (ALP), esenciales para la formación de matriz ósea mineralizada.

Por otro lado, las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC, por sus siglas en ingles), aunque fenotípicamente similares a las BMSC, ofrecen ventajas prácticas debido a su accesibilidad y alta tasa de proliferación, independientemente de la edad del donante **(Gao et al., 2024).** Estas células mantienen su capacidad osteogénica incluso después de la implantación, diferenciándose en osteoblastos funcionales y contribuyendo a la reparación ósea. Además, su adaptabilidad a microambientes tisulares las convierte en una alternativa viable para aplicaciones clínicas en defectos óseos **(Xue et al., 2022)**. Sin embargo, el envejecimiento afecta su eficacia en terapia celular autólogas en pacientes de edad avanzada **(Zhou et al., 2019).** A pesar de esto, las ADSC presentan un fenotipo reproducible y consistente, respaldado por su rendimiento celular, viabilidad, capacidad de diferenciación adipogénica y expresión de marcadores de superficie **(Xue et al., 2022).**

En comparación con las BMSC, las ADSC destacan por su reproducibilidad, facilidad de aislamiento, abundancia relativa, rápida expansión en cultivo, capacidad de criopreservación y consistencia fenotípica, lo que las posiciona como un modelo preferencial en ingeniería de tejidos óseos **(Aust et al., 2004).**

1.1.3.2. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos que cumplen con su labor biológica al llegar y retenerse en la matriz ósea, actúa a manera de mitógeno ya que ayuda a promover la proliferación, la migración y la diferenciación de células al unirse a receptores transmembrana específicos en las células **(Wang et al., 2017).** Estos se clasifican endógenos y exógenos, según se su origen de producción, ya sea dentro del propio tejido óseo o fuera con fines terapéuticos, respectivamente. Los endógenos, como las BMP-2/7, TGF-β, PDGF e IGF, constituyen un sistema de señalización intrínseco que se activa tras una lesión, regulando secuencialmente la inflamación, angiogénesis y formación de matriz ósea **(Sun et al., 2023).** Su producción está finamente controlada por el microambiente local, destacando las BMPs por su capacidad osteoinductiva, descubierta en estudios con matriz ósea desmineralizada **(Amini et al., 2012).**

Para casos donde la respuesta endógena es insuficiente, se emplean factores exógenos recombinantes, como la rhBMP-2 y el PDGF (únicos aprobados por la Food and Drug Administration, FDA). La rhBMP-2 induce diferenciación osteogénica, mientras el PDGF estimula proliferación celular. Sin embargo, su uso enfrenta desafíos: alto costo, necesidad de sistemas de liberación controlada (ej. microesferas) y riesgos como formación ósea ectópica en dosis elevadas. Además, proteínas de la matriz ósea (osteonectina, sialoproteína, etc.) contribuyen a la regulación celular, aunque en concentraciones mínimas **(Dang et al., 2018; Oliveira et al., 2021).** Dentro de la siguiente tabla se representan las funciones de los principales factores de crecimiento antes mencionados:

Tabla 1. Principales factores de crecimiento asociados con la regeneración de tejido óseo.

Factor	Función	Referencia
Factor de crecimiento de fibroblastos (FCF)	Modula actividades celulares como la proliferación, migración y diferenciación al interactuar con receptores de membrana específicos en las células.	**Wang et al., 2017)**
Factor de crecimiento de derivados de plaquetas (PDGF)	Desempeña su función en el proceso de cicatrización y regeneración de tejido. Al ser una proteína presente en los gránulos de las plaquetas, se libera durante la coagulación, promoviendo diversas respuestas celulares que facilitan la curación de los tejidos.	**(Jia et al., 2024)**
Factores de crecimiento similar a la insulina (IGF)	Fundamental en la reparación del tejido óseo mediante la estimulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos. Promueve la síntesis de colágeno y regula el equilibrio entre formación y resorción ósea. Además, favorece la angiogénesis, asegurando un adecuado suministro de nutrientes.	**(Beattie et al., 2018)**

Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β)	Cumple un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de tejido óseo. Además, ayuda a mantener el equilibrio entre los procesos dinámicos de resorción y formación óseas	**Janssens et al., 2005)**
Proteínas morfogénicas óseas (BMPs)	Participa en el proceso de osteogénesis ya que promueve la diferenciación de CMM en osteoblastos.	**(Lademann et al., 2020)**

1.1.3.3. Andamios Biológicos

A partir de la IT que establece una combinación de estrategias para el diseño y formación de biomateriales que facilitan el proceso de regeneración ósea. Los biomateriales diseñados como soportes de crecimiento celular, conocidos como andamios biológicos (ABs), representan estructuras tridimensionales que imitan la matriz extracelular del tejido óseo, favoreciendo su regeneración **(Black et al., 2015).** Su diseño depende de la aplicación específica: en tejidos blandos (piel, ligamentos) se priorizan la flexibilidad y la integración, mientras que en tejidos duros (huesos, dientes), como es el caso de este estudio, se enfatiza la rigidez y la bioactividad **(Xu et al., 2024).**

Estos ABs deben cumplir con propiedades físicas y biológicas clave, como promover la proliferación celular, la diferenciación tisular y optimizar las propiedades mecánicas. Para ello, se fabrican a partir de biopolímeros naturales o sintéticos que les confieren dureza, rugosidad y una biodegradabilidad controlada, asegurando su funcionalidad durante el proceso de regeneración **(Zhang et al., 2017).**

La efectividad de los ABs para la regeneración del tejido óseo depende en gran medida de su elaboración, utilizando biomateriales que posean características biodegradables, biocompatibles y una porosidad adecuada para alojar las células óseas recién formadas. En este sentido, los biomateriales deben exhibir propiedades que fomenten la proliferación celular, la diferenciación tisular y la optimización de las propiedades mecánicas. Su efectividad depende de tres factores esenciales:

La biodegradabilidad juega un papel crucial al mantener una estabilidad equilibrada entre el sistema biológico y el biomaterial, requiriendo un diseño que considere la cinética de degradación al ritmo natural de formación del nuevo tejido **(Tajvar et al., 2023).** Este equilibrio es crucial para la reabsorción del material, ya que una velocidad acelerada puede comprometer el soporte estructural, mientras que una degradación lenta podría desencadenar respuestas inflamatorias **(Williams, 2008).**

Cuando un andamio se implanta, desencadena una serie de reacciones biológicas que incluyen la adsorción de proteínas, efectos citotóxicos potenciales, cambios microvasculares, activación de la coagulación y respuestas inmunes. Estos fenómenos deben modularse para evitar complicaciones como inflamación crónica o rechazo. En el contexto de la ingeniería de tejidos óseos, los materiales ideales deben equilibrar propiedades mecánicas clave (resistencia a la fatiga, tenacidad y resistencia al desgaste) con una degradación controlada que minimice la liberación de partículas o subproductos nocivos **(Bose et al., 2012).**

Por lo tanto, es fundamental que la degradación de los andamios biológicos sea controlada de manera gradual, permitiendo que las células óseas depositen matriz extracelular a medida que el andamio se reabsorbe, asegurando así que las propiedades mecánicas del tejido se mantengan durante el proceso de curación. Esta doble exigencia busca garantizar que el material, a medida que se reabsorbe, continúe proporcionando el soporte estructural necesario para la formación del nuevo tejido óseo sin desencadenar respuestas adversas. La evaluación rigurosa a través de ensayos *in vitro* (en medios fisiológicos simulados) e *in vivo* (en modelos animales) no solo permite caracterizar la cinética de degradación, sino también evaluar su biocompatibilidad y capacidad osteoconductiva **(Raeisdasteh et al., 2017).** El tamaño y la geometría de los poros en los andamios óseos determinan su interconectividad, factor crucial para la regeneración tisular. En el tejido óseo, una red porosa interconectada favorece procesos biológicos esenciales como la proliferación celular, migración, osteoconducción y osteogénesis **(Cheng et al., 2019).**

Esta necesidad de porosidad elevada entra en conflicto con las propiedades mecánicas del andamio, ya que existe una relación inversa entre el porcentaje de poros y la resistencia a compresión. El desafío de diseño radica en equilibrar la microarquitectura porosa (que favorece la regeneración) con la suficiente rigidez para soportar cargas fisiológicas **(Loh & Choong, 2013)**. Además, la distribución y morfología de los poros influyen en la cinética de degradación del material, que debe coordinarse con la velocidad de formación de tejido nuevo para evitar fallos estructurales prematuras. Por ello, los andamios más eficaces suelen presentar alta porosidad $(60 - 90\%)$ con microtúbulos interconectados y orientados, solución que combina permeabilidad biológica con integridad mecánica **(Abbasi et al., 2020).**

Por otro lado, la biocompatibilidad permite mantener un control de las reacciones inmunológicas que podrían causar la muerte celular. La estructura del andamio influirá en el entorno, permitiendo que las células se adhieran, proliferen y se diferencien adecuadamente **(Kargozar et al., 2019).**

1.1.4. Biomateriales para andamios de tejido óseo

1.1.4.1. Biopolímeros naturales

Se componen de enormes estructuras moleculares que resultan de la combinación de unidades menores de origen vegetal, animal o microorganismos, son fundamentales en la creación de materiales biomédicos debido a su capacidad de almacenar, sostener y transmitir información **(Wróblewska et al., 2019)**. Los biopolímeros naturales han ganado importancia en las últimas décadas como sustancias bioactivas esenciales en el desarrollo de biomateriales, clasificándose en tres categorías principales: biopolímeros de base polipeptídica y proteica (colágeno y gelatina), biopolímeros de base polisacárida (quitina y ácido hialurónico), y biopolímeros de base polinucleotídica **(Reddy et al., 2021).** Su estructura, formada por largas cadenas de nucleótidos, aminoácidos o monosacáridos, les confiere propiedades vitales como bioactividad, biocompatibilidad y biomimética.

Generalmente este tipo de biopolímeros presenta una naturaleza acida o neutra debido a la presencia de grupos funcionales como carboxilo ($-COOH$) o sulfato ($-SO_3H$), los cuales tienen la capacidad de ionizarse en soluciones acuosas generando cargas negativas. Como resultado, se liberan protones (H^+), lo que influye en el pH del entorno donde se encuentra el andamio. Esta característica influye directamente en el desempeño del biomaterial, ya que un pH ligeramente acido interfiere en la adhesión proliferación celular. Por ejemplo, las células de tejido óseo como los osteoblastos, requieren de un entorno ligeramente alcalino para su funcionamiento. Así mismo, en un entorno ácido también puede afectar procesos como la mineralización y formación de hidroxiapatita **(Flórez et al., 2023).**

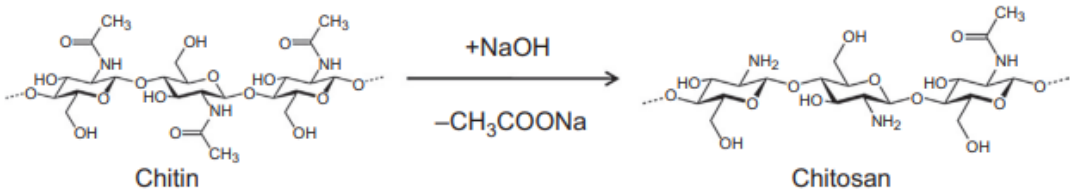
A pesar de sus ventajas, como la capacidad de mejorar terapias médicas y su uso en andamiajes para la administración de agentes terapéuticos, enfrentan desventajas que limitan su aplicación en la ingeniería de tejidos, tales como la contaminación microbiana, reacciones inmunogénicas y baja resistencia mecánica **(Satchanska et al., 2024)**. Entre los biopolímeros más destacados en el ámbito biomédico se encuentran el colágeno, el quitosano, la gelatina, el fibrinógeno y el hialuronato, los cuales están demostrando un notable potencial en la regeneración de tejidos.

1.1.4.1.1. Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal derivado de la quitina, obtenido comúnmente de fuentes como los exoesqueletos de crustáceos. Su estructura química incluye grupos amino e hidroxilo los cuales permiten su modificación para mejorar propiedades como la solubilidad y la adhesión celular **(Kluczka, 2023)**. Ha demostrado ser un material versátil con múltiples aplicaciones comerciales y biomédicas, especialmente debido a su capacidad para coagular rápidamente la sangre, lo que le ha valido, recientemente, la aprobación en EE. UU. y Europa para su uso en vendajes y agentes hemostáticos, logrando una supervivencia del 100% en heridas arteriales en modelos porcinos **(Oryan et al., 2014)**. Además, sus propiedades mucoadhesivas y reactivas del QS permiten su uso en la administración transdérmica de fármacos, dado que, al ser clasificado como un polímero catiónico, se solubiliza en entornos ácidos, facilitando así la liberación controlada del medicamento en el sitio deseado **(Aranaz et al., 2021).**

En cuanto a sus propiedades físicas, se ha demostrado que cuenta con una alta capacidad de resistencia mecánica. Así mismo, a nivel biológico su propiedad de biocompatibilidad le permite que sea degradado de forma segura en con el cuerpo sin provocar inflamación significativa **(Mawazi et al., 2024).**

Figura 1
Proceso desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano



Nota. Obtenido de **(Sivashankari & Prabaharan, 2017).**

1.1.4.2. Biopolímeros sintéticos

Estos compuestos corresponden a estructuras macromoleculares sintéticas diseñadas mediante estrategias de biomimetismo molecular, las cuales replican las características fisicoquímicas y funcionales de los biopolímeros endógenos. Su síntesis se realiza mediante polimerización controlada de monómeros de origen natural, conservando así su biocompatibilidad intrínseca. Una propiedad destacable es su capacidad de degradación enzimática o hidrolítica programada, lo que las hace particularmente valiosas para aplicaciones biomédicas avanzadas. Entre sus usos más relevantes se incluye la fabricación de andamiajes tridimensionales para ingeniería tisular, donde actúan como sustratos temporales que favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación celular **(Iqbal et al., 2018).**

Adicionalmente, presentan ventajas comparativas en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos y en la elaboración de implantes ortopédicos reabsorbibles, debido a su perfil de biodegradabilidad ajustable y sus propiedades mecánicas modificables. Sin embargo, en la mayoría de los polímeros sintéticos, las fibras naturales se degradan bajo la influencia del medio ambiente, incluyendo el aire, la luz, el calor y los microorganismos **(Flórez et al., 2023).** Así mismo, a pesar de

tener características mecánicas y fisicoquímicas similares a los tejidos biológicos, carecen de sitios de adhesión celular, es por ello que necesitan modificaciones químicas para equilibrar esta adhesión **(Reddy et al., 2021).**

1.1.4.2.1. Policaprolactona

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático sintético que se obtiene mediante la polimerización por apertura de anillo de la ε-caprolactona. A nivel molecular, se trata de un biopolímero semicristalino con una estructura que le otorga propiedades mecánicas destacables, como alta flexibilidad y resistencia a la tracción, superiores a las de otros poliésteres biodegradables. Presenta una temperatura de fusión entre $59 - 64\,°C$ y una transición vítrea cercana a $-60\,°C$, lo que le confiere alta tenacidad **(Prieto & Guelcher, 2014a)**. Además, posee una biocompatibilidad excepcional, evidenciada por su baja citotoxicidad y una respuesta inflamatoria mínima *in vivo*. Su degradabilidad es controlable, pudiendo variar desde unos pocos meses hasta varios años, dependiendo de su peso molecular y del entorno en el que se encuentre ambientales **(Paterson et al., 2024).** No obstante, su naturaleza hidrofóbica y la carencia de grupos funcionales activos limitan su bioactividad intrínseca, lo cual representa una desventaja en aplicaciones como la regeneración ósea, donde se requiere una mayor interacción con las células **(Dwivedi et al., 2020).**

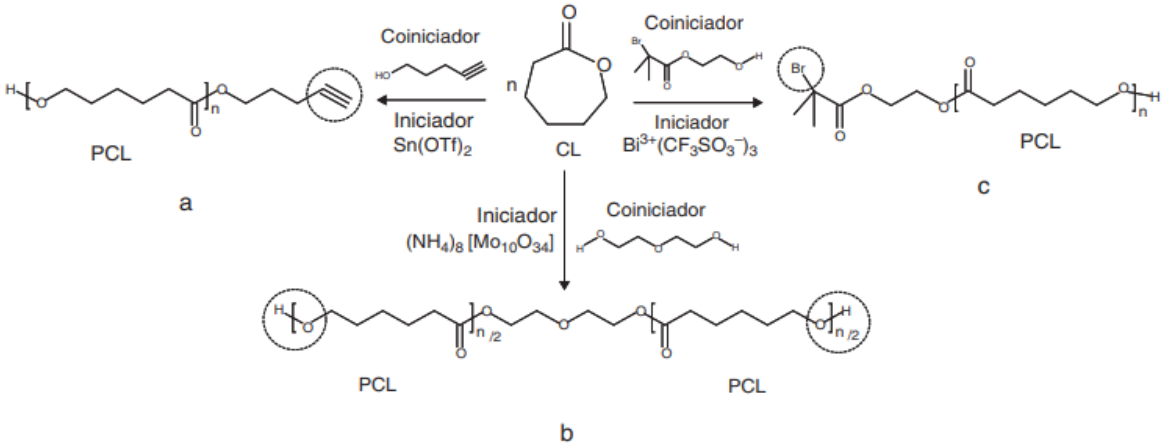
La funcionalización de la PCL permite la incorporación de diversos grupos terminales, los cuales influyen significativamente en las propiedades del polímero. Algunos ejemplos incluyen el grupo alquino y halogenuros de alquilo, útiles en la síntesis de copolímeros dibloque con aplicaciones en sistemas de administración de fármacos. Además, el grupo diol, al facilitar la formación de poliuretanos, aporta elasticidad y durabilidad al material (**Figura 2**) **(Báez, 2016).**

En los últimos años, la PCL ha cobrado especial relevancia en el campo de la ingeniería de tejidos, gracias a su capacidad para combinarse con otros biopolímeros como quitosano (QS), ácido poliláctico (PLA), entre otros **(Díaz et al., 2014).** Estas combinaciones han demostrado ser altamente efectivas al mejorar la bioactividad, osteoconductividad y resistencia mecánica de los andamios utilizados en la

regeneración de tejido óseo. La lenta tasa de degradación de la PCL conserva la integridad estructural del andamio durante el proceso de regeneración, facilitando así la formación de nuevo tejido **(Sethu et al., 2017)**. La capacidad de modificación de la PCL no solo amplía el rango de propiedades, sino que también fomenta la innovación de nuevos biomateriales. Su uso se ha extendido exitosamente a la regeneración de tejidos vasculares, cutáneos y cardíacos, lo que subraya su versatilidad y utilidad en el campo biomédico **(Inchingolo et al., 2024).**

Figura 2

Reacciones de polimerización de la ϵ-caprolactona (CL) para la obtención de la poli(ϵ-caprolactona) (PCL)



Nota. La PCL se obtiene a través de varias vías de polimerización por apertura de anillo (ROP), utilizando el monómero ε-caprolactona (CL). Este proceso requiere un iniciador y un coiniciador, que comúnmente es un alcohol primario **(Báez, 2016).**

1.1.4.3. Porógenos

Los porógenos son agentes fundamentales en la fabricación de andamios para ingeniería de tejidos, ya que su principal función es crear estructuras porosas que faciliten la migración celular, la vascularización y el intercambio de nutrientes **(Ruiz et al., 2021).** Estos materiales, que pueden incluir polímeros, gelatinas, sales o azúcares, y se eligen por su capacidad para disolverse tras la solidificación del andamio, dejando una red interconectada de poros **(Prieto & Guelcher, 2014)**. Una de las ventajas del uso de porógenos es el control de características como la porosidad,

cuyo rango ideal para fomentar un entorno que promueva la adhesión y proliferación celular oscila entre $100 - 500\ \mu m$ **(Ruiz et al., 2021).**

Una de las técnicas más utilizadas para eliminar estos porógenos es la lixiviación, ya que permite la obtener estructuras tridimensionales con propiedades mecánicas adecuadas y superficies bioactivas **(Effendi & Gustiono, 2020)**. Sin embargo, esta técnica también no está exenta de limitaciones; entre ellas destaca, el riesgo de disolución incompleta que podría comprometer la viabilidad celular. A pesar de ello, cuando el diseño del andamio logra equilibrar porosidad y bioactividad, se obtienen matrices altamente biocompatibles y osteoconductoras. Estas propiedades no solo mejoran la integración celular, sino también pueden inducir la formación de tejido óseo, lo que resulta esencial para aplicaciones clínicas en regeneración ósea y reparación de tejidos **(Effendi & Gustiono, 2020).**

Entre los porógenos más utilizados destaca la gelatina, un polímero natural derivado del colágeno. Su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, facilidad de manipulación y baja inmunogenicidad la convierten en un material ideal, tanto para sistemas de liberación controlada de fármacos como para el desarrollo de andamios tridimensionales **(Long et al., 2023)**. No obstante, presenta desventajas, como su sensibilidad térmica, ya que posee un punto de fusión de aproximadamente $30 \pm 2\ °C$ **(Santos et al., 2021)**. Además, su aplicación a escala industrial requiere la eliminación completa de los residuos del porógeno, ya que su permanencia podría generar toxicidad en los tejidos. A pesar de estos desafíos, el uso de porógenos permite obtener una distribución de poros uniforme y bien definida, aunque demanda un paso adicional para su eliminación, como ocurre en la técnica de lixiviación térmica **(Dong et al., 2021).**

1.1.5. Propiedades de los andamios biológicos

Los andamios para regeneración ósea deben cumplir con propiedades morfológicas, mecánicas y biológicas óptimas para garantizar su efectividad en la adhesión celular y la integración tisular **(Liu et al., 2020).** Entre los parámetros clave se encuentran la

porosidad, la resistencia a la tracción y la biodegradabilidad, los cuales han sido previamente evaluados en andamios de QS y PCL **(Freire, 2024).** Sin embargo, además de estas características, es esencial evaluar las propiedades biológicas, como la hemostasia, la hemólisis, la adhesión celular y la actividad antimicrobiana, para asegurar su biocompatibilidad y funcionalidad en aplicaciones clínicas.

La hemostasia es un proceso que consta de tres fases: activación de la coagulación, inhibición de la coagulación y fibrinolisis **(Rodriguez et al., 2019).** La fibrina, la principal proteína en la formación de coágulo, ayuda en la curación de heridas, pero en exceso puede obstruir el transporte de nutrientes y la oxigenación en los andamios. Según la norma **ISO 10993-4:2017** los ensayos de coagulación evalúan la variabilidad en los niveles sanguíneos de proteínas que conducen a la formación de trombina y fibrina **(International Organization for Standardization, 2017).**

La hemólisis es un proceso de descomposición glóbulos rojos que liberan su contenido intracelular en el plasma sanguíneo. Durante este proceso, la hemoglobina se degrada en sus componentes estructurales: el grupo hemo, encargado de transportar el oxígeno y la globina, que no solo proporciona un entorno protector y funcional, sino que facilita la unión reversible del oxígeno y el dióxido de carbono **(Ahmed et al., 2020).** Según la norma **ISO 10993-4:2017** la hemólisis es un indicativo que mide la biocompatibilidad de un material, ya que cuantifica el efecto hemolítico en función del tiempo de exposición sanguínea a las propiedades morfológicas del material **(International Organization for Standardization, 2017).**

La importancia de los ensayos de adhesión de glóbulos rojos a la superficie del biomaterial juega un papel importante en la evaluación de la hemólisis, ya que su medición y control aseguran que el diseño de los andamios cumpla con condiciones óptimas para el cultivo celular. El nivel de adherencia no solo influye en la integración de los biomateriales con el sistema circulatorio, si no también permite la interacción efectiva con células, plaquetas y factores de crecimiento **(Biranje et al., 2020).**

Los trombocitos o plaquetas son cuerpos celulares presentes en la sangre y actúan en las etapas iniciales de la hemostasia. Su evaluación influye en las propiedades de

porosidad, cargas superficiales, hidrofobicidad y sobre todo en la liberación de factores de crecimiento **(Jimenez et al., 2022)**. De acuerdo con la norma **ISO 10993-4:2017,** su evaluación es necesaria para garantizar que el material no introduzca respuesta trombogénica o inflamación excesiva **(International Organization for Standardization, 2017).**

La neutralización es un proceso químico donde una base reacciona con grupos ácidos residuales para alcanzar pH fisiológico **(Zarur et al., 2023).** En ingeniería de tejidos, este proceso no solo ajusta el pH sino que estabiliza la estructura del andamio mejorando la resistencia mecánica **(Azueta et al., 2022)**. Se verificará mediante lavados con agua/PBS hasta obtener pH neutro, eliminando tanto el exceso de base como subproductos iónicos que podrían afectar la proliferación celular **(Jimenez et al., 2022).**

Los ensayos de esterilización es un proceso mediante el cual los biomateriales se encuentran libre de contaminantes microbiológicos para garantizar la seguridad y funcionalidad de crecimiento y proliferación celular. El objetivo de este ensayo es mantener las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas del biomaterial sin afectar su estructura biodegradable **(Francisco et al., 2021).**

1.1.6. Métodos de fabricación de andamios biológicos

Dado que los ABs pueden ser útiles en la regeneración de diversos tejidos, la ingeniería de tejidos exige un enfoque multidisciplinario. En este contexto, el método de elaboración no solo involucra la morfología externa, sino también la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la capacidad de crear un microambiente adecuado para la proliferación celular.

1.1.6.1. Liofilización

Entre los métodos más utilizados se encuentra la liofilización o secado por congelación, que aprovecha el proceso de sublimación al congelar una solución de

biopolímeros. Durante este proceso, la formación de pequeños cristales de hielo subyacentes da lugar a una estructura porosa e interconectada **(Singh & Dasgupta, 2022).** Esta técnica se emplea especialmente con biopolímeros naturales, como el quitosano y el colágeno, ya que genera una estructura altamente porosa que favorece el intercambio de nutrientes. Sin embargo, una de sus principales limitaciones radica en la dificultad para regular el tamaño y la distribución de los poros, ya que estos dependen directamente de la formación de cristales de hielo durante la congelación **(Eltom et al., 2019).**

1.1.6.2. Electrospray

Por otro lado, la técnica del electrospray se trata de un proceso electrodinámico basado en la creación de micropartículas esféricas, donde el equilibrio entre fuerzas de tensión superficial y cargas electrostáticas genera una ruptura del flujo continuo **(Zakeri et al., 2019).** Puede verse influenciado a diversos parámetros como la intensidad del campo electrostático, velocidad de flujo, conductividad, tamaño de aguja, propiedades fisicoquímicas del biopolímero y la concentración **(Tasci et al., 2021).** Por ello la variación de los mismos permite mantener un control en el tamaño y morfología de las micropartículas fabricación de micropartículas. Además, propiedades como la densidad, el caudal y la viscosidad influyen directamente en el diámetro de las partículas: a mayor viscosidad o caudal, se obtienen partículas de mayor tamaño **(Ardila et al., 2018).**

1.1.6.3. Electrohilado

La técnica del electrohilado se trata de un proceso electrohidrodinámico que relaciona fuerzas electrostáticas que expanden fibras a partir de soluciones poliméricas. En el campo de la ingeniería de tejidos, ofrece una resolución estructural a nanoescala, donde se produce fibras que pueden imitar la topografía de la ECM. Uno de los aspectos importantes de este método es el voltaje que se maneja, pues para expandir el polímero hacia la formación de fibras se requiere de un alto voltaje para la solución principal sea cargada entre dos conductores capaces de soportar cargas electromagnéticas de polaridades opuestas. A nivel laboratorio, constan de

componentes como una fuente Ambos tipos de tejido son fundamentales en el diseño de biomateriales, ya que combinan propiedades de resistencia y adaptabilidad **(Sabino et al., 2017)**. El hueso cortical, con su alta densidad, actúa como barrera para el crecimiento de vasos sanguíneos y la remodelación tisular, preservando la integridad estructural. En cambio, el hueso esponjoso, gracias a su porosidad, facilita una rápida vascularización y una remodelación más ágil de alimentación continua o alterna de alto voltaje, una bomba de jeringa, un capilar mecánico o boquilla metálica, una placa o colector conectado a tierra. La fuente crea un campo eléctrico que interactúa con la solución de polímero, formando un chorro que se estira y se rompe en ramas más pequeñas. Este proceso promueve el estiramiento y la evaporación del solvente, depositando finalmente las fibras en el colector, que pueden formar una membrana no tejida **(Forgie et al., 2023).**

1.1.6.4. Impresión 3D

La impresión 3D se ha posicionado como una tecnología esencial en la ingeniería de tejido óseo debido a su capacidad para diseñar andamios personalizados con geometrías y microestructuras precisas. Esto permite imitar la complejidad del hueso natural, favoreciendo la integración celular y la reparación de defectos **(Wang et al., 2020).** Sin embargo, el éxito de estos implantes depende críticamente del desarrollo de biotintas avanzadas, las cuales deben combinar propiedades mecánicas adecuadas con biocompatibilidad **(Zhang et al., 2019)**. Para ello, una estrategia clave es la combinación de polímeros naturales y sintéticos, ya que así se logra un equilibrio entre resistencia, funcionalidad biológica y degradación controlada. Además, estos andamios pueden actuar como sistemas de liberación de fármacos, lo que amplía su potencial terapéutico **(Mirkhalaf et al., 2023).**

1.1.6.5. Lixiviación de porógenos

La lixiviación de porógenos es un método de fabricación ampliamente utilizado en ingeniería de tejidos debido a su simplicidad y bajo costo. Este proceso consiste en incorporar micropartículas, como microesferas a base de gelatina, dentro de una matriz polimérica para formar un andamio. Una vez que la matriz se ha solidificado, las

micropartículas se eliminan mediante un agente disolvente, sin afectar la estructura del andamio y la resistencia mecánica propia del tejido óseo **(Kuang et al., 2022).** Esto da lugar a cavidades que reproducen la forma del porógeno utilizado, generando poros bien definidos. La eliminación de los porógenos determina características clave como el tamaño, la forma, la distribución y la interconexión de los poros, aspectos fundamentales para favorecer la adhesión, migración y proliferación celular **(Draghi et al., 2005).** Estos parámetros son esenciales para garantizar un adecuado flujo de nutrientes y un entorno óptimo para el crecimiento celular, especialmente en aplicaciones dirigidas a la regeneración de tejido óseo **(Owen et al., 2020).** Aunque presenta ciertos desafíos, como la posible formación de poros no interconectados o la presencia de residuos, esta técnica sigue siendo una de las más eficaces y compatibles tanto con biomateriales naturales como sintéticos, y se emplea ampliamente en investigaciones relacionadas con la regeneración de tejidos óseo, cartilaginoso y blando **(Singhawannurat et al., 2024).**

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar mediante ensayos biológicos andamios elaborados con policaprolactona, quitosano y lixiviación de microesferas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Construir andamios biológicos de policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de microesferas.

- Evaluar la hemocompatibilidad de los andamios biológicos mediante pruebas hemostáticas.

- Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de policaprolactona y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares.

CAPÍTULO II – METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Para el desarrollo del siguiente trabajo investigativo se utilizó el siguiente material que se enlista a continuación:

2.1.1. Reactivos

- Ácido acético glacial (CH_3COOH)
- Aceite Mineral
- Etanol 96%
- Gelatina
- Quitosano
- Policaprolactona (PCL)
- Span 80
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Solución salina
- Caldo Müller – Hilton
- Kit de ensayo de hemoglobina
- Kit de cuantificación de LDH
- Cloruro de Calcio (CaCl2)
- Tritón X-100
- Etanol 70 %

2.1.2. Materiales fungibles

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

- Papel filtro
- Papel aluminio
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Placas de 96 pocillos
- Probetas de 10, 500 mL
- Tubos de centrífuga cónicos de 10 mL
- Tubos de ensayo con rosca
- Tubos para muestras de sangre
- Vasos de precipitación de 50, 100, 200, 500 y 1000 mL
- Bisturí
- Pastilla magnética
- Asas de siembra

2.1.3. Equipos

- Balanza analítica
- Campana extractora de gases
- Cámara de flujo laminar
- Plancha de calentamiento y agitación
- Incubadora
- Desecador
- Autoclave
- Microscopio óptico
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Potenciómetro

2.2. Métodos

2.2.1. Construcción de andamios biológicos de policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de microesferas.

2.2.1.1. Preparación de microesferas

Para preparar microesferas de gelatina, se utilizó una metodología modificada **de (Dong et al., 2021)**. Se disolvió gelatina en agua destilada a $60\,°C$, logrando una disolución homogénea. Luego, se añadió lentamente aceite mineral y 3 gotas de Span 80 como estabilizante **(Freire, 2024)**; la mezcla se mantuvo bajo agitación magnética a $650\,rpm$ durante 10 minutos, sin variar la temperatura para generar una emulsión estable. A continuación, la emulsión se dejó enfriar a $5\,°C$ durante 30 minutos en baño de hielo para facilitar la solidificación de las microesferas. El sobrenadante será cuidadosamente eliminado, y las microesferas serán lavadas con etanol al 96% para remover los residuos oleosos, este proceso se repitió hasta asegurar la limpieza completa de las microesferas. Finalmente, fueron recolectadas y secadas a temperatura ambiente garantizando su integridad estructural.

2.2.1.2. Construcción de andamios a base de policaprolactona y quitosano.

Para la preparación de las soluciones de biopolímeros, se utilizó la metodología modificada de **(Perez et al., 2019)** bajo una campana extractora de gases. Se disolvió PCL al 25% en ácido acético al $80\%\ a\ 60\,°C$ con agitación magnética a $400\,rpm$ durante 45 minutos. Posteriormente, se añadió QS al 2.5% con agitación por 10 minutos hasta obtener una mezcla homogénea. Seguidamente, se incorporaron las diferentes concentraciones de microesferas y la mezcla final se transfirió a placas de 96 pocillos, donde se dejará secar a temperatura ambiente durante un periodo de 24 a 48 horas para permitir la formación adecuada del andamio.

2.2.1.3. Formación de poros por lixiviación de microesferas

Para el proceso de lixiviación, los andamios fueron retirados cuidadosamente de las placas y colocados en tubos Falcon que contendrán entre 14 mL de agua destilada, dependiendo de la concentración de las microesferas presentes en los andamios. Los tubos fueron sellados e incubados a 37 °C durante $1 - 3$ horas (dependiendo de la concentración de microesferas) para garantizar la eliminación de residuos solubles.

Tras la incubación, los andamios fueron retirados y transferidos a un desecador **(Freire, 2024); (Kiran et al., 2015).**

2.2.2. Evaluación de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos mediante pruebas hemostáticas.

2.2.2.1. Ensayos biológicos

Las pruebas de hemocompatibilidad se desarrollaron de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos CEISH-FCS-UTA 090-CEISH-UTA-2025, con código 090-CEISH-UTA-2025 (**Anexo 28**).

Los apartados siguientes pretenden evaluar el comportamiento del biomaterial frente al componente sanguíneo, detallando el manejo responsable y ético del mismo. Es importante señalar que los andamios ya han sido evaluados en investigaciones anteriores mediante pruebas morfológicas y mecánicas por **Freire, (2024),** lo que respalda su idoneidad para las pruebas biológicas propuestas.

2.2.2.2. Evaluación de coagulación *in vitro*

Para la evaluación de coagulación *in vitro* se llevó a cabo mediante metodología modificada de **(Jimenez et al., 2022),** donde se utilizó un Kit de ensayo de hemoglobina (HUMAN-0169). Primero, las placas de 96 pocillos con los andamios, previamente colocados, fueron calentadas en un baño de agua a $37\ °C$ durante 1 hora minutos. Posteriormente, se añadió sangre anticoagulada con citrato de sodio a cada pocillo, luego de este proceso, se adicionó una solución de $CaCl_2$ (0.2 M) para iniciar la cascada de coagulación. Las muestras fueron incubadas a $37\ °C$ durante 30 minutos con agitación constante de $110\ rpm$. Una vez transcurrido el tiempo, los glóbulos rojos no adheridos a los andamios fueron eliminados mediante un lavado con agua desionizada. Finalmente, se cuantificó el contenido de hemoglobina en el sobrenadante mediante espectrofotometría a $540\ nm$ (I_s), utilizando la Ec. 1 para el análisis. Para el control en blanco (I_o), se medió la absorbancia tomando en cuenta la celda sin ningún tipo de reactivo; para la solución referencia (I_r) se preparó una solución

de $CaCl_2$, sangre anticoagulada con citrato y agua desionizada en una proporción 1:10:20.

$$BCI\ (\%) = \frac{I_s - I_0}{I_r - I_0} * 100 \qquad (1)$$

2.2.2.3. Evaluación de hemólisis *in vitro*

Para la determinación de hemoglobina, se llevó a cabo mediante metodología modificada de **(Jimenez et al., 2022),** donde se utilizó un Kit de ensayo de hemoglobina (HUMAN-0169). Se preparó una dilución 1:5 de sangre anticoagulada con citrato en solución salina para posteriormente depositarla en tubos Eppendorf. Los tubos fueron incubados a $37\ °C$ durante 1 hora y centrifugados a $300\ rpm$ durante 15 minutos. El contenido de hemoglobina se cuantificó mediante la recolección y análisis espectrofotométrico del sobrenadante a $540\ nm\ (I_s)$ utilizando la Ec. 2. Como control positivo $(C+;\ I_r)$, se utilizó una dilución de sangre en agua desionizada, mientras que para el control negativo $(C-;\ I_o)$ se empleó una dilución de sangre en PBS.

$$\%\ Hemólisis = \frac{I_s - I_0}{I_r - I_0} * 100 \qquad (2)$$

2.2.2.4. Evaluación de la adhesión de glóbulos rojos

La determinación se llevó a cabo mediante metodología modificada de **(Jimenez et al., 2022),** donde se utilizó un Kit de ensayo de hemoglobina (HUMAN-0169). Los andamios se colocaron en tubos Eppendorf junto con sangre anticoagulada con citrato de sodio, incubándolos a $37\ °C$ durante 5 minutos. Posteriormente, los andamios fueron transferidos a cajas Petri para realizar un lavado con agua estéril. A continuación, los andamios fueron reubicados en tubos Eppendorf, donde se añadió agua desionizada y se procedió a la centrifugación. Finalmente, la concentración de hemoglobina en el sobrenadante fue cuantificada mediante lectura espectrofotométrica a $540\ nm\ (I_s)$, donde se utilizó la Ec. 3.

$$[Hemoglobína] = I_s * 29.4 \quad (3)$$

2.2.2.5. Evaluación de la adhesión plaquetaria *in vitro*

El ensayo de adhesión plaquetaria *in vitro* se llevó a cabo mediante metodología modificada de **(Jimenez et al., 2022)**, donde se utilizó un Kit de cuantificación de deshidrogenasa láctica (LDH) (Thermo Scientific- LDH Pierce 13454269). Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) centrifugando sangre anticoagulada con citrato de sodio a $3200\ rpm$ durante 15 minutos. El PRP se colocó en placas de 96 pocillos e incubó a $37\ °C$ durante 1 hora. Luego, los andamios se transfirieron a cajas Petri y se añadió solución salina para eliminar las plaquetas no adheridas. Después, se trasfirió a tubos Eppendorf y se añadió Tritón X-100 al 1 % en PBS, con incubación a $37\ °C$ durante una hora. Finalmente, se midió la actividad de LDH a $340\ nm$ (I_s), utilizando PRP con Tritón X-100 al 1 % como control positivo ($C+;\ I_r$) y PRP con PBS como control negativo ($C-;\ I_o$). La medición se llevará acabo utilizando la Ec. 4 para el análisis de los resultados.

$$Liberación\ de\ LDH\ (\%) = \frac{I_s - I_0}{I_r - I_0} * 100 \quad (4)$$

2.2.3. Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de policaprolactona y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares.

2.2.3.1. Preparación de medios de cultivo

Para evaluar los métodos de esterilización, se utilizó medio Agar Sangre se siguió un procedimiento estandarizado, primero se disolvió Agar-Agar en agua desmineralizada y se calentó hasta obtener una solución homogénea. Luego, se autoclavó a $121\ °C$ durante 15 minutos y se dejó enfriar a una temperatura ambiente. Seguidamente, se incorporó sangre estéril en una concentración del 5 % v/v, se mezcló suavemente para evitar la formación de burbujas y garantizar una distribución uniforme. El medio

preparado se dispensó en cajas Petri estériles, asegurando un ambiente aséptico durante todo el proceso. Finalmente, las placas se dejaron en reposo hasta que el medio se solidifique completamente **(Van der Ploeg et al., 2010).**

2.2.3.2. Determinación de la neutralización de los andamios biológicos

Los andamios se neutralizaron siguiendo una metodología modificada basada en los protocolos estandarizados de **(Wang et al., 2012).** Estos se colocaron en placas de Petri y se sumergieron en una solución de NaOH 0.1 M durante intervalos de 20 a 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de inmersión, la solución se eliminó mediante lavados con agua ionizada para ajustar el pH a niveles neutros. Finalmente, se midió el pH de las soluciones, utilizando un control negativo (C^-) como referencia para el análisis.

2.2.3.3. Determinación de la esterilidad de los andamios biológicos

La evaluación de esterilización de los andamios se realizó mediante la aplicación de luz ultravioleta (UV). Para ello, se colocaron individualmente en cajas Petri estériles y se introducirán en una cámara de luz UV por 40 minutos **(Łopianiak & Butruk, 2020)**. Finalizado este tiempo, los andamios se retiraron y se manipularon en condiciones asépticas. Para confirmar la efectividad del método de esterilización, se realizó un ensayo microbiológico. Los andamios esterilizados se depositaron sobre placas de Agar Sangre preparadas previamente y se incubaron a 37 $°C$ durante periodos de 24 y 48 horas. Posteriormente, se inspeccionaron las placas para evaluar la presencia o ausencia de crecimiento microbiano **(Francisco et al., 2021).**

2.2.3.4. Inhibición bacteriana

Para determinar la inhibición bacteriana, se preparó una suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* con una densidad óptica de 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a $1.5 * 10^8\ UFC/mL$. Luego, se elaboró una solución de resazurina al 0.2 % en agua destilada y se añadió a una placa de 96 pocillos junto con caldo MH y solución bacteriana. Las placas se incubaron a 37 $°C$ durante 24 horas para permitir

el crecimiento bacteriano. Seguidamente, se agregó resazurina y se mantuvo en oscuridad durante 1 hora. Finalmente, se midió los cambios en la fluorescencia a 540 nm con un espectrofotómetro para evaluar la viabilidad bacteriana **(Piñaloza & Ramírez, 2023); (Dalecki et al., 2016).**

2.2.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para evaluar si existen diferencias significativas de las diferentes concentraciones de microesferas de gelatina $(25\%, 50\%\ y\ 75\%\ p/v)$ sobre las propiedades biológicas y microbiológicas de los andamios elaborados, empleando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) al 95% de confianza, para ello, se utilizó el paquete estadístico Minitab en su versión gratuita. Verificando de manera previa los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos; si no se cumplen, se recurrirá a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

CAPÍTULO III – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Construcción de andamios biológicos de policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de microesferas.

3.1.1.1. Preparación de microesferas

Las microesferas de gelatina, utilizadas como agentes porogénicos, desempeñan un papel crucial en la formación de la porosidad de los ABs. Se emplearon microesferas con un tamaño que oscila entre $100\ y\ 600\ \mu m$ (**Figura 3**), lo que permitió obtener una red de poros interconectados con una distribución de tamaños que cumple con los requerimientos para distintas etapas del proceso regenerativo. Según **Xu et al., (2022**) los ABs con tamaño de poro $\approx 100\ \mu m$, son eficaces para regeneración de tejido óseo *in vitro* en condiciones controladas y/o hueso cultivado. Este tamaño de poro permite una adecuada interacción célula – material, lo que favorece la formación de matriz extracelular, **Pereira et al., (2020)** recomiendan tamaños de poro superiores a $300\ \mu m$, pues para crecimiento oso, los poros pequeños pueden ser ocluidos por las células. Así mismo, **Prananingrum et al., (2016)** señalan que los tamaños de poro $\geq 300\ \mu m$ son óptimos para la permeabilidad tisular y la vascularización *in vivo*, lo cual mejora la migración celular profunda y el ingreso de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento, lo cual es esencial para sostener la formación de tejido óseo maduro y la integración vascular. Esta vascularización no solo mejora la supervivencia celular, sino que también es un paso crítico en la consolidación del nuevo tejido óseo en aplicaciones clínicas **(Wu et al., 2024).**

Figura 3
Preparación del agente porógeno para la elaboración de ABs



Nota. Las microesferas obtenidas son esenciales para el control de la porosidad en los andamios biológicos, permitiendo una adecuada integración celular. En este proceso, se utilizaron microesferas de tamaños de $100\ y\ 600\ \mu m$.

3.1.1.2. Construcción de andamios a base de policaprolactona y quitosano.

La construcción de ABs de PCL/QS por la técnica de lixiviación de microesferas permitió obtener estructuras tridimensionales porosas con características adaptables a diferentes concentraciones de porógenos **Tabla 2.** El siguiente estudio está basado en investigaciones previas, donde se han desarrollado ABs utilizando moldes en placa de 24 pocillos, con un área de $428.83\ mm^2$ y un espesor de $4\ mm$, manteniendo condiciones estandarizadas de concentración de microesferas. En contraste, este estudio adaptó la metodología a moldes de 96 pocillos, donde el área varia hasta aproximadamente $137.22\ mm^2$ con un espesor máximo de $5.5\ mm$ (**Figura 4)**. Esta adaptación requirió ajustes en el protocolo, particularmente en el volumen de solución polimérica, el cual se estandarizó a $200\ \mu L$ por pocillo para garantizar la uniformidad en la fabricación (**Anexo 1**).

Tabla 2. Composición de ABs por lixiviación de microesferas.

ABs	Concentración de PCL	Concentración de QS	Concentración de microesferas
1	25 %	2.5 %	25 %
2			50 %
3			75 %

Nota. ABs: Andamios Biológicos: PCL: Policaprolactona; QS: Quitosano. Los porcentajes se encuentras expresados en concentraciones de $peso/volúmen$.

La utilización de moldes de 96 pocillos ofrece ventajas significativas en términos de escalabilidad y optimización de recursos, ya que permite la producción simultánea de un mayor número de andamios con un menor consumo de materiales. Sin embargo, esta adaptación implicó desafíos técnicos, como la necesidad de reducir el tiempo de lixiviación para evitar la desintegración de los ABs. Mientras que en estudios anteriores **(Freire, 2024),** se emplearon tiempos de lixiviación de $24\ a\ 48$ horas, en este trabajo se observó que periodos superiores a 2 horas comprometían la integridad estructural de los andamios. Por lo tanto, se estableció un rango óptimo de $1\ a\ 2$ horas, asegurando así la estabilidad de las matrices poliméricas.

Las diferencias en las propiedades térmicas de los biopolímeros utilizados también influyeron en el proceso de fabricación. Mientras que la PCL presenta un punto de fusión entre $58\ y\ 63\ °C$, lo que la hace estable en medios acuosos a temperatura ambiente, el QS no tiene un punto de fusión definido y se descompone térmicamente a temperaturas superiores a $150\ °C$. Además, su comportamiento en solución acuosa depende en gran medida de su grado de desacetilación y de la acidez del medio ($pH\ <$ 6.5) **(Dong et al., 2004).**

Figura 4

ABs porogénicos elaborados mediante lixiviación de microesferas.



Nota. Los ABs se estandarizaron a placas de 96 pocillos para asegurar la reproducibilidad de los resultados experimentales.

La complementariedad entre PCL/QS se vuelve un factor clave para el desarrollo de un andamio funcional. La PCL aporta una estructura mecánica estable, con buena procesabilidad térmica y resistencia a la degradación en medios húmedos, lo que garantiza la conservación de la forma tridimensional del andamio durante su manipulación y uso **(Li et al., 2022).** Por otro lado, el QS aunque termolábil, añade propiedades biológicas altamente deseables, como la bioactividad, la capacidad de promover la adhesión celular y su reconocida hemocompatibilidad **(Singh et al., 2020).** La combinación de ambos materiales, por tanto, permite equilibrar las limitaciones individuales de cada uno. La rigidez y lenta degradación de la PCL se compensa con la capacidad del QS para mejorar la interacción celular y modular respuestas biológicas. Este efecto sinérgico se evidenció no solo en la estabilidad estructural observada en los andamios, sino también en la formación de poros interconectados que favorecen la difusión de nutrientes, lo cual es fundamental para futuros ensayos con líneas celulares.

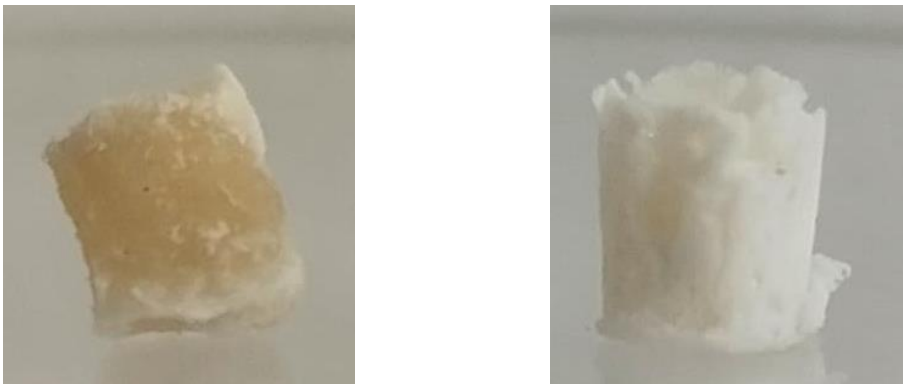
3.1.1.3. Formación de poros por lixiviación de microesferas

Durante el proceso de lixiviación, se observó una variación en la tonalidad de los ABs (**Figura 5**), lo cual está asociado a la eliminación de las microesferas y, por ende, a la formación de una estructura porosa. Además, se evidenció que factores como la temperatura y el tiempo de exposición al medio acuoso afectan significativamente la estabilidad de los ABs. Estudios como el de **Barreira et al., (2023)** han demostrado que la exposición prolongada al agua puede inducir hidrólisis en los polímeros, degradando sus propiedades mecánicas y térmicas. En este sentido, la interacción entre los grupos carbonilo de la PCL $(C = O)$ son aceptores de hidrógeno y los grupos amino $(-NH_2)$ e hidroxilo $(-OH)$ del QS, mediante puentes de hidrógeno, confiere estabilidad al andamio en condiciones acuosas. Sin embargo, un exceso de agua puede provocar la ruptura de estos enlaces, reduciendo la resistencia y durabilidad del material **(Baschek et al., 1999).**

Figura 5

Impacto en la tonalidad de los ABs previo y posterior al proceso de lixiviación.

A	**B**
ABs antes del proceso de lixiviación	ABs después del proceso de lixiviación



Nota. La variación en la tonalidad de los ABs está asociada a la eliminación de las microesferas, lo que resulta en la formación de una estructura porosa.

3.1.2. Evaluación de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos mediante pruebas hemostáticas.

3.1.2.1. Evaluación de coagulación *in vitro*

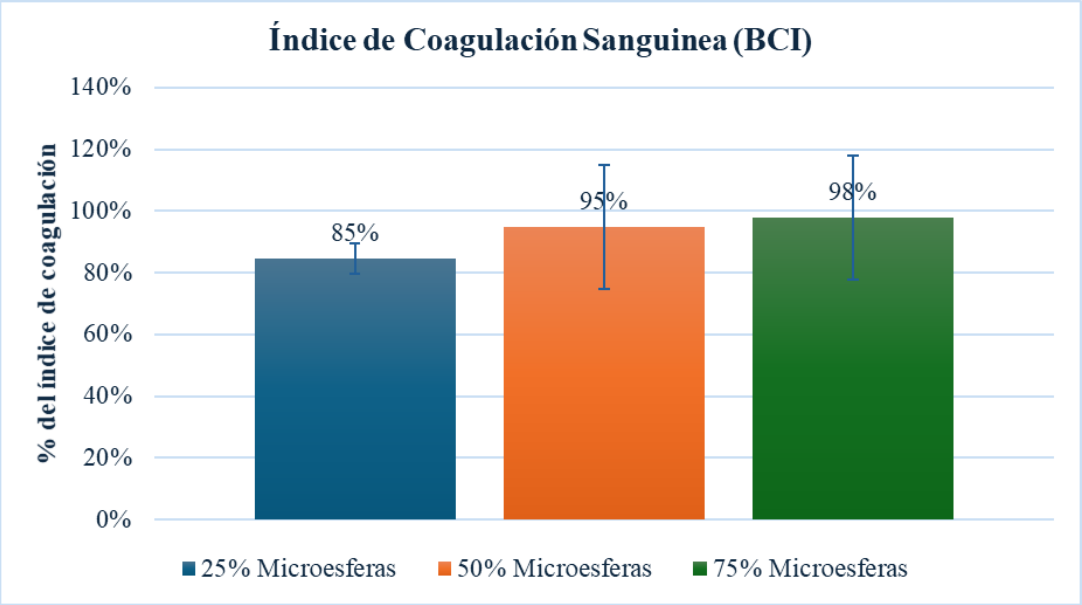
La evaluación de coagulación se llevó a cabo me con el fin de estudiar los cambios cuantitativos de los parámetros de coagulación después de la exposición de los ABs con la sangre. Para ello, se emplearon diferentes concentraciones porogénicas, onde se evidenció una relación directa entre el Índice de Coagulación Sanguínea (BCI) y la concentración de microesferas. El BCI cuantifica el porcentaje de células sanguíneas no coaguladas, este parámetro permitió evaluar la formación de coágulos en contacto directo con los ABs. Cabe destacar que, según la **ISO 10993-4:2017** los biomateriales deben permitir la activación de la coagulación sin inducir a la hemolisis o trombosis.

Los resultados obtenidos (**Figura 6**) detallan que los ABs de 25% microesferas presentaron un BCI del 85%, lo que indica una favorable activación del proceso hemostático. En cambio, los ABs con 50% y 75% de microesferas mostraron BCI aún más altos, alcanzando un 95% y 98%, respectivamente. Este aumento sugiere una mejora sustancial en la interacción entre el material y los elementos sanguíneos, **Zhang et al., (2022)** menciona que este parámetro se encuentra relacionado de manera directa con el área de contacto y la porosidad. En este sentido, mientras mayor sea la concentración de porógenos en los ABs mayor será el valor de BCI. Así mismo, **Shih et al., (2006)** menciona que un valor mayor de BCI indica una mayor biocompatibilidad del biomaterial.

En particular, el quitosano se ha destacado por su capacidad para promover la agregación plaquetaria y la activación de la cascada de coagulación, actuando como un agente hemostático natural **(Jayakumar et al., 2011).** La PCL, por su parte, cumple una función estructural como polímero biodegradable sin interferir negativamente en el proceso **(Xiang et al., 2018).** Esta formulación, si bien cumple con ciertos criterios de biocompatibilidad, sugiere una menor capacidad para inducir coagulación inmediata, lo cual podría limitar su efectividad en aplicaciones donde se requiere una rápida hemostasia

Figura 6

Porcentaje de coagulación sanguínea en ABs con diferentes concentraciones de microesferas.

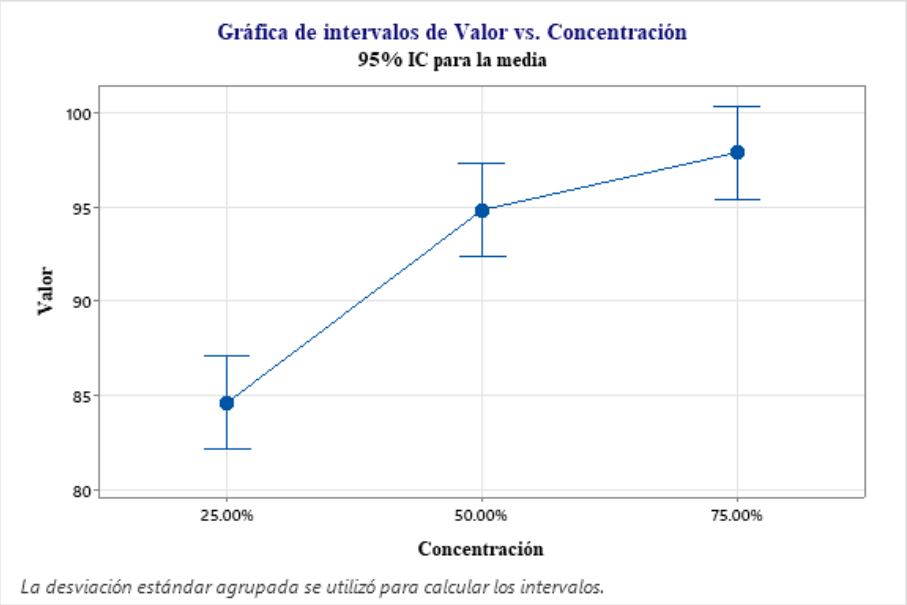


Nota. Los valores del BCI representan el porcentaje de células sanguíneas no coaguladas. Los ABs con mayor concentración de microesferas $(50\% \, y \, 75\%)$ representan mayor BCI $(95\%, 98\%,$ respectivamente), mientras que BCI representan el 85%.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado para la prueba de coagulación, se evidenció la existencia de diferencias significativas entre las distintas concentraciones de microesferas de gelatina presentes en los ABs. Previo a aplicar pruebas inferenciales, se verificó el cumplimiento de los supuestos estadísticos: la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk $(p > 0.1)$ y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene $(p = 0.455)$, cuyos resultados se presentan en los **Anexos 11** y **12,** respectivamente. Debido a que ambos supuestos se cumplieron, se procedió con un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), considerando un nivel de significancia del 5%.

Figura 7

Influencia de la concentración de microesferas en la funcionalidad de los ABs.

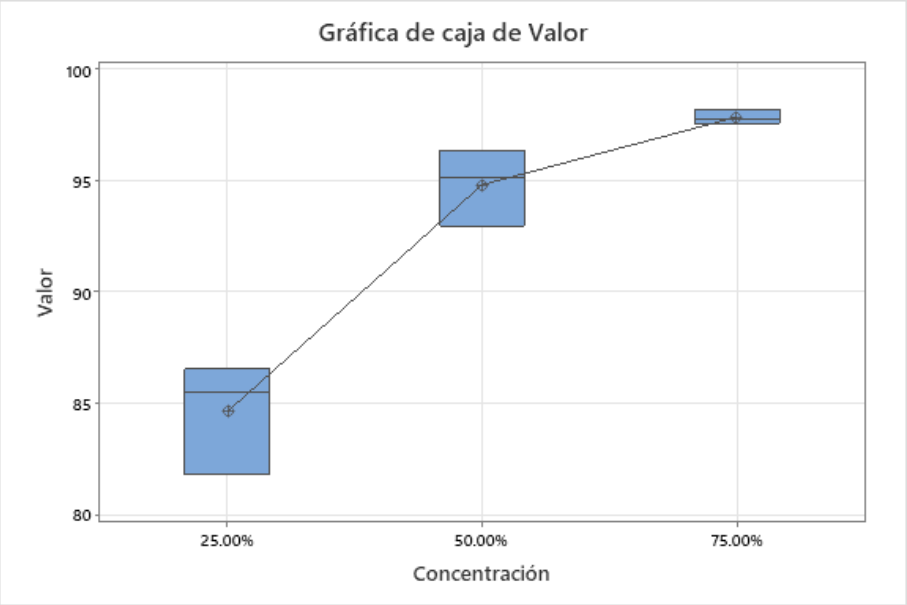


Nota. ANOVA de un factor ($p = 0.000$) confirma diferencias significativas ($\alpha = 0.05$). Intervalos de confianza del 95% muestran aumento progresivo en coagulación con mayores concentraciones de microesferas ($25\%, 50\%, 75\%$). Cumplimiento de supuestos: normalidad (Shapiro-Wilk $p > 0.1$) y homocedasticidad (Levene, $p = 0.455$).

El resultado del ANOVA ($p = 0.000$) indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo cual confirma que la concentración de microesferas influye directamente en la capacidad procoagulante del biomaterial. En la **Figura 7**, se presentan los intervalos de confianza del 95% para las medias, se observa un aumento progresivo en el porcentaje de coagulación conforme incrementa la concentración de microesferas. Además, los intervalos de las concentraciones de 25% y 75% no se solapan completamente, lo que proporciona evidencia visual de las diferencias significativas entre estos tratamientos.

Figura 8

Distribución del porcentaje de coagulación por concentración de microesferas.

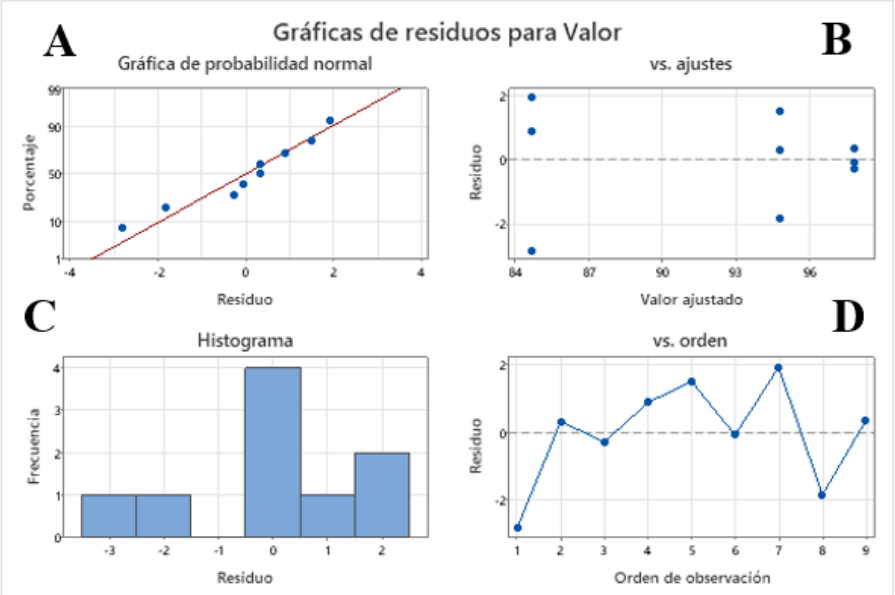


Nota. La mediana y dispersión de los datos reflejan una tendencia creciente en coagulación con concentraciones más altas, la concentración de 75% muestra menor variabilidad.

Por su parte, la gráfica de caja, **Figura** 8, permite visualizar la dispersión y mediana de cada grupo. Se observa una tendencia creciente en los valores de coagulación, junto con una menor dispersión en las concentraciones más altas (75%), lo que podría estar relacionado con una mayor uniformidad en la respuesta biológica del material. Finalmente, las gráficas de residuos, **Figura 9**, demuestran una distribución simétrica y aleatoria, sin patrones definidos, lo que respalda la validez del modelo ANOVA aplicado y refuerza la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Figura 9

Análisis de residuales para los valores de coagulación sanguines en ABs.



Nota. A: Grafico de probabilidad normal; B: Homogeneidad de varianzas; C: Distribución simétrica; D: Independencia de los datos. Los gráficos validan los supuestos ANOVA.

3.1.2.2. Evaluación de hemólisis *in vitro*

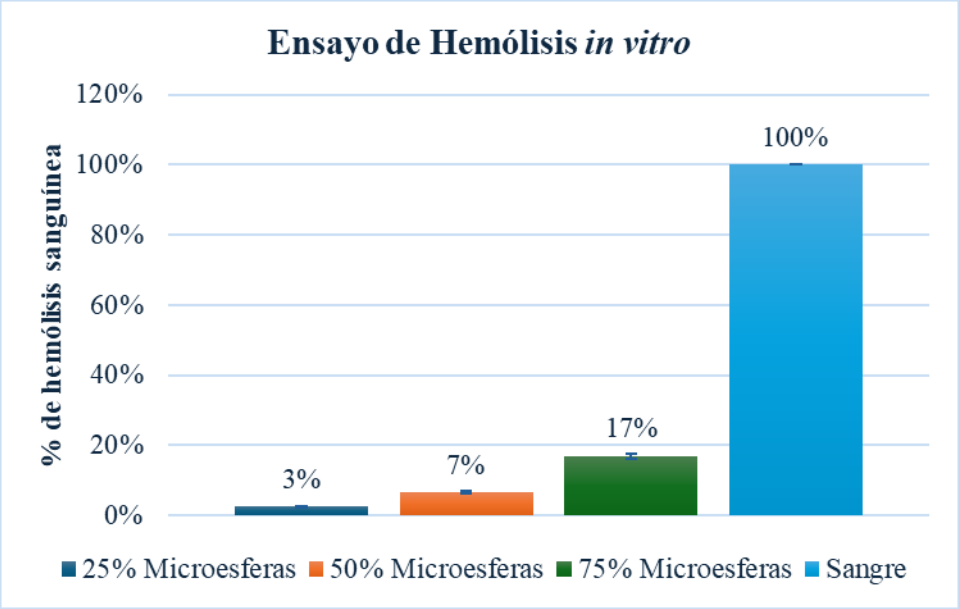
La biocompatibilidad hemática es uno de los criterios fundamentales en la evaluación de implantes temporales osteogénicos, dado que una interacción adecuada con los componentes celulares de la sangre, como eritrocitos y plaquetas, es esencial para minimizar respuestas hemolíticas o trombóticas no deseadas. En este estudio, el ensayo de hemólisis *in vitro* cuantificó la liberación de hemoglobina como indicador de daño a GR, lo cual es un parámetro clave ya que puede comprometer la funcionalidad del biomaterial **(Yang et al., 2023).**

Los análisis mostraron que los ABs con 25% de microesferas presentaron un porcentaje de hemólisis del 3%, valor que se encuentra dentro del rango aceptable establecido por la norma **ISO 10993-4:2017,** la cual considera no hemolíticos a los materiales con valores inferiores al 5% (**Figura 10**). Sin embargo, los niveles de hemólisis evidenciaron diferencias entre las concentraciones de microesferas,

superando en un 2% y 12% el umbral en los ABs con 50% y 75%, respectivamente, clasificándose como ligeramente hemolíticas y hemolíticas **ISO 10993-4:2017.**

Estos hallazgos coinciden parcialmente con estudios previos **(Yang et al., 2023),** donde no se observaron diferencias significativas en hidrogeles a diferentes concentraciones. Esta divergencia subraya la importancia de considerar las características específicas de cada biomaterial dirigidos a regeneración de tejido óseo, aunque dicha investigación resaltó la importancia de comparar los resultados con un control. En nuestro estudio, si bien no hubo una diferencia significativa entre los ABs al 25% y 50%, al compararlos con el control (sangre entera), las diferencias fueron notables, con incrementos del 97%, 93% y 83% para las microesferas al 25%, 50% y 75%, respectivamente.

Figura 10
Porcentaje de hemolisis in vitro en ABs con diferentes concentrciones de microesferas.



El análisis estadístico, tras confirmar la homogeneidad y la no normalidad de los datos (**Anexo 13 y 14**) ($p < 0.010$, prueba de Shapiro-Wilk), empleó métodos no paramétricos. La prueba de Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre grupos ($p = 0.015$), mientras que el post-hoc de Dunn con corrección de Bonferroni identificó que únicamente la comparación entre las concentraciones del 25% y 75%

alcanzó significancia estadística ($p\ ajustado\ =\ 0.022$). Estos hallazgos sugieren que altas concentraciones (75%) generan un efecto hemolítico crítico, probablemente debido a factores como el aumento en la rugosidad superficial y la mayor liberación de componentes porogénicos que comprometen la integridad membranal.

La relación directa entre porosidad y hemólisis concuerda con lo reportado por **Shih et al., (2006)** quienes establecieron una correlación inversa entre el Índice de Biocompatibilidad (BCI) y el daño eritrocitario. Si bien la concentración al 25% demostró adecuada biocompatibilidad, es crucial considerar que la interacción con otros elementos sanguíneos podría influir en el proceso de osteointegración **(Chi et al., 2020).** Una limitación importante del presente estudio radica en su enfoque exclusivo en parámetros hemolíticos, por lo que futuras investigaciones deberían incorporar evaluaciones complementarias de coagulación y agregación plaquetaria.

Tabla 3. Prueba de Dunn para comparación múltiple de rangos de hemólisis

Comparación	Diferencia de rangos	Valor Z	p-valor	p-valor ajustado (Bonferroni)	Interpretación
25% vs 50%	–3.00	-1.3416	0.1797	0.5391	No significativa (p > 0.05)
25% vs 75%	–6.00	-2.6833	0.0073	0.0219	Significativa (p < 0.05)
50% vs 75%	–3.00	-1.3416	0.1797	0.5391	No significativa (p > 0.05)

Nota. $\alpha = 0.05$. Solo la comparación $25\%\ vs\ 75\%$ mostró diferencias significativas ($p - ajustado = 0.0219$). Kruskal-Wallis global: $p = 0.015$.

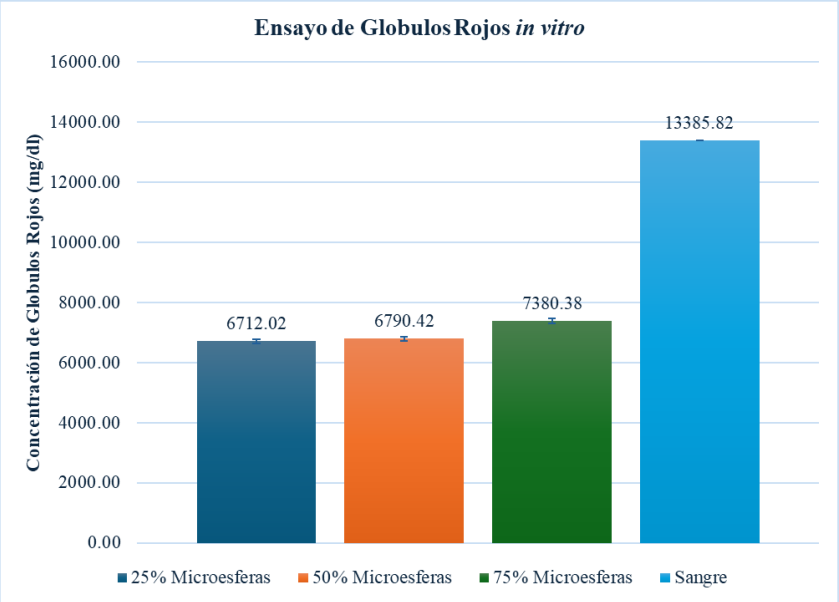
3.1.2.3. Evaluación de la adhesión de glóbulos rojos *in vitro*

El análisis cuantitativo de la adhesión de GR se llevó a cabo con el objetivo de identificar la cantidad de eritrocitos que no se adhirieron a los ABs, utilizando como indicador la concentración de hemoglobina. Dado que la hemoglobina es la principal proteína contenida en los GR, su presencia en el medio extracelular refleja

indirectamente la cantidad de células que no quedaron retenidas sobre la superficie del AB. Una menor concentración de hemoglobina fuera del ABs indica una mayor adhesión de GR **(Jimenez et al., 2022)**

En este sentido, los ABs de 25% de microesferas mostraron una concentración de hemoglobina de $6712.02\ mg/dl \pm 206.24$. En comparación, el control presentó una concentración de hemoglobina significativamente mayor de $13385.82\ mg/dl$, mientras que los otros grupos de ABs 50% y 75% de microesferas mostraron valores de $6790.42\ mg/dl \pm 195.29$ y $7380.38\ mg/dl \pm 228.87$, respectivamente (**Figura 11**), lo cual según **Bandzerewicz et al., (2023)** esta característica se atribuye a una mayor superficie poroso. Sin embargo, los valores de hemoglobina que se obtuvieron se muestran por debajo del umbral del control sanguíneo, esto sugiere una baja adhesión GR. Así mismo, los ABs con 25% de microesferas tienen una mayor capacidad para retener GR en comparación con los otros grupos, que podría contribuir a una mejor eficacia hemostática.

Figura 11
Concentración de glóbulos rojos (mg/dl).



Esta evaluación resulta relevante debido a que la interacción inicial de la sangre con un biomaterial influye directamente en el proceso de hemostasia, el cual incluye la

formación de coágulos sanguíneos **(Jimenez et al., 2022)**. La hemostasia cumple un papel esencial en la reparación ósea, ya que durante la cicatrización los coágulos estabilizan temporalmente el tejido lesionado y, posteriormente, su disolución permite la liberación de factores quimiotácticos que promueven la regeneración del tejido óseo dañado **(Poddar et al., 2021).**

Por tanto, este mecanismo resalta la importancia de garantizar una adecuada hemocompatibilidad en los biomateriales implantables. Un equilibrio entre una baja adhesión de eritrocitos, ausencia de hemólisis y una coagulación controlada favorece la formación de un microambiente biológico ideal para procesos de regeneración, como ocurre en la reparación ósea inducida por andamios bioactivos.

Los datos cumplieron con el supuesto de normalidad ($p = 0.948$) pero no con el de homogeneidad ($p < 0.010$) **(Anexos 17 y 18).** Por ello, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que evidenció diferencias significativas entre al menos un par de concentraciones. Sin embargo, al realizar la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de microesferas ($25\%, 50\%, 75\%$).

Desde una perspectiva biológica, estos resultados indican que todos los andamios muestran un comportamiento hemocompatible similar lo cual es deseable ya que se trata de un biomaterial de regeneración de tejido óseo.

Tabla 4.

Prueba de Dunn para comparación múltiple de rangos de adhesión de glóbulos rojos

Comparación	Diferencia de rangos	Valor Z	p-valor	p-valor ajustado (Bonferroni)	Interpretación
25% vs 50%	–3.00	-0.4472	0.6547	1.9642	No significativa (p > 0.05)
25% vs 75%	–6.00	-2.2361	0.0253	0.0760	No significativa (p > 0.05)
50% vs 75%	–3.00	-1.7889	0.0736	0.2209	No significativa (p > 0.05)

Nota. Kruskal-Wallis global: $p = 0.028$. Ninguna comparación alcanzó significancia tras corrección de Bonferroni ($\alpha = 0.05$).

3.1.2.4. Evaluación de la adhesión plaquetaria *in vitro*

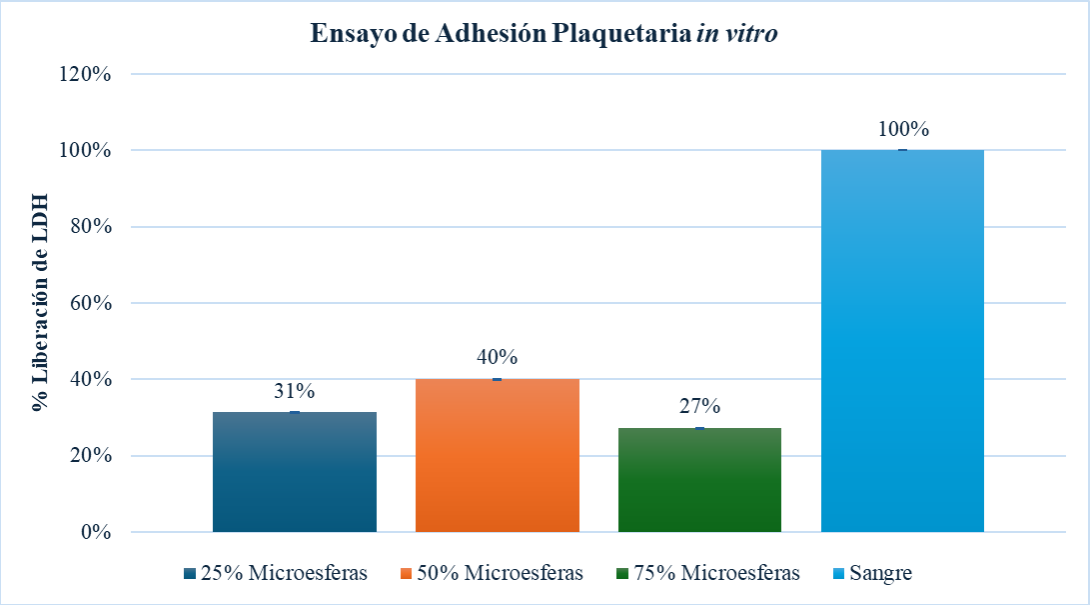
La trombogenicidad definida como la capacidad de un material para inducir la formación de tromboembolias, depende de las interacciones entre las plaquetas y la superficie del biomaterial. Este tipo de células sanguíneas desempeñan un papel clave en la hemostasia, mediante diferentes procesos de adhesión, agregación y liberación de mediadores bioactivos, mismos que se pueden ver influidos cuando las plaquetas entran en contacto con ciertos biomateriales **(Yim et al., 2007).** En este sentido, es importante mantener dichas interacciones sin activación plaquetaria es fundamental para garantizar la hemocompatibilidad de los ABs **(Weber et al., 2018).**

Este análisis se llevó a cabo mediante la el porcentaje de LDH que representa de manera indirecta en la cantidad plaquetaria adherida al AB. Generalmente, la LDH que se encuentra en la mayor parte de células sanguíneas, pues se trata de una enzima liberada después de la activación de las plaquetas. De acuerdo con, **Gassling et al., (2013)** la adherencia plaquetaria depende de propiedades de los ABs, lo que influye en la biocompatibilidad, así como la hemocompatibilidad del mismo.

Los valores obtenidos a raíz de la evaluación de adhesión plaquetaria, donde se observa (**Figura 12**) que los ABs 25% de microesferas cuenta con un 31% de liberación de LDH, sugiriendo una adsorción plaquetaria moderada. En comparación con los ABs de 50% que mostró una adhesión superior, logrando un 40%, lo que indica un riesgo de citotoxicidad con posibles repuestas trombogénicas. Los ABs 75% de microesferas registra un valor de 27%, lo que refleja una menor actividad plaquetaria y por ende mejor biocompatibilidad en relación a los demás ABs.

Figura 12

Adhesión plaquetaria in vitro medida por a partir de la liberación de LDH en ABs.



En cuanto al análisis estadístico, se aplicaron pruebas no paramétricas, a pesar que los datos cumplieron con el supuesto de homogeneidad **(Anexo 22**), no se cumplió con el supuesto de normalidad (**Anexo 21**). Por ello, se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis, mediante la cual se evidenció una diferencia significativa entre al menos dos concentraciones de microesferas. Para identificar específicamente cuáles concentraciones diferían entre sí, se empleó la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni.

Los resultados presentados en **l**a **Tabla 5** muestran diferencias significativas entre las concentraciones del **50% y 75%,** siendo esta última la que presentó un cambio notable en la adhesión plaquetaria. No obstante, entre las concentraciones de **25% vs. 50% y 25% vs. 75%** no se encontraron diferencias significativas. Estas variaciones podrían atribuirse a diferencias microestructurales de los ABs. En este sentido, **Ding et al., (2013)** mencionan que un biomaterial cuya superficie cuente con mayor homogeneidad y menor rugosidad tiende a reducir la adhesión celular, lo que explicaría el desempeño de los ABs **75%** de microesferas.

Sin embargo, la falta de correlación con el ensayo de coagulación sugiere que los mecanismos de activación plaquetaria observados no fueron suficientes para

desencadenar cambios significativos en la cascada de coagulación. Por ello, **Gorbet & Sefton, (2004)** mencionan que la actividad plaquetaria local cerca de los biomateriales, no siempre se traduce en cambios visibles en los ensayos de coagulación.

A nivel fisiológico, este tipo de células sanguíneas permanecen inactivas mientras no se exponen al colágeno subendotelial (capa interna de los vasos sanguíneos) tras un daño vascular. Sin embargo, la adherencia de proteínas plasmáticas a la superficie del biomaterial puede activarlas de manera no deseada, llevando a la liberación de ADP, reclutamiento de otras plaquetas y formación de microtrombos. Además, los gránulos alfa plaquetarios liberan factores procoagulantes (polifosfatos) y mediadores inflamatorios, exacerbando la respuesta trombótica y la inflamación local **(Yim et al., 2007).**

Tabla 5. Prueba de Dunn para comparación múltiple de rangos de adhesión plaquetaria.

Comparación	Diferencia de rangos	Valor Z	p-valor	p-valor ajustado (Bonferroni)	Interpretación
25% vs 50%	–3.00	-1.3416	0.1797	0.5391	No significativa (p > 0.05)
25% vs 75%	–6.00	1.3416	0.1797	0.5391	No significativa (p > 0.05)
50% vs 75%	–3.00	2.6833	0.0073	0.0219	Significativa (p < 0.05)

Nota. $\alpha = 0.05$. Corrección de Bonferroni aplicada. La diferencia $50\% \; vs 75\%$ sugiere que la microestructura de los ABs al 75% reduce la activación plaquetaria.

3.1.3. Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de policaprolactona y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares.

3.1.3.1. Determinación de la neutralización de los andamios biológicos

En la neutralización de los ABs a diferentes concentraciones de microesferas, consecuentemente se tomaron mediciones de pH de cada muestra en condiciones de inmersión en agua destilada, presentando un valor promedio de $3.5\ de\ pH$ correspondiente a los andamios biológicos, por lo tanto, los andamios se sometieron a tratamiento con exposición en una base fuerte de $NaOH\ al\ 0.1\ M$ durante 10 minutos, después de realizar lavamiento de los andamios con agua destilada, obteniendo una neutralización del pH con un valor de 7.3.

Con el fin de ajustar el pH a condiciones fisiológicas compatibles con tejidos vivos, los andamios fueron sometidos a un tratamiento de neutralización mediante inmersión en una solución de hidróxido de sodio $(NaOH)\ 0.1\ M$ durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada, logrando una neutralización efectiva, con valores finales de pH en torno a 7.3, adecuados para medios biológicos.

En este sentido, Souza et al., (2023) estacan que el mantenimiento de un pH neutro en biomateriales es fundamental para emular las condiciones de la matriz extracelular, favoreciendo así la adhesión, proliferación y viabilidad celular. Por su parte, **Sandle, (2019)** enfatiza que los ABs destinados a aplicaciones en cultivo celular o terapias regenerativas deben presentar propiedades fisicoquímicas compatibles con el entorno fisiológico, incluyendo un pH neutro, para garantizar su funcionalidad y seguridad.

Por lo tanto, la neutralización se constituye como un paso esencial en la preparación de andamios biológicos, ya que garantiza su compatibilidad con medios celulares, asegurando condiciones óptimas para estudios de regeneración tisular o ensayos con líneas celular.

3.1.3.2. Determinación de la esterilidad de los andamios biológicos

Con base en los resultados obtenidos, se analizaron muestras de andamios biológicos (ABs) en tres condiciones: neutralizados y esterilizados (N-E), sin neutralizar y esterilizados (SN-E), y se evaluó la eficacia del proceso de esterilización mediante irradiación con luz ultravioleta (UV). Esta técnica fue seleccionada por su capacidad

para inhibir el crecimiento microbiano sin generar residuos tóxicos, lo que la convierte en una alternativa adecuada para materiales sensibles como los biopolímeros.

La esterilización se llevó a cabo mediante exposición directa a rayos UV durante 1 hora, tiempo determinado tras una estandarización del protocolo, considerando la morfología, rigidez y tamaño del material. Posteriormente, los andamios fueron cultivados en placas con agar sangre (**Anexo 10**) con el objetivo de identificar posibles contaminaciones microbiológicas. No se evidenció crecimiento bacteriano, lo que indica que el tiempo de exposición empleado fue suficiente para garantizar la esterilidad superficial de los ABs.

Evrova et al., (2019) señala que la eficacia de la irradiación UV depende directamente del tiempo de exposición, recomendando un intervalo de 1 a 2 horas para asegurar una desinfección eficiente. Sin embargo, advierte que exposiciones prolongadas podrían alterar propiedades bioquímicas y estructurales, especialmente en biomateriales elaborados con biopolímeros naturales. En esta línea, **(Aboamer et al., 2023)** destacan que la sensibilidad de los andamios a la irradiación UV aumenta con el tiempo de exposición, pudiendo comprometer su integridad estructural.

Asi mismo, **Jafar et al., (2023)** reportan que andamios elaborados con ácido poliláctico (PLA) requieren hasta 12 horas de exposición para una esterilización efectiva, aunque esto conlleva una mayor tasa de degradación y disminución del peso molecular. Por otro lado**, Braghirolli et al., (2014)** describen que los andamios de PLGA presentan alteraciones morfológicas tras una exposición UV entre 30 minutos y 2 horas.

En este estudio, la exposición de los ABs bajo 1 hora se mostró efectiva para lograr la esterilidad sin evidenciarse cambios visibles en su morfología. Sin embargo, es importante considerar que el efecto de la irradiación puede variar según la composición y tamaño del andamio, por lo que futuras investigaciones deben profundizar en el análisis de propiedades fisicoquímicas post-esterilización para garantizar su integridad y funcionalidad en aplicaciones de regeneración ósea.

3.1.3.3. Inhibición bacteriana

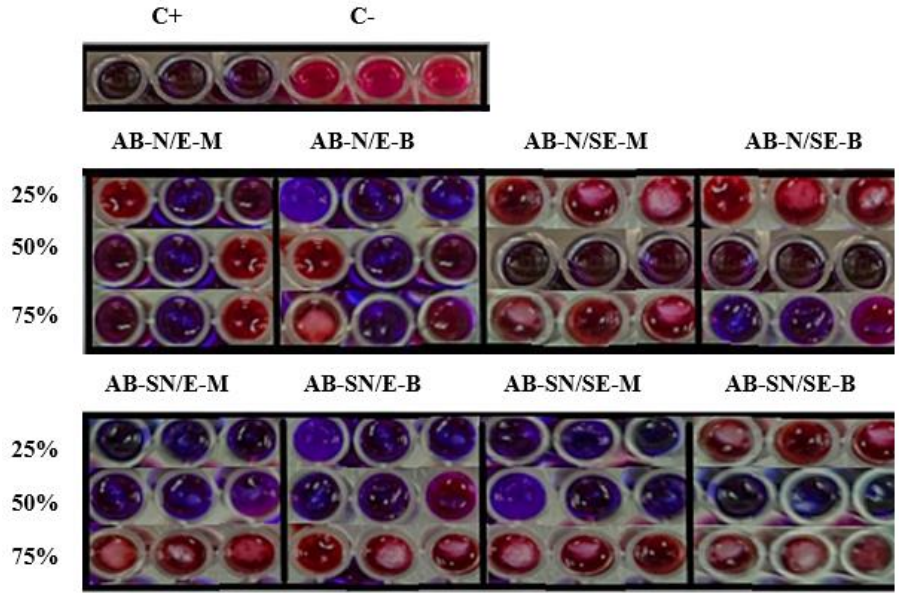
La actividad antimicrobiana en andamios biológicos (ABs) permite evaluar la capacidad del biomaterial para inhibir el crecimiento de microorganismos indicadores. Este parámetro es fundamental en el desarrollo de materiales para regeneración ósea, ya que infecciones bacterianas pueden comprometer la integración del implante. En este estudio, se seleccionó *Staphylococcus aureus* como modelo microbiano debido a su relevancia clínica como patógeno humano. Este microorganismo está asociado a infecciones óseas como la osteomielitis, la cual puede provocar necrosis y destrucción tisular.

Para identificar el crecimiento microbiano, los ABs se expusieron a suspensiones bacterianas y se empleó resarzurina como indicador metabólico. Este colorante permite visualizar la viabilidad bacteriana mediante cambios de coloración (Gong et al., 2020). Este método, basado en microplacas, ofrece ventajas frente al recuento tradicional en placa, como rapidez y menor demanda de recursos.

En la **Figura 13** se observa la variación de coloración en las placas de cultivo, donde se evidencia la inhibición bacteriana en función de las concentraciones de microesferas y las propiedades de los ABs. Los controles positivos (C+) y negativo (C-) validaron los resultados. El mayor grado de contaminación se registró en los AB-N/SE-B para todas las concentraciones (25%, 50% y 75%), mientras que las zonas de inhibición más marcadas (en al menos dos concentraciones) correspondieron a los AB-SN/E-M y AB-SN/E-B. Esto podría deberse a las propiedades intrínsecas de los biopolímeros: la rigidez aportada por el PCL y la actividad antimicrobiana del quitosano.

Figura 13

Evaluación de la inhibición antimicrobiana mediante el ensayo de resarzurina.



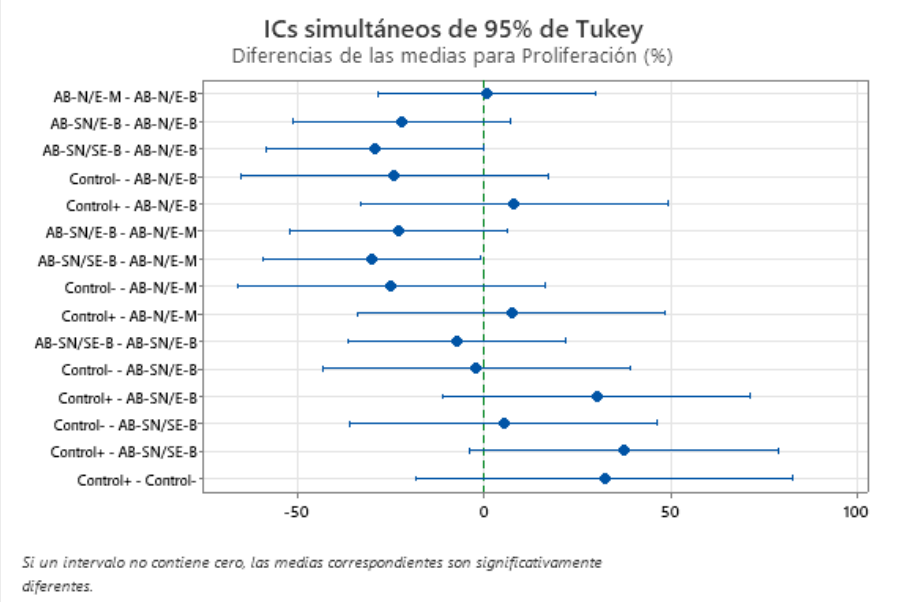
Nota. AB: andamios biológicos; N: neutralizados; SN: sin neutralizar; E: esterilizados; SE: sin esterilizar; M: medio Muller Hiltone; B: microorganismo *S. aureus.*

Cabe destacar que *S. aureus* es un microorganismo Gram positivo resistente a $pH > 4$. Sin embargo, durante la fabricación de los ABs, el uso de ácido acético al 80% en las soluciones poliméricas podría generar un microambiente ácido que afecte la proliferación bacteriana. Esto explicaría la coloración rosada observada en algunos ABs, incluso después de los procesos de esterilización y neutralización.

Los datos cumplieron con las pruebas de normalidad ($p < 0.100$) y homogeneidad ($p = 0.406$), permitiendo aplicar un ANOVA y una prueba post hoc de Tukey (95% de confianza). El análisis confirmó diferencias significativas entre las medias de proliferación bacteriana. En particular, los tratamientos AB-SN/E mostraron diferencias estadísticas frente al control negativo, respaldando su potencial como biomateriales con actividad antibacteriana.

Figura 14

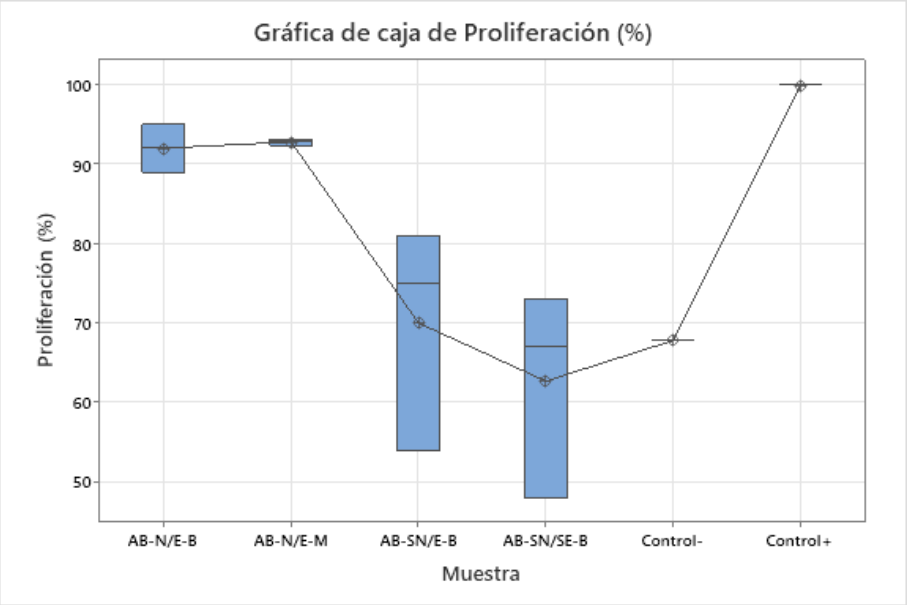
Prueba post hoc de Tukey



Además, la **Figura 14** revela que los AB-SN/E-M y AB-SN/E-B presentaron menor proliferación y dispersión bacteriana en comparación con el control, lo que sugiere una distribución homogénea de los componentes activos. Según **Correa et al., (2015)** este efecto se atribuye a la sinergia entre los biopolímeros: el quitosano actúa como agente antimicrobiano, mientras que la matriz de PCL favorece la estabilidad estructural del andamio.

Figura 15

Comparación de la proliferación bacteriana (%) en andamios biológicos bajo diferentes condiciones de neutralización y esterilización.



Nota. Datos cumplen normalidad (Shapiro-Wilk. $p > 0.10$) pero no homocedasticidad (Levene $p < 0.05$).

CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La estandarización del proceso de fabricación permitió reducir el volumen de mezcla polimérica y optimizar el tiempo de lixiviación a 1–2 horas, sin comprometer la integridad del biomaterial. Esta eficiencia metodológica, sumada a la interacción sinérgica entre PCL y QS, permitió superar las limitaciones individuales de cada polímero. Como resultado, se obtuvieron andamios con poros interconectados y propiedades que favorecen la interacción celular, al tiempo que se confirmó su biocompatibilidad y hemocompatibilidad mediante ensayos biológicos.

- Los resultados del ensayo de coagulación evidenciaron que el incremento en la concentración de microesferas mejora la eficiencia hemostática, alcanzando un índice de coagulación del 98% en andamios con 75% de porosidad. Sin embargo, los ensayos de hemólisis mostraron que únicamente los andamios con 25% de microesferas se mantienen dentro del umbral permitido por la norma ISO 10993-4:2017 (<5%), mientras que concentraciones superiores generaron niveles de hemólisis elevados, indicando una posible citotoxicidad hacia los eritrocitos. En cuanto a la adhesión celular, los andamios con 25% de microesferas presentaron una retención moderada de glóbulos rojos y una adhesión plaquetaria controlada (31% de liberación de LDH), evidenciando un comportamiento hemocompatible favorable.

- Por otro lado, la neutralización con NaOH 0.1 M permitió ajustar el pH a valores fisiológicos (~7.3), condición esencial para asegurar la compatibilidad con líneas celulares. La esterilización mediante irradiación UV resultó efectiva para eliminar contaminantes microbianos sin alterar la morfología del andamio. Finalmente, los ensayos de actividad antimicrobiana confirmaron la inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus, atribuible a la acción bactericida del quitosano, lo cual refuerza el potencial clínico de estos biomateriales en contextos con riesgo de infección.

- Los andamios biológicos (ABs) elaborados a partir de policaprolactona (PCL) y quitosano (QS), mediante la técnica de lixiviación de microesferas de gelatina ($100-600\ \mu m$), demostraron propiedades estructurales. La combinación de estos biopolímeros, uno sintético (PCL) y otro natural (QS), permitió obtener estructuras porosas con interconectividad, facilitando procesos esenciales como la migración celular, la vascularización y el transporte de nutrientes. Estas características son fundamentales para inducir una nueva etapa de regeneración tisular.

4.2. Recomendaciones

- Implementar técnicas de moldeo asistidas por agentes desmoldantes, con el objetivo de preservar la integridad estructural de los andamios durante y después del proceso de secado, evitando deformaciones o pérdidas de forma.

- Reducir la acidez residual del andamio minimizando el uso de ácido acético, mediante la incorporación de solventes alternativos compatibles con los biopolímeros utilizados, lo que contribuiría a mejorar la biocompatibilidad del material final.

- Estandarizar los tiempos de incubación según el tipo de AB, con base en su composición, porosidad y aplicación prevista, para asegurar condiciones óptimas en futuras pruebas celulares o funcionales.

- Evaluar y comparar distintas técnicas de esterilización (por ejemplo, irradiación UV, autoclave, óxido de etileno), a fin de garantizar la asepsia del biomaterial sin alterar su estructura porosa ni afectar el microambiente celular necesario para su funcionalidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M., & Nguyen, N. T. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *5*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/J.JSAMD.2020.01.007

Aboamer, M. A., Alsuayri, A. S., Alassaf, A., Alqahtani, T. M., Alresheedi, B. A., Saijari, G. N., Osman, E. A., & Mohamed, N. A. R. (2023). Hybrid Radiant Disinfection: Exploring UVC and UVB Sterilization Impact on the Mechanical Characteristics of PLA Materials. *Polymers*, *15*(24), 4658. https://doi.org/10.3390/POLYM15244658

Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Sub-Cellular Biochemistry*, *94*, 345. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14

Alba, L., Arenas, S., & Barrios De Zurbarán, C. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 9–18.

Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, *40*(5), 363. https://doi.org/10.1615/CRITREVBIOMEDENG.V40.I5.10

Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, *13*(19). https://doi.org/10.3390/POLYM13193256

Ardila, N., Ajji, Z., Heuzey, M. C., & Ajji, A. (2018). Chitosan electrospraying: Mapping of process stability and micro and nanoparticle formation. *Journal of Aerosol Science*, *126*, 85–98. https://doi.org/10.1016/J.JAEROSCI.2018.08.010

Aubin, J. E., & Triffitt, J. T. (2002). Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology* (2nd ed., Vol. 1, pp. 59–81). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1.50106-2

Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., Halvorsen, Y. D. C., Hicok, K., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G. D., & Gimble, J. M. (2004). Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, *6*(1), 7–14. https://doi.org/10.1080/14653240310004539

Azueta, P. H., Chuc, M. G., Aguilar, F. J., Aguilar, F. J., Rodas, B. A., Vargas, R. F., & Cauich, J. V. (2022). Effects of Neutralization on the Physicochemical, Mechanical, and Biological Properties of Ammonium-Hydroxide-Crosslinked Chitosan Scaffolds. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 14822*, *23*(23), 14822. https://doi.org/10.3390/IJMS232314822

Báez, J. E. (2016). El crecimiento en los extremos: Reactividad de grupos terminales en polímeros para la síntesis de copolímeros bloque. *Educacion Quimica*, *27*(2), 97–104. https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.11.001

Bandzerewicz, A., Godzieba, K., Wierzchowski, K., Pilarek, M., & Gadomska, A. (2023). A Study of the Properties of Scaffolds for Bone Regeneration Modified with Gel-like Coatings of Chitosan and Folic Acid. *Gels* , *9*(10), 773. https://doi.org/10.3390/GELS9100773

Barreira, R., Carneiro, R., Miranda, M., & Guedes, R. M. (2023). Polymer-Matrix Composites: Characterising the Impact of Environmental Factors on Their Lifetime. *Materials*, *16*(11), 3913. https://doi.org/10.3390/MA16113913

Baschek, G., Hartwig, G., & Zahradnik, F. (1999). Effect of water absorption in polymers at low and high temperatures. *Polymer*, *40*(12), 3433–3441. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00560-6

Beattie, J., Al-Khafaji, H., Noer, P. R., Alkharobi, H. E., Alhodhodi, A., Meade, J., El-Gendy, R., & Oxvig, C. (2018). Insulin- like growth factor-binding protein action in bone tissue: A key role for pregnancy- associated plasma protein-A. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(FEB), 333842. https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00031/XML/NLM

Biranje, S. S., Madiwale, P. V., Patankar, K. C., Chhabra, R., Bangde, P., Dandekar, P., & Adivarekar, R. V. (2020). Cytotoxicity and hemostatic activity of chitosan/carrageenan composite wound healing dressing for traumatic hemorrhage. *Carbohydrate Polymers*, *239*(February), 116106. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116106

Bizuneh, B. T., Tarekegn, T. K., Weldeslassie, F. M., Tsehay, S. A., Gaim, T. K., Mesfin, S. S., Mekonnen, R. A., Lebelo, R. H., Gezahagne, F. W., & Dagnachew, S. E. (2023). A Retrospective Study on Assessment of Prevalence and Treatment Outcome of Acute and Chronic Osteomyelitis at Surgical Ward in HFUSH from

2018-2021. *Journal of Surgery*, *11*(January 2018), 31–40. https://doi.org/10.11648/j.js.20231102.12

Black, C. R. M., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R. S., & Oreffo, R. O. C. (2015). Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports* , *1*(3), 132–140. https://doi.org/10.1007/S40610-015-0022-2

Bonewald, L. F., & Johnson, M. L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, *42*(4), 606–615. https://doi.org/10.1016/J.BONE.2007.12.224

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 30, Issue 10, pp. 546–554). https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005

Braghirolli, D. I., Steffens, D., Quintiliano, K., Acasigua, G. A. X., Gamba, D., Fleck, R. A., Petzhold, C. L., & 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. https://doi.org/10.1002/JBM.B.33049

Burr, D. B. (2019). Bone Morphology and Organization. In *Basic and Applied Bone Biology* (2nd ed., pp. 3–26). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00001-4

Cheng, A., Schwartz, Z., Kahn, A., Li, X., Shao, Z., Sun, M., Ao, Y., Boyan, B. D., & Chen, H. (2019). Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *25*(1), 14. https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2018.0119

Chi, C. J., Castillo, M. G., Alcocer, G. A., Ramos, S. I., Rodríguez, A. L., Fernández, I., & Rodríguez, N. (2020). Characterization and hemocompatibility assessment of porous composite scaffolds with a biomimetic human clavicle macrostructure. *Health and Technology*, *10*(2), 423–428. https://doi.org/10.1007/S12553-019-00374-9/FIGURES/5

Correa, L. S., Zuluaga, F., Valencia, C., & Godoy, J. E. (2015). Elaboración de Andamios Porosos Osteoinductivos de Poli (Ácido l-Láctico)/Quitosano Para La Regeneración de Tejido Óseo. Revista Colombiana de Materiales, (6), 34-53.

Dalecki, A. G., Crawford, C. L., & Wolschendorf, F. (2016). Targeting Biofilm Associated Staphylococcus aureus Using Resazurin Based Drug-susceptibility

Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *2016*(111), 53925. https://doi.org/10.3791/53925

Dang, M., Saunders, L., Niu, X., Fan, Y., & Ma, P. X. (2018). Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone Research* , *6*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41413-018-0025-8

de Boer, J., & van Blittersmijk, C. A. (2023). *Tissue Engineering* (J. Uquillas & N. Malik, Eds.; 3rd ed.). https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=BcBZEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=tissue+engineering&ots=9kYNlJoDgV&sig=qhEBqCuCo_ZXu2wA85M_OMLjQQA#v=onepage&q&f=true

Díaz, E., Sandonis, I., & Valle, M. B. (2014). *In vitro* Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites. *Journal of Nanomaterials*, *2014*(1), 802435. https://doi.org/10.1155/2014/802435

Ding, Y., Leng, Y., Huang, N., Yang, P., Lu, X., Ge, X., Ren, F., Wang, K., Lei, L., & Guo, X. (2013). Effects of microtopographic patterns on platelet adhesion and activation on titanium oxide surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *101 A*(3), 622–632. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34361

Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y., & Bi, D. (2004). Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, *93*(4), 1553–1558. https://doi.org/10.1002/APP.20630;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:10974628;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

Dong, Z., Meng, X., Yang, W., Zhang, J., Sun, P., Zhang, H., Fang, X., Wang, D. A., & Fan, C. (2021a). Progress of gelatin-based microspheres (GMSs) as delivery vehicles of drug and cell. *Materials Science and Engineering*, *122*(February), 111949. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111949

Dong, Z., Meng, X., Yang, W., Zhang, J., Sun, P., Zhang, H., Fang, X., Wang, D. A., & Fan, C. (2021b). Progress of gelatin-based microspheres (GMSs) as delivery vehicles of drug and cell. *Materials Science and Engineering*, *122*(February), 111949. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111949

Draghi, L., Resta, S., Pirozzolo, M. G., & Tanzi, M. C. (2005). Microspheres leaching for scaffold porosity control. *Journal of Materials Science: Materials in*

Medicine, *16*(12), 1093–1097. https://doi.org/10.1007/S10856-005-4711-X/METRICS

Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020). Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *10*(1), 381–388. https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2019.10.003

Effendi, M. D., & Gustiono, D. (2020). Effect of porogen agent on microstructure of CaP granules using the gelation of alginate droplet formation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. https://doi.org/10.1088/1757-899X/857/1/012026

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), 3429527. https://doi.org/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), 1–11. https://doi.org/10.1038/S41598-019-51513-1;TECHMETA=1,106,107,13,21;SUBJMETA=2778,308,575,692;KWRD=PRECLINICAL+RESEARCH,TRANSLATIONAL+RESEARCH

Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2023). Selected Biopolymers' Processing and Their Applications: A Review. *Polymers* , *15*(3), 641. https://doi.org/10.3390/POLYM15030641

Forgie, J. R. P., Leclinche, F., Dréan, E., & Dolez, P. I. (2023). Electrospinning of High-Performance Nanofibres: State of the Art and Insights into the Path Forward. *Applied Sciences* , *13*(22), 12476. https://doi.org/10.3390/APP132212476

Francisco, E. M., Zoccolotti, J. de O., Tiomnova, O. T., Tolaba, A. G., Chanfrau, J. E. R., Jorge, J. H., Basmaji, P., & Guastaldi, A. C. (2021). Sterilization of scaffolds of calcium phosphates and bacterial cellulose for their use in tissue regeneration. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *11*(3). https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1008910098

Freire, M. (2024a). *Elaboración de andamios biológicos mediante lixiviación de microesferas para aplicaciones biomédicas* [Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/625752d8-0cee-4fe1-b577-bbc27bfde664/content

Freire, M. (2024b). *Elaboración de andamios biológicos mediante lixiviación de microesferas para aplicaciones biomédicas*. Universidad Técnica de Ambato.

Gao, X., Ruzbarsky, J. J., Layne, J. E., Xiao, X., & Huard, J. (2024). Stem Cells and Bone Tissue Engineering. *Life*, *14*(3), 287. https://doi.org/10.3390/LIFE14030287/S1

Gassling, V., Hedderich, J., Açil, Y., Purcz, N., Wiltfang, J., & Douglas, T. (2013). Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clinical Oral Implants Research*, *24*(3), 320–328. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02333.x

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. https://doi.org/10.1093/RB/RBAA002

Gorbet, M. B., & Sefton, M. V. (2004). Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. In *Biomaterials* (Vol. 25, Issue 26, pp. 5681–5703). https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.023

Gou, Y., Huang, Y., Luo, W., Li, Y., Zhao, P., Zhong, J., Dong, X., Guo, M., Li, A., Hao, A., Zhao, G., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, H., Shi, Y., Wagstaff, W., Luu, H. H., Shi, L. L., Reid, R. R., … Fan, J. (2024). Adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are a superior cell source for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, *34*, 51–63. https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2023.12.003

Grabska, S., Sionkowska, A., Reczyńska, K., & Pamuła, E. (2020). Physico-Chemical Characterization and Biological Tests of Collagen/Silk Fibroin/Chitosan Scaffolds Cross-Linked by Dialdehyde Starch. *Polymers* , *12*(2), 372. https://doi.org/10.3390/POLYM12020372

Inchingolo, M., Inchingolo, F., Rapone, B., Dipalma, G., Danilo Inchingolo, A., Patano, A., Malcangi, G., Liang, H.-Y., Lee, W.-K., Hsu, J.-T., Shih, J.-Y., Ma, T.-L., Thuy Tien Vo, T., Lee, C.-W., Cheng, M.-T., & Lee, I.-T. (2024). Polycaprolactone in Bone Tissue Engineering: A Comprehensive Review of

Innovations in Scaffold Fabrication and Surface Modifications. *Journal of Functional Biomaterials* , *15*(9), 243. https://doi.org/10.3390/JFB15090243

INDOT. (2023). *Informe técnico de gestión del periodo de enero a diciembre de 2023*.

International Organization for Standardization. (2017a). *ISO 10993-4 : 2017. Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood*.

International Organization for Standardization. (2017b). *ISO 10993-4 : 2017. Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood*.

Iqbal, N., Khan, A. S., Asif, A., Yar, M., Haycock, J. W., & Rehman, I. U. (2018). Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. *International Materials Reviews*, *64*(2), 91–126. https://doi.org/10.1080/09506608.2018.1460943

Jafar, H., Ahmed, K., Rayyan, R., Sotari, S., Buqain, R., Ali, D., Al Bdour, M., & Awidi, A. (2023). Plasma-Treated Electrospun PLGA Nanofiber Scaffold Supports Limbal Stem Cells. *Polymers* , *15*(21), 4244. https://doi.org/10.3390/POLYM15214244

Janssens, K., Ten Dijke, P., Janssens, S., & Van Hul, W. (2005). Transforming Growth Factor-β1 to the Bone. *Endocrine Reviews*, *26*(6), 743–774. https://doi.org/10.1210/ER.2004-0001

Jayakumar, R., Prabaharan, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V., & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 3, pp. 322–337). https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005

Jia, K., You, J., Zhu, Y., Li, M., Chen, S., Ren, S., Chen, S., Zhang, J., Wang, H., & Zhou, Y. (2024). Platelet-rich fibrin as an autologous biomaterial for bone regeneration: mechanisms, applications, optimization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *12*. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2024.1286035/BIBTEX

Jimenez, J., Las Heras, K., Etxabide, A., Uranga, J., de la Caba, K., Guerrero, P., Igartua, M., Santos, E., & Hernandez, R. M. (2022a). Green hemostatic sponge-like scaffold composed of soy protein and chitin for the treatment of epistaxis.

Materials Today Bio, *15*, 100273. https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2022.100273

Jimenez, J., Las Heras, K., Etxabide, A., Uranga, J., de la Caba, K., Guerrero, P., Igartua, M., Santos, E., & Hernandez, R. M. (2022b). Green hemostatic sponge-like scaffold composed of soy protein and chitin for the treatment of epistaxis. *Materials Today Bio*, *15*, 100273. https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2022.100273

Kargozar, S., Mozafari, M., Hamzehlou, S., Milan, P. B., Kim, H. W., & Baino, F. (2019). Bone tissue engineering using human cells: A comprehensive review on recent trends, current prospects, and recommendations. *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(1). https://doi.org/10.3390/APP9010174

Kenkre, J. S., & Bassett, J. H. D. (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry*, *55*(3), 308–327. https://doi.org/10.1177/0004563218759371/ASSET/A16B8DB4-1E92-4617-9DED-90D70D0A3CB8/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_0004563218759371-FIG6.JPG

Khalaf, A. T., Wei, Y., Wan, J., Zhu, J., Peng, Y., Abdul Kadir, S. Y., Zainol, J., Oglah, Z., Cheng, L., & Shi, Z. (2022). Bone Tissue Engineering through 3D Bioprinting of Bioceramic Scaffolds: A Review and Update. *Life* , *12*(6). https://doi.org/10.3390/LIFE12060903

Kiran, S., Nune, K. C., & Misra, R. D. K. (2015). The significance of grafting collagen on polycaprolactone composite scaffolds: Processing-structure-functional property relationship. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *103*(9), 2919–2931. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35431

Kluczka, J. (2023). Chitosan: Structural and Chemical Modification, Properties, and Application. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 554*, *25*(1). https://doi.org/10.3390/IJMS25010554

Kuang, T., Chen, S., Gu, Z., Shen, Z., Hejna, A., Saeb, M. R., Chen, F., Zhong, M., & Liu, T. (2022). A facile approach to fabricate load-bearing porous polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, *5*(2), 1376–1384. https://doi.org/10.1007/S42114-022-00418-1/METRICS

Lademann, F., Hofbauer, L. C., & Rauner, M. (2020). The Bone Morphogenetic Protein Pathway: The Osteoclastic Perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.586031/BIBTEX

Le, B. Q., Nurcombe, V., Cool, S. M. K., Van Blitterswijk, C. A., De Boer, J., & LaPointe, V. L. S. (2017). The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration. *Materials* , *11*(1), 14. https://doi.org/10.3390/MA11010014

Li, Q., Liu, W., Hou, W., Wu, X., Wei, W., Liu, J., Hu, Y., & Dai, H. (2022). Micropatterned photothermal double-layer periosteum with angiogenesis-neurogenesis coupling effect for bone regeneration. *Materials Today Bio*, *18*, 100536. https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2022.100536

Liu, F., Ran, Q., Zhao, M., Zhang, T., Zhang, D. Z., & Su, Z. (2020). Additively Manufactured Continuous Cell-Size Gradient Porous Scaffolds: Pore Characteristics, Mechanical Properties and Biological Responses *In vitro*. *Materials* , *13*(11). https://doi.org/10.3390/MA13112589

Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *19*(6), 485. https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2012.0437

Long, G., Liu, C., Liang, T., Zhang, Z., Qin, Z., & Zhan, X. (2023). Predictors of osteoporotic fracture in postmenopausal women: a meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *18*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/S13018-023-04051-6/TABLES/2

Long, T., Tan, W., Tian, X., Tang, Z., Hu, K., Ge, L., Mu, C., Li, X., Xu, Y., Zhao, L., & Li, D. (2023). Gelatin/alginate-based microspheres with sphere-in-capsule structure for spatiotemporal manipulative drug release in gastrointestinal tract. *International Journal of Biological Macromolecules*, *226*, 485–495. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.12.040

Łopianiak, I., & Butruk, B. A. (2020). Evaluation of Sterilization/Disinfection Methods of Fibrous Polyurethane Scaffolds Designed for Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21). https://doi.org/10.3390/IJMS21218092

Ma, S., Song, K., Lan, J., & Ma, L. (2020). Biological and mechanical property analysis for designed heterogeneous porous scaffolds based on the refined TPMS. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *107*(December 2019). https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103727

Martin, A., & Martin, L. (2019). Matrices para Ingeniería del tejido óseo. *Actualidad Médica*, *104*(806), 36–45. https://doi.org/10.15568/AM.2019.806.RE01

Mawazi, S. M., Kumar, M., Ahmad, N., Ge, Y., & Mahmood, S. (2024). Recent Applications of Chitosan and Its Derivatives in Antibacterial, Anticancer, Wound Healing, and Tissue Engineering Fields. *Polymers 2024, Vol. 16, Page 1351*, *16*(10), 1351. https://doi.org/10.3390/POLYM16101351

Mirkhalaf, M., Men, Y., Wang, R., No, Y., & Zreiqat, H. (2023). Personalized 3D printed bone scaffolds: A review. *Acta Biomaterialia*, *156*, 110–124. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2022.04.014

Mizoguchi, T., & Ono, N. (2021). The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, *36*(8), 1432–1447. https://doi.org/10.1002/JBMR.4410

Morgan, E. F., & Gerstenfeld, L. C. (2021). The bone organ system: form and function. In *Marcus and Feldman's Osteoporosis* (5th ed., Vol. 1, pp. 15–35). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813073-5.00002-2

Ng, M. K., Gordon, A. M., Piuzzi, N. S., Wong, C. H. J., Jones, L. C., & Mont, M. A. (2023). Trends in Surgical Management of Osteonecrosis of the Femoral Head: A 2010 to 2020 Nationwide Study. *Journal of Arthroplasty*, *38*(7), S51–S57. https://doi.org/10.1016/j.arth.2023.03.071

Nijweide, P. J., Burger, E. H., & Klein-Nulend, J. (2002). The Osteocyte. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology* (2nd ed., Vol. 1, pp. 93–107). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1.50108-6

Ochoa, D., Aguilar, R., & Méndez, A. (2015). Investigación y Ciencia Investigación y Ciencia. *Investigación y Ciencia, Universidad Autónoma de Aguascalientes*, *62*(64), 11–18. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67443217010%0Ahttp://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67403706%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5490359

Oliveira, É. R., Nie, L., Podstawczyk, D., Allahbakhsh, A., Ratnayake, J., Brasil, D. L., & Shavandi, A. (2021). Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 903*, *22*(2), 903. https://doi.org/10.3390/IJMS22020903

Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *9*(1), 18. https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18

Ospina, M. Y., Jiménez, A. N., Beltran, L. N., Gachancipá, J. F., Steffens, G., González, M. M., & González, M. I. (2023). Ingeniería de tejidos en población pediátrica: una esperanza para el tratamiento de enfermedades valvulares mitrales congénitas. *Cirugía Cardiovascular*, *30*(3), 141–150. https://doi.org/10.1016/J.CIRCV.2022.10.006

Owen, R., Sherborne, C., Evans, R., Reilly, G. C., & Claeyssens, F. (2020). Combined Porogen Leaching and Emulsion Templating to produce Bone Tissue Engineering Scaffolds. *International Journal of Bioprinting*, *6*(2), 265. https://doi.org/10.18063/IJB.V6I2.265

Paterson, T. E., Owen, R., Sherborne, C., Bahmaee, H., Harding, A. L., Green, N. H., Reilly, G. C., & Claeyssens, F. (2024). Highly porous polycaprolactone microspheres for skeletal repair promote a mature bone cell phenotype *in vitro*. *Journal of Materials Chemistry B*. https://doi.org/10.1039/D4TB01532K

Pereira, H. F., Cengiz, I. F., Silva, F. S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2020). Scaffolds and coatings for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *31*(3), 1–16. https://doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y

Perez, V., Jiménez, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019). Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *139*, 262–269. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.198

Piñaloza, L., & Ramírez, V. (2023). *Caracterización in vitro de andamios biológicos elaborados a partir de biopolímeros naturales para aplicaciones en ingeniería de tejidos.* Universidad Técnica de Ambato.

Poddar, D., Majood, M., Singh, A., Mohanty, S., & Jain, P. (2021). Chitosan-coated pore wall polycaprolactone three-dimensional porous scaffolds fabricated by

porogen leaching method for bone tissue engineering: a comparative study on blending technique to fabricate scaffolds. *Progress in Biomaterials*, *10*(4), 281. https://doi.org/10.1007/S40204-021-00172-5

Prananingrum, W., Naito, Y., Galli, S., Bae, J., Sekine, K., Hamada, K., Tomotake, Y., Wennerberg, A., Jimbo, R., & Ichikawa, T. (2016). Bone ingrowth of various porous titanium scaffolds produced by a moldless and space holder technique: An *in vivo* study in rabbits. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, *11*(1). https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/015012,

Prieto, E. M., & Guelcher, S. A. (2014a). Tailoring properties of polymeric biomedical foams. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, 129–162. https://doi.org/10.1533/9780857097033.1.129

Prieto, E. M., & Guelcher, S. A. (2014b). Tailoring properties of polymeric biomedical foams. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, 129–162. https://doi.org/10.1533/9780857097033.1.129

Raeisdasteh Hokmabad, V., Davaran, S., Ramazani, A., & Salehi, R. (2017). Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. In *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (Vol. 28, Issue 16, pp. 1797–1825). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1354674

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. A. (2021). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*, *13*, 1105. https://doi.org/10.3390/polym13071105

Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *27*(18), 3413–3431. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.039

Rodriguez, S., Guzman, S., Barreno, S., Rubio, B., & Nava, A. (2019). Hemostasia y factores asociados a tendencia. In *Revista Mexicana de Patologia y Medicina de Laboratorio* .

Ruiz, C., Olivares, U., Drew, R. A. L., Aguilar, E. A., & Alfonso, I. (2021). Porogen Effect on Structural and Physical Properties of β-TCP Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *IRBM*, *42*(5), 302–312. https://doi.org/10.1016/J.IRBM.2020.05.007

Sandle, T. (2019). Selection and Application of Culture Media. *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare*, 103–123. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814911-9.00007-9

Santos, V., Ardao, I., Goimil, L., Gomez, J. L., & García, C. A. (2021). Solvent-Free Processing of Drug-Loaded Poly(ε-Caprolactone) Scaffolds with Tunable Macroporosity by Combination of Supercritical Foaming and Thermal Porogen Leaching. *Polymers* , *13*(1), 159. https://doi.org/10.3390/POLYM13010159

Satchanska, G., Davidova, S., & Petrov, P. D. (2024). Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications. *Polymers* , *16*(8), 1159. https://doi.org/10.3390/POLYM16081159

Selvaraj, V., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., & Warrier, S. (2024). Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differentiation*, *136*, 100757. https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2024.100757

Seong, J. M., Kim, B. C., Park, J. H., Kwon, I. K., Mantalaris, A., & Hwang, Y. S. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials* , *5*(6). https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/6/062001

Sethu, S. N., Namashivayam, S., Devendran, S., Nagarajan, S., Narashiman, S., Ramschandran, M., & Ambigapathi, M. (2017). Nanoceramics on osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *98*, 67–74. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.01.089

Shih, M. F., Shau, M. Da, Chang, M. Y., Chiou, S. K., Chang, J. K., & Cherng, J. Y. (2006). Platelet adsorption and hemolytic properties of liquid crystal/composite polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, *327*(1–2), 117–125. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.043

Singh, B. N., Veeresh, V., Mallick, S. P., Sinha, S., Rastogi, A., & Srivastava, P. (2020). Generation of scaffold incorporated with nanobioglass encapsulated in chitosan/chondroitin sulfate complex for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *153*, 1–16. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.173

Singh, Y. P., & Dasgupta, S. (2022). Gelatin-based electrospun and lyophilized scaffolds with nano scale feature for bone tissue engineering application: review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *33*(13), 1704–1758.

https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2068943;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

Singhawannurat, S., Lawtae, P., Rojviriya, C., & Phoovasawat, C. (2024). Development of PLA/HA porous scaffolds with controlled pore sizes using the combined freeze drying and sucrose leaching technique for bone tissue engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, *34*(2), 1928–1928. https://doi.org/10.55713/JMMM.V34I2.1928

Sivashankari, P. R., & Prabaharan, M. (2017). Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. In *Chitosan Based Biomaterials: Fundamentals: Volume 1* (Vol. 1, pp. 117–133). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00005-4

Souza, A., Parnell, M., Rodriguez, B. J., & Reynaud, E. G. (2023). Role of pH and Crosslinking Ions on Cell Viability and Metabolic Activity in Alginate–Gelatin 3D Prints. *Gels* , *9*(11), 853. https://doi.org/10.3390/GELS9110853

Sun, X., Li, X., Tian, P., Zhao, J., Xin, H., Ma, X., & Yuan, X. (2023). The Sequential and Systemic Administration of BMP-2 and SDF-1α Nanocapsules for Promoting Osteoporotic Fracture Healing. *Biomimetics*, *8*(4), 369. https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS8040369

Tabrizian, P., Davis, S. A., & Su, B. (2024). From bone to nacre – development of biomimetic materials for bone implants: a review. *Biomaterials Science*, *12*(22), 5680–5703. https://doi.org/10.1039/D4BM00903G

Tajvar, S., Hadjizadeh, A., & Samandari, S. S. (2023). Scaffold degradation in bone tissue engineering: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *180*. https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2023.105599

Tasci, M. E., Dede, B., Tabak, E., Gur, A., Sulutas, R. B., Cesur, S., Ilhan, E., Lin, C. C., Paik, P., Ficai, D., Ficai, A., & Gunduz, O. (2021). Production, Optimization and Characterization of Polylactic Acid Microparticles Using Electrospray with Porous Structure. *Applied Sciences 2021, Vol. 11, Page 5090*, *11*(11), 5090. https://doi.org/10.3390/APP11115090

Tresguerres, F. G. F., Torres, J., López-Quiles, J., Hernández, G., Vega, J. A., & Tresguerres, I. F. (2020). The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Annals of Anatomy*, *227*, 151422. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151422

Van der Ploeg, C. A., Viñas, M. R., Terragno, R., Bruno, S. B., & Binsztein, N. (2010). Laboratory Protocol: "Serotyping of Shigella spp." *Geneva: WHO Global Foodborne Infections Network*.

Velasco, M. A., Toro, L. F., & Garzón, D. A. (2023). Andamios porosos para ingeniería de tejidos óseos: características geométricas, requerimientos de uso, y materiales y métodos de manufactura aditiva. *Ingeniería y Competitividad*, *25*(3). https://doi.org/10.25100/iyc.v25i3.12572

Von Euw, S., Wang, Y., Laurent, G., Drouet, C., Babonneau, F., Nassif, N., & Azaïs, T. (2019). Bone mineral: new insights into its chemical composition. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44620-6

Wang, C., Huang, W., Zhou, Y., He, L., He, Z., Chen, Z., He, X., Tian, S., Liao, J., Lu, B., Wei, Y., & Wang, M. (2020). 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*, *5*(1), 82–91. https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2020.01.004

Wang, T., Wang, I., Lu, J., & Young, T. (2012). Novel chitosan-polycaprolactone blends as potential scaffold and carrier for corneal endothelial transplantation. *Molecular Vision*, *18*, 255.

Wang, Z., Wang, Z., Lu, W. W., Zhen, W., Yang, D., & Peng, S. (2017). Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Materials 2017 9:10*, *9*(10), e435–e435. https://doi.org/10.1038/am.2017.171

Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., & Avci, M. (2018). Blood-Contacting Biomaterials: *In vitro* Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*, 99. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2018.00099

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, *29*(20), 2941–2953. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023

Wróblewska, J., Rydzkowski, T., Michalska, I., & Thakur, V. K. (2019). Biopolymers for Biomedical and Pharmaceutical Applications: Recent Advances and Overview of Alginate Electrospinning. *Nanomaterials* , *9*(3), 404. https://doi.org/10.3390/NANO9030404

Wu, E., Huang, L., Shen, Y., Wei, Z., Li, Y., Wang, J., & Chen, Z. (2024). Application of gelatin-based composites in bone tissue engineering. *Heliyon*, *10*(16), e36258. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E36258

Xiang, P., Wang, S. S., He, M., Han, Y. H., Zhou, Z. H., Chen, D. L., Li, M., & Ma, L. Q. (2018). The *in vitro* and *in vivo* biocompatibility evaluation of electrospun recombinant spider silk protein/PCL/gelatin for small caliber vascular tissue engineering scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *163*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.020

Xu, C., Ban, M., Zhang, H., Liu, Q., & Ren, L. (2022). Direct ink writing of porous Fe-HA metal-matrix composites (MMCs) with independently adjustable porosity and degradation rate for bone implant applications. *Materials & Design*, *224*, 111319. https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2022.111319

Xu, C., Liu, Z., Chen, X., Gao, Y., Wang, W., Zhuang, X., Zhang, H., & Dong, X. (2024). Bone tissue engineering scaffold materials: Fundamentals, advances, and challenges. *Chinese Chemical Letters*, *35*(2), 109197. https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2023.109197

Xue, N., Ding, X., Huang, R., Jiang, R., Huang, H., Pan, X., Min, W., Chen, J., Duan, J. A., Liu, P., & Wang, Y. (2022). Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects. *Pharmaceuticals* , *15*(7), 879. https://doi.org/10.3390/PH15070879

Yang, R., Wang, R., Abbaspoor, S., Rajan, M., Turki Jalil, A., Mahmood Saleh, M., & Wang, W. (2023). *In vitro* and *in vivo* evaluation of hydrogel-based scaffold for bone tissue engineering application. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*(7), 104799. https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2023.104799

Yim, E. K. F., Liao, I. C., & Leong, K. W. (2007). Tissue compatibility of interfacial polyelectrolyte complexation fibrous scaffold: Evaluation of blood compatibility and biocompatibility. *Tissue Engineering*, *13*(2), 423–433. https://doi.org/10.1089/ten.2006.0113

Zakeri, M., Moghadam, H., Samimi, A., & Mohebbi-Kalhori, D. (2019). Optimization of calcium alginate beads production by electrospray using response surface methodology. *Materials Research Express*, *6*(9). https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab3377

Zarur, M., Seijo, A., Goyanes, A., Concheiro, A., & Alvarez, C. (2023). pH-responsive scaffolds for tissue regeneration: *In vivo* performance. *Acta Biomaterialia*, *168*, 22–41. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2023.07.025

Zenebe, C. G. (2022). A Review on the Role of Wollastonite Biomaterial in Bone Tissue Engineering. *BioMed Research International*, *2022*. https://doi.org/10.1155/2022/4996530

Zhang, L., Yang, G., Johnson, B. N., & Jia, X. (2019). Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*, *84*, 16–33. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.11.039

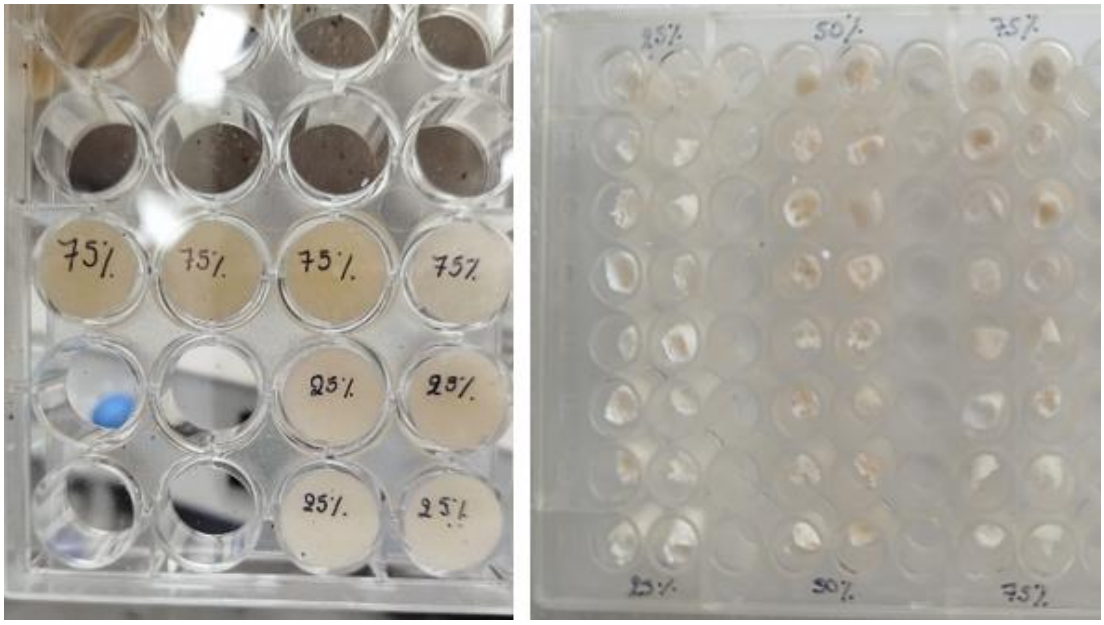
Zhang, S., Shi, T., Wu, G., Zhang, Q., & Ma, P. (2022). Preparation and property of soluble hemostatic material with 3D knitted structure. *Journal of Industrial Textiles*, *52*. https://doi.org/10.1177/15280837221107399

Zhang, X. Y., Fang, G., & Zhou, J. (2017). Additively Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering and the Prediction of their Mechanical Behavior: A Review. *Materials* , *10*(1), 50. https://doi.org/10.3390/MA10010050

Zhou, X., Zhang, D., Wang, M., Zhang, D., & Xu, Y. (2019). Three-Dimensional Printed Titanium Scaffolds Enhance Osteogenic Differentiation and New Bone Formation by Cultured Adipose Tissue-Derived Stem Cells Through the IGF-1R/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Pathway. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *25*, 8043. https://doi.org/10.12659/MSM.918517

ANEXOS

Anexo 1. Estandarización de ABs a placas de 96 pocillos



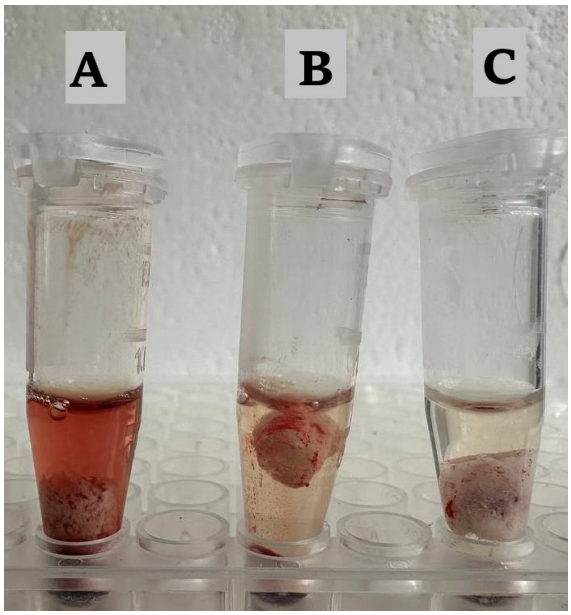
Anexo 2. Valores de absorbancia obtenidos para determinación del BCI.

Andamios con diferentes concentraiones de microesferas	N° réplicas	Muestra (Is)	Celda vacia (Io)	Solución de referencia (Ir)	(Ior)	Índice de coagulación (BCI)
25%	1	0.1695	0.052	0.2277	0.0841	82%
	2	0.1748	0.052			86%
	3	0.1753	0.051			87%
50%	1	0.1866	0.050			95%
	2	0.1873	0.049			96%
	3	0.1825	0.049			93%
75%	1	0.1911	0.051			98%
	2	0.1914	0.051			98%
	3	0.1920	0.051			98%

Anexo 3. Media y desviación estándar del % BCI.

Andamios con diferentes concentraciones de microesferas	Índice de coagulación (BCI)	Desviación estándar
25%	85%	0.00025
50%	95%	0.00667
75%	98%	0.00674

Anexo 4. Concentración hemolítica aplicada en ABs PCL/QS 25%, 50% y 75% de microesferas



Anexo 5. Valores de absorbancia obtenidos para determinación del % Hemolisis.

Muestras	N° réplicas	[Hemoglobina] (Is)	Control + (Ir)	Control - (Io)	% Hemólisis
25%	1	0.1823	0.2851	0.1788	3.29%
	2	0.1806			1.69%
	3	0.1815			2.54%
50%	1	0.1846			5.46%
	2	0.1858			6.59%
	3	0.1868			7.53%
75%	1	0.1994			19.38%
	2	0.1960			16.18%
	3	0.1946			14.86%
Sangre	1	0.2851			100.00%

Anexo 6. Media y desviación estándar del % Hemólisis.

Muestras	% Hemólisis	Desviación estándar
25%	3%	0.0080
50%	7%	0.0104
75%	17%	0.0232
Sangre	100%	0.0000

Anexo 7. Valores de absorbancia obtenidos para determinación del % Hemoglobina.

Muestras	N° réplicas	Muestra (Is)	Normalización	Factor de conversión	[Hemoglobina] g/dl	[Hemoglobina] mg/dl
	1	0.2249	0.2294		6.74	6744.36
25%	2	0.2302	0.2347		6.90	6900.18
	3	0.2163	0.2208		6.49	6491.52
	1	0.2356	0.2401		7.06	7058.94
50%	2	0.2175	0.2220	29.4	6.53	6526.80
	3	0.2296	0.2341		6.88	6882.54
	1	0.2426	0.2471		7.26	7264.74
75%	3	0.2416	0.2461		7.24	7235.34
	4	0.2555	0.2600		7.64	7644.00

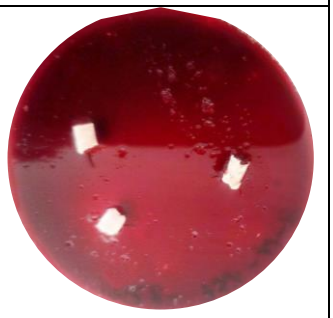
Anexo 8. Media y desviación estándar de la concentración de hemoglobina.

Muestras	[Hemoglobina] mg/dl	Desviación estándar
25%	6712.02	206.24
50%	6822.76	271.06
75%	7381.36	227.93

Anexo 9. Valores de absorbancias obtenidos del porcentaje de liberación de LDH

[microesferas]	N° réplicas	Sobrenadante (Is)	Normalización	Control - (Io) PRP +PBS	Control + (Ir) PRP + triton X-100	Liberación de LDH (%)
	1	0.8835	0.0088			33%
25%	2	0.8876	0.0089			30%
	3	0.8872	0.0089			31%
	1	0.8679	0.0087			43%
50%	2	0.8712	0.0087	0.009335	0.00782	41%
	3	0.8790	0.0088			36%
	1	0.8877	0.0089			30%
75%	2	0.8971	0.0090			24%
	3	0.8916	0.0089			28%
Plasma	1	0.9335	0.0078			100%

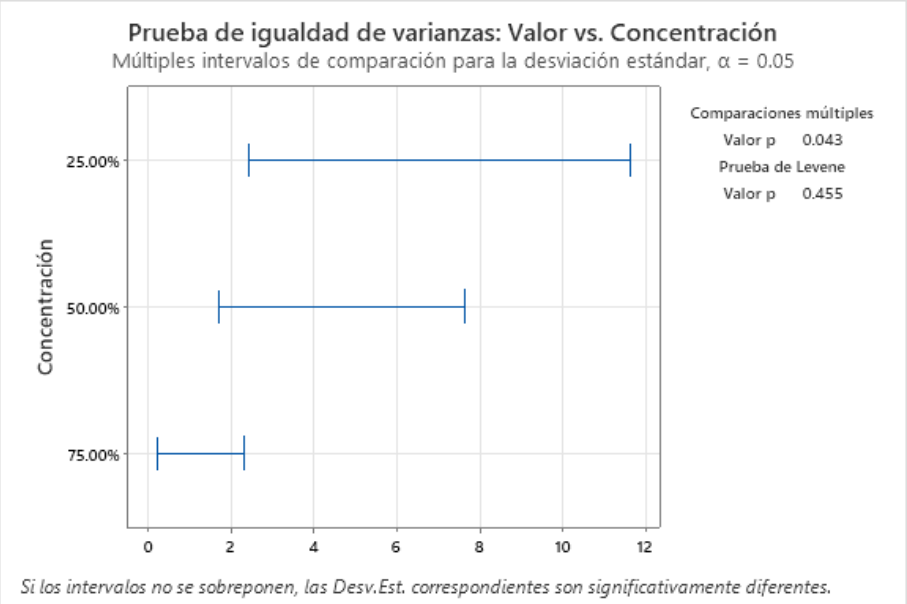
Anexo 10. Esterilización de ABs bajo 1h en luz UV.

	ABs 25% microesferas	**ABs 50% microesferas**	**ABs 75% microesferas**
ABs N – E			
ABs SN - E			

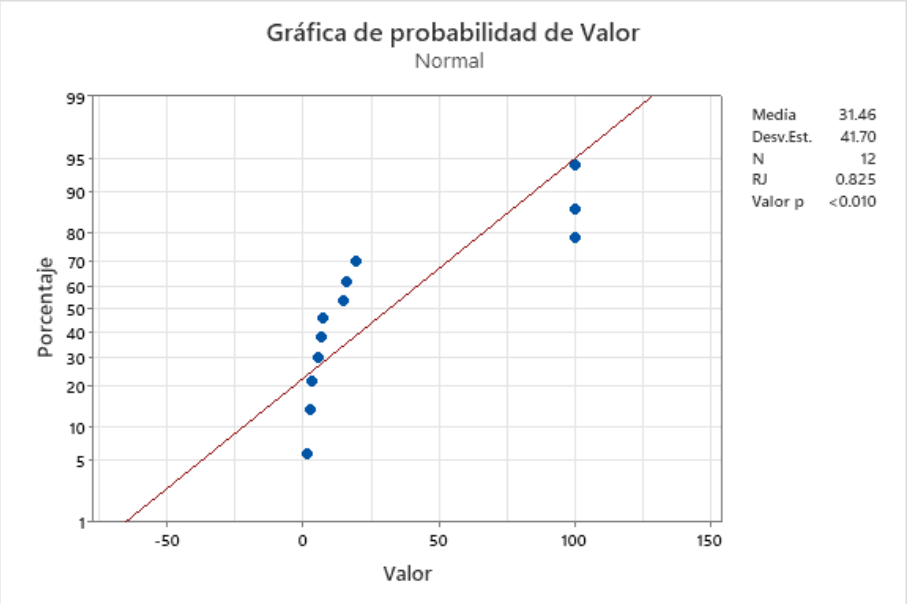
Anexo 11. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de coagulación *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk.



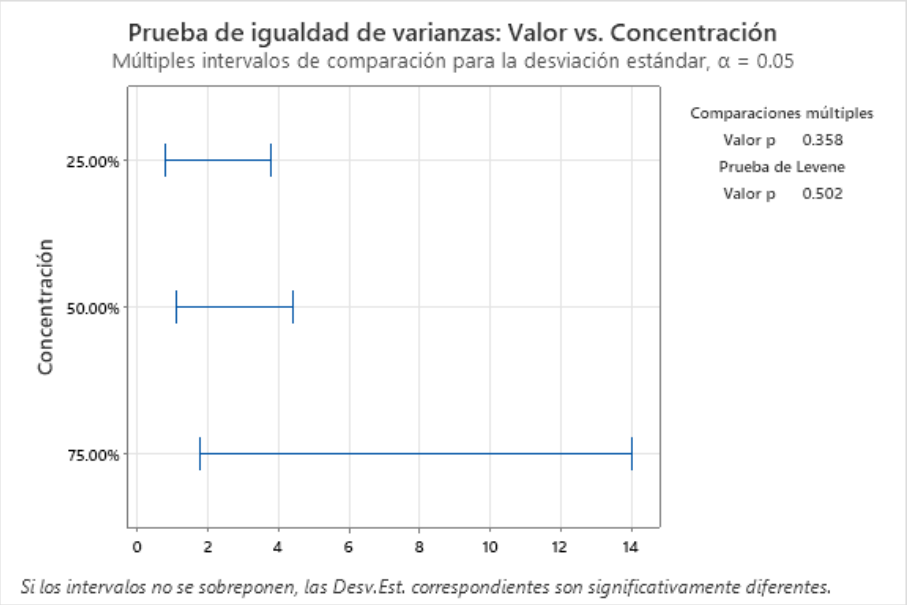
Anexo 12. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de coagulación *in vitro* mediante la prueba de Levenne.



Anexo 13. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de hemólisis *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk.



Anexo 14. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de hemólisis *in vitro* mediante la prueba de Levenne.



Anexo 15. Estadística descriptiva para la prueba de Kruskal-Wallis en la aplicación del ensayo de hemólisis.

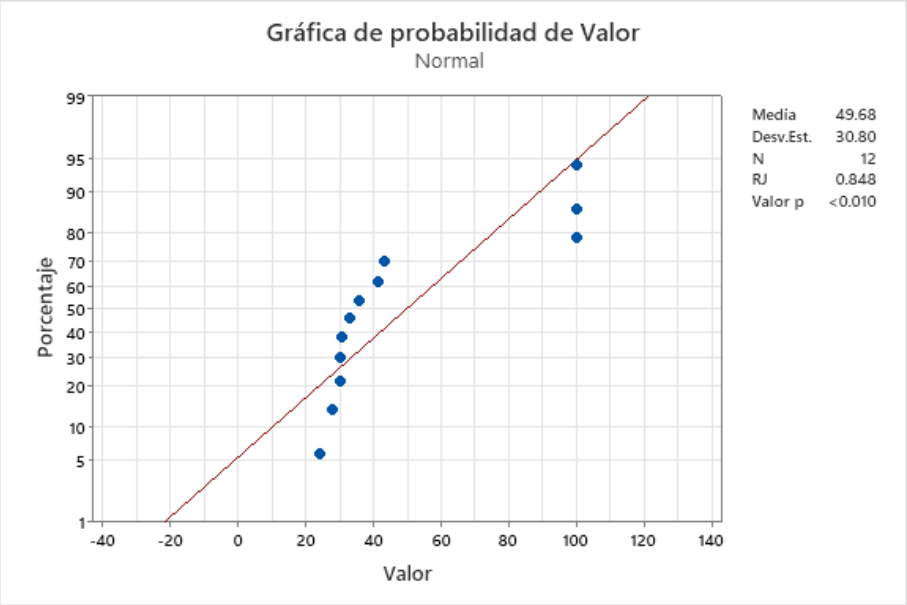
Concentración	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
25.00%	3	50.38	3.0	-1.94
50.00%	3	51.42	4.0	-1.39
75.00%	3	54.27	8.0	0.83
Control	3	100.00	11.0	2.50
General	12		6.5	

Anexo 16. Prueba de Kruskal-Wallis aplicad en el ensayo de hemolisis.

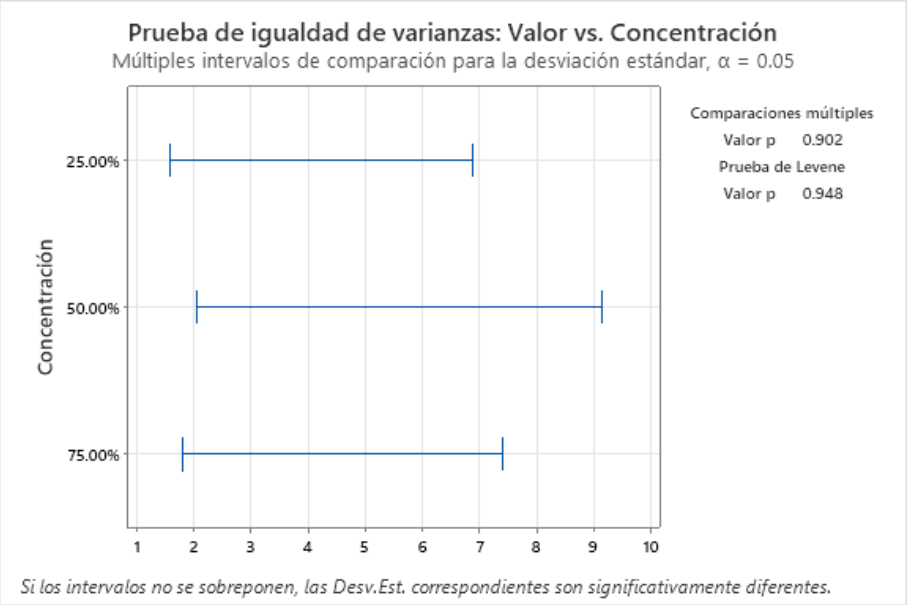
Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	9.46	0.024

Ajustado para empates	3	9.60	0.022

Anexo 17. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de adhesión de glóbulos *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk.



Anexo 18. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de adhesión de glóbulos rojos *in vitro* mediante la prueba de Levenne.



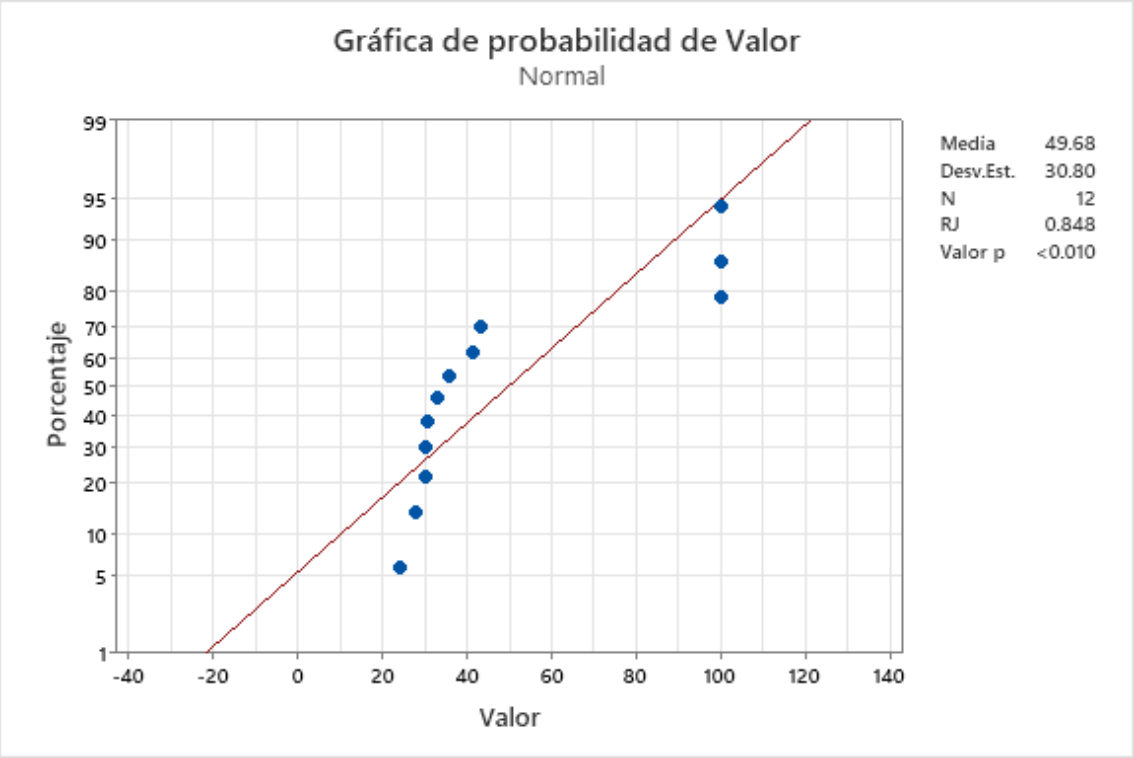
Anexo 19. Estadística descriptiva para la prueba de Kruskal-Wallis en la aplicación del ensayo de adhesión de glóbulos rojos.

Concentración	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
25.00%	3	2.54	2.0	-2.50
50.00%	3	6.59	5.0	-0.83
75.00%	3	16.18	8.0	0.83
Control	3	100.00	11.0	2.50
General	12		6.5	

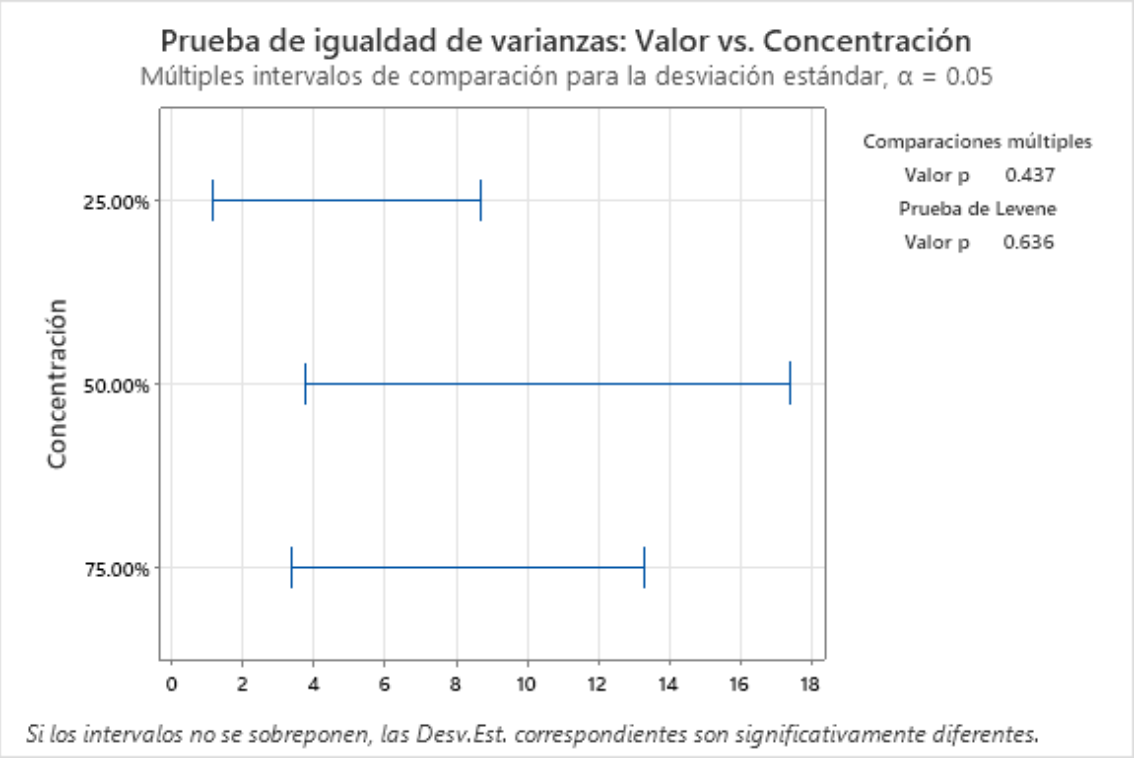
Anexo 20. Prueba de Kruskal-Wallis aplicad en el ensayo de adhesión de glóbulos rojos

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	10.38	0.016
Ajustado para empates	3	10.53	0.015

Anexo 21. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de adhesión plaquetaria *in vitro* mediante la prueba de Shapiro-Wilk



Anexo 22. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de adhesión de adhesión plaquetaria *in vitro* mediante la prueba de Levenne.



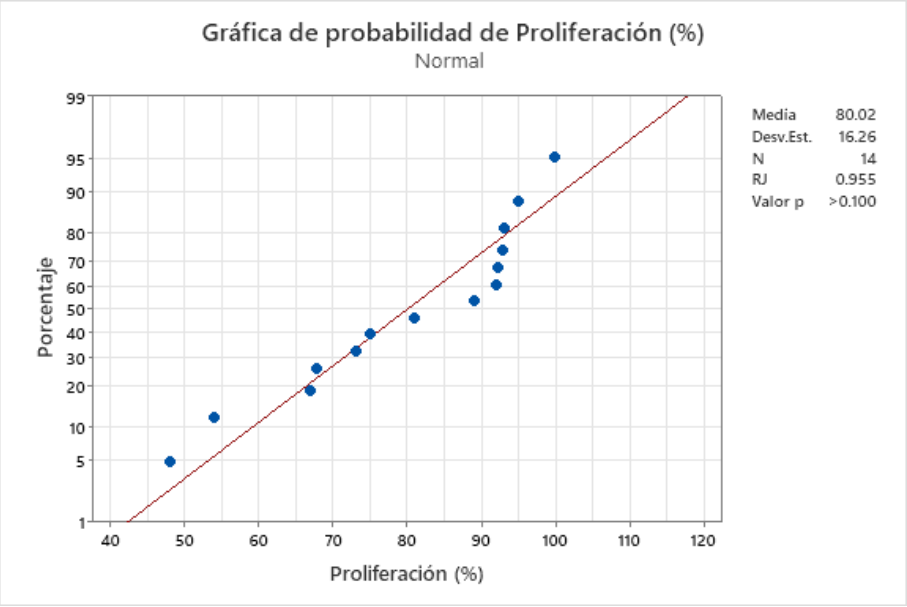
Anexo 23. Estadística descriptiva para la prueba de Kruskal-Wallis en la aplicación del ensayo de adhesión plaquetaria.

Concentración	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
25.00%	3	50.38	3.0	-1.94
50.00%	3	51.42	4.0	-1.39
75.00%	3	54.27	8.0	0.83
Control	3	100.00	11.0	2.50
General	12		6.5	

Anexo 24. Prueba de Kruskal-Wallis aplicad en el ensayo de adhesión plaquetaria.

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	9.46	0.024
Ajustado para empates	3	9.60	0.022

Anexo 25. Resultados obtenidos para los supuestos de normalidad en el ensayo de inhibición antimicrobiana mediante la prueba de Shapiro-Wilk

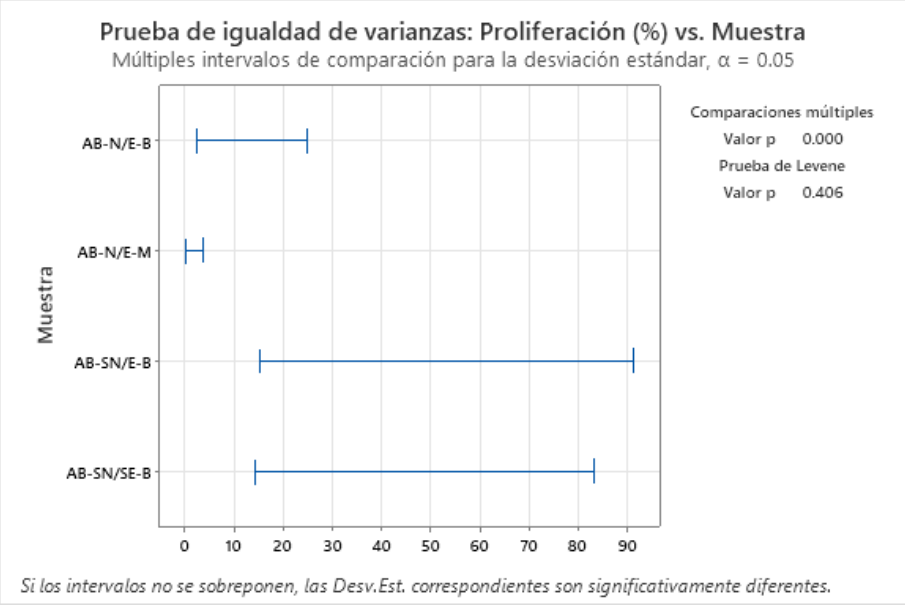


Anexo 26. Prueba de Homogeneidad mediate la prueba de Levenne aplicado al ensayo de inhibición antimicrobiana.

Método	Estadística de prueba	Valor p
Comparaciones múltiples	—	0.000
Levene	1.09	0.406

Las muestras se excluyen de las pruebas si sus desviaciones estándar son 0 o valores faltantes.

Anexo 27. Resultados obtenidos para los supuestos de homogeneidad en el ensayo de inhibición antimicrobiana mediante la prueba de Levenne.



Anexo 28

Protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos CEISH-FCS-UTA 090-CEISH-UTA-2025, con código 090-CEISH-UTA-2025.

Ambato, 12 de junio de 2025
COD. 090-CEISH-UTA-2025

Sra. PhD.
Lorena de los Ángeles Núñez Villacis
INVESTIGADORA PRINCIPAL,
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO (UTA)

ASUNTO: CARTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

De nuestra consideración

Por medio del presente y una vez revisado el protocolo de investigación con el Tema **"Desarrollo de modelos celulares tridimensionales para investigación biomédica y medicina regenerativa"** presentado por usted en calidad de Investigadora del mismo, que fuera ingresado al Comité de Ética para la Investigación en Seres Humanos – UTA, se comunica que fue **APROBADO** para su ejecución, en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, con la participación de investigadores de la UTA, de la Universidad San Francisco de Quito y la Universidad Técnica Particular de Loja, con fecha 29 de mayo de 2025, por cuanto cumple con los requisitos y normas establecidas por el reglamento de este Comité, en lo metodológico, ético y legal. El código asignado es 090-CEISH-UTA-2025

Como respaldo de lo indicado, reposan en los archivos del CEISH-UTA, tanto los requisitos presentados por la investigadora, así como también los formularios empleados por el comité para la evaluación del mencionado proyecto.

En tal virtud, los documentos aprobados por el CEISH-UTA que se adjuntan en físico a la presente carta de aprobación son los siguientes: copia del protocolo de investigación tema **"Desarrollo de modelos celulares tridimensionales para investigación biomédica y medicina regenerativa",** Versión 1, con 26 páginas, incluido el formulario de Consentimiento informado, Carta de interés, carta de no conflicto de intereses, carta de responsabilidad del investigador e informe de evaluación aprobado el 29 de mayo de 2025.

Cabe indicar que la información presentada es de responsabilidad exclusiva de la Investigadora del proyecto**,** Lorena de los Ángeles Núñez Villacis, quien asume la veracidad, originalidad y autoría de estos.

Así, también, se recuerda las obligaciones que Lorena de los Ángeles Núñez Villacis, Investigadora del proyecto debe cumplir durante y después de la ejecución del proyecto con el tema **"Desarrollo de modelos celulares tridimensionales para investigación biomédica y medicina regenerativa"** a realizarse en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, ubicados en la UTA, con la participación de investigadores de la UTA, de la Universidad San Francisco de Quito y la Universidad Técnica Particular de Loja.

- Informar al CEISH- UTA la fecha de inicio y culminación de la investigación.
- Cumplir todas las actividades que le corresponden como investigador, así como las descritas en el protocolo con sus tiempos de ejecución, según el cronograma establecido en dicho proyecto, vigilando y respetando siempre los aspectos éticos, metodológicos y jurídicos aprobados en el mismo.
- Aplicar el consentimiento informado a todos los participantes, respetando el proceso definido en el protocolo y el formato aprobado.
- Al finalizar la investigación, entregar al CEISH-UTA el informe final del proyecto y el enlace de la(s) publicación(es) en caso de que se realicen.

Atentamente,

Firmado electrónicamente por:
AIDA FABIOLA AGUILAR SALAZAR
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Aida Fabiola Aguilar Salazar
PRESIDENTE CEISH – UTA

Firmado electrónicamente por:
CRISTINA ALEXANDRA ARTEAGA ALMEIDA
Validar únicamente con FirmaEC

Cristina Alexandra Arteaga, PhD
SECRETARIA - CEISH - UTA