UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE BIOTECNOLOGIA

Tema: Caracterización biológica de andamios elaborados con nanocelulosa vegetal y quitosano.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo 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: Sebastián Patricio Páez Vayas

Tutor: Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

APROBACION 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, autoriza 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 titulación y Grados de la Facultad de Ciencias en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de junio de 2025



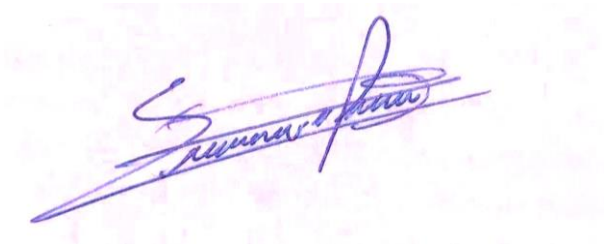
Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C.I. 1804256905

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Sebastián Patricio Páez Vayas, manifiesto que los resultados obtenidos en el Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Sebastián Patricio Páez Vayas

1850106764

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.



Sebastián Patricio Páez Vayas

1850106764

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 firma:

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:
GABRIELA ELENA VIZUETE FIALLOS
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. Gabriela Elena Vizuete Fiallos

C.I. 1715956213

Ambato, 07 de julio de 2025

DEDICATORIA

Dedico cada esfuerzo, cada noche de estudio y cada paso dado en esta carrera a quienes han sido mi refugio y fortaleza: mi madre, mi padre y mi hermana. Ellos, con su amor incondicional, paciencia infinita y apoyo constante, han sido el pilar que sostuvo mis días más difíciles y la luz que iluminó mis metas cuando parecían lejanas. Todo lo que he alcanzado, lo he hecho por y para ellos.

A mi familia, que con palabras de aliento y gestos sinceros me recordaron que no estaba solo, y que rendirse nunca fue una opción.

A Dios, por darme la oportunidad de soñar y la fuerza para convertir esos sueños en realidad.

Y a mí mismo… por no rendirme. Por seguir adelante cuando todo parecía estar en contra, por fortalecer mi mente y mi espíritu, por creer en mi valía cuando más lo necesitaba. Esta carrera me enseñó que la perseverancia es más poderosa que el miedo, y esa lección la llevaré conmigo para siempre.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios sobre todas las cosas, una enseñanza que me transmitió mi madre y que llevo siempre conmigo, junto con su ejemplo y fortaleza.

A mis padres, Luis y Cecibel, y a mi hermana Sofía, por su apoyo incondicional y su amor constante. Han sido mi base durante todo este camino, y siempre estaré profundamente agradecido por su acompañamiento, motivación y confianza en mí.

A mi familia, especialmente a mis tíos Guillermo y Dorita, a mi tía Eli, a mis primos Pepe, Majito, Big D, y a mi prima Cris, quienes fueron un apoyo increíble.

Agradezco sinceramente a mi tutora, PhD. Lorena Núñez, por darme la oportunidad de trabajar bajo su guía. Su apoyo, paciencia, tiempo y consejos fueron fundamentales no solo en lo académico, sino también en lo personal. Gracias por su confianza y por ser un referente de compromiso y dedicación.

También extiendo mi agradecimiento a la Ing. Carla Peñafiel, Ing. Santiago Cadena, Ing. María Daniela Garcés, Ing. María Eugenia Garica y Químico Lander, por su disponibilidad, sus recomendaciones, la facilitación de materiales y equipos, y, sobre todo, por su disposición a compartir conocimientos de manera generosa.

A mis amigos, quienes formaron parte esencial de esta etapa: Chino, Diana, Paul y Alejo, gracias por los buenos momentos, el compañerismo y las experiencias compartidas. Agradezco también a Joss, por el tiempo que me dio, y a Wen, por ser un apoyo constante e incondicional durante el proceso de tesis. A Mateo, Jael, Fernando, Nicole, Danny y Pato, gracias por estar presentes, por las conversaciones, los consejos, las jornadas de estudio y también por los momentos de distracción que ayudaron a equilibrar todo este proceso.

A todos, gracias por ser parte de este recorrido.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACION DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS viii
ÍNDICE DE TABLAS xii
INDICE DE FIGURAS xiii
ÍNDICE DE ANEXOS xiv
GLOSARIO xv
RESUMEN EJECUTIVO xvi
ABSTRACT xvii
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes Investigativos 1
1.1.1. Cáncer de próstata (CaP) 2
1.1.2. Modelos Experimentales para el estudio de cáncer de próstata 2
1.1.2.1. Modelos Experimentales 2D 3
1.1.2.2. Modelos Experimentales 3D 3
1.1.3. Componentes necesarios para el cultivo celular en 3D. 5
1.1.3.1. Células 5
1.1.3.2. Factores de crecimiento (GF) 6
1.1.3.3. Andamios Biológicos (scaffolds) 7
1.1.4. Métodos para la elaboración de andamios biológicos 8
1.1.4.1. Métodos convencionales 9
1.1.4.2. Liofilización 9

1.1.5. Biopolímeros para la fabricación de andamios biológicos 10
1.1.5.1. Biopolimeros sintéticos 11
1.1.5.2. Biopolímeros naturales 11
1.1.5.3. Nanocelulosa como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos 12
1.1.5.4. Quitosano como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos 13
1.1.6. Extracción de nanocelulosa a partir de residuos de banano para su aplicación como biomaterial en la elaboración de andamios biológicos 14
1.1.6.1. Residuos del banano 14
1.1.6.2. Métodos de extracción de nanocelulosa 14
1.2. Objetivos 16
1.2.1. Objetivo General 16
1.2.2. Objetivos Específicos 16
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA 17
2.1. Materiales 17
2.1.1. Reactivos 17
2.1.2. Material fungible 18
2.1.3. Equipos de laboratorio 18
2.2. Métodos 19
2.2.1. Construir andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano por el método de criodesecación 19
2.2.1.1. Obtención del residuo del banano (*Musa paradisiaca*) 19
2.2.1.2. Pretratamiento del residuo vegetal 19
2.2.1.3. Extracción de la celulosa vegetal. 20
2.2.1.4. Extracción y obtención de nanocelulosa mediante hidrolisis ácida 20
2.2.1.5. Obtención de quitosano 20
2.2.2. Elaboración de un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal y quitosano mediante liofilización 21
2.2.2.1. Preparación de solución de nanocelulosa con quitosano para la liofilización 21

2.2.2.2. Formación de andamios biológicos por liofilización 21
2.2.3. Análisis de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas 21
2.2.3.1. Capacidad máxima de hinchazón y degradación del andamio 22
2.2.3.2. Coagulación de sangre entera *in vitro* 22
2.2.3.3. Ensayo de hemólisis in vitro 23
2.2.3.4. Adhesión de glóbulos rojos *in vitro* 23
2.2.3.5. Adhesión plaquetaria *in vitro* 24
2.2.4. Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares. 24
2.2.4.1. Preparación del medio de cultivo 24
2.2.4.2. Neutralización de los andamios 25
2.2.4.3. Esterilización de los andamios 25
Esterilización por luz UV 25
2.2.4.4. Evaluación de la actividad microbiana 25
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27
3.1. Análisis de resultados 27
3.1.1. Obtención de nanocelulosa 27
3.1.1.1. Obtención de nanocelulosa 27
3.1.2. Construcción andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano por el método de criodesecación. 29
3.1.2. Análisis de la hemocompatibilidad de los andamios biológicos por medio de pruebas hemostáticas 30
3.1.2.1. Evaluación de la capacidad máxima de hinchazón 30
3.1.2.2. Biodegradabilidad de los andamios biológicos 34
3.1.2.3. Evaluación coagulación de sangre entera *in vitro* 36
3.1.2.5. Evaluación de adhesión glóbulos rojos *in vitro* 41
3.1.2.6. Evaluación plaquetaria *in vitro* 43

3.1.2. Verificación si los andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano poseen condiciones óptimas para futuros ensayos con líneas celulares 45
3.1.2.1. Neutralización de los andamios 45
3.1.2.2. Esterilización de los andamios biológicos 46
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 52
4.1. Conclusiones 52
4.2. Recomendaciones 53
BIBLIOGRAFÍA 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Cantidades obtenidos de los diversos procesos para la obtención de nanocelulosa a partir de residuo vegetal* 27
Tabla 2. *Rendimiento de la extracción de nanocelulosa vegetal* 28
Tabla 3. *Composición de los andamios biológicos elaborados por liofilización.* 29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Andamios 3D como modelo para el estudio del cáncer* 5
Figura 2. *Partes esenciales para el desarrollo de cultivos 3D* 7
Figura 3. *Andamios biológicos elaborados mediante liofilización* 10
Figura 4. *Extracción de nanocelulosa* 15
Figura 5. *Andamios biológicos de nanocelulosa/quitosanos obtenidos mediante liofilización.* 30
Figura 6. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (PBS). 31
Figura 7. *Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (Agua destilada).* 32
Figura 8. Porcentaje de peso residual de los ABs. 35
Figura 9. *Resultados evaluación coagulación de sangre entera in vitro.* 38
Figura 11. *Capacidad hemolítica (%) de los andamios biológicos in vitro.* 40
Figura 13. *Resultados evaluación de adhesión glóbulos rojos in vitro.* 42
Figura 15. *Resultados evaluación de adhesión plaquetaria in vitro.* 44
Figura 17. Neutralizacion de andamios de nanocelulosa/quitosano 46
Figura 18. *Evaluación del método de esterilidad UV en Agar Sangre* 47
Figura 19. *Evaluación de inhibición celular (Resazurina)* 49
Figura 20. *Evaluación de inhibición celular (Resazurina)* 50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Pretratamiento del material vegetal. 70
Anexo B. Hidrolisis del material vegetal 70
Anexo C. Extracción de nanocelulosa 71
Anexo D. Elaboración de andamios biológicos 71
Anexo E. Coagulación de sangre en andamios biológicos. 72
Anexo F. Hemolisis in vitro en andamios bioligicos 72
Anexo G. Adhesión de glóbulos rojos 73
Anexo H. Adhesión plaquetaria 73
Anexo I. Tablas con datos obtenidos para las pruebas morfológicas y biológicas. 74

GLOSARIO

AB: Andamio biológico

ABs: Andamios biológicos

CaP: Cancer de próstata

ECM: Matriz extracelular

RESUMEN EJECUTIVO

Los andamios biológicos, considerados estructuras tridimensionales, simulan el soporte de la matriz extracelular, favoreciendo la adhesión y proliferación celular. Su implementación en modelos experimentales 3D han adquirido relevancia en el estudio de diversas patologías, como el cáncer, ya que permiten analizar las respuestas celulares en condiciones más representativas del microambiente fisiológico *in vivo*. Se elaboraron andamios híbridos con concentraciones de 1 por ciento y 1.5 por ciento de nanocelulosa y quitosano, con sus 4 combinaciones posibles respectivamente, mediante liofilización. Se caracterizaron biológicamente mediante seis ensayos hemostáticos: degradación, hinchamiento máximo, índice de coagulación, hemólisis, adhesión de eritrocitos y plaquetas. Los andamios con mayor concentración de quitosano mostraron mejor estructura y desempeño, mientras que los de menor concentración fueron frágiles y menos aptos como modelo 3D. El diseño experimental reveló efectos significativos de los polímeros sobre cuatro pruebas hemostáticas, excepto en hemólisis, donde la nanocelulosa y la interacción no fueron significativas. En conclusión, la caracterización de los ABs elaborados sugiere que presentan propiedades adecuadas para su aplicación en futuros ensayos relacionados con el desarrollo de modelos 3D, orientados al estudio de patologías como el cáncer de próstata. Sin embargo, los ABs con mayor concentración de quitosano mostraron un desempeño físico y biológico superior. Estos andamios ofrecen condiciones favorables para ser utilizados en futuras evaluaciones de crecimiento y proliferación celular.

Palabras Claves: Andamios Biologicos, Nanocelulosa, Quitosano, Modelo Experimental 3D, Cultivo celular.

ABSTRACT

Biological scaffolds, considered three-dimensional structures, simulate the support provided by the extracellular matrix, promoting cell adhesion and proliferation. Their implementation in 3D experimental models has gained relevance in the study of various pathologies, such as cancer, as they allow the analysis of cellular responses under conditions that more closely resemble the native physiological microenvironment *in vivo*.

Hybrid scaffolds were fabricated using 1% and 1.5% concentrations of nanocellulose and chitosan, respectively, through freeze-drying. They were biologically characterized using six hemostatic assays: degradation, maximum swelling, coagulation index, hemolysis, erythrocyte adhesion, and platelet adhesion. Scaffolds with higher chitosan concentrations exhibited better structural integrity and overall performance, whereas those with lower concentrations were fragile and less suitable for use as 3D models. The experimental design revealed significant effects of the polymer concentrations on four of the hemostatic tests, except for hemolysis, where nanocellulose and the interaction between factors were not significant.

In conclusion, the characterization of the fabricated scaffolds suggests that they possess suitable properties for future applications in the development of 3D models aimed at studying diseases such as prostate cancer. Notably, scaffolds with higher chitosan content demonstrated superior physical and biological performance. These scaffolds present favorable conditions for future evaluations of cell growth and proliferation.

Keywords: Biological Scaffolds, Nanocellulose, Chitosan, 3D Experimental Model, Cell Culture.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

El cáncer de próstata (CaP) representa a nivel mundial una de las principales patologías mortales en hombres (P. Xu et al., 2022), calificado como el segundo cáncer más común que afecta a los hombres, representando hasta el 7,3% de los 19,3 millones de diagnósticos nuevos de cáncer que surgen cada año. En Estados Unidos, durante el 2021, se detectaron 248530 nuevos casos de cáncer volviéndolo la principal fuente de mortalidad en hombres cuando desarrolla su fase metastásica (Dozzo et al., 2023). En Ecuador desde 1991 se ha registrado un aumento anual de más del 7,5% hasta el año 2003, de 21 a 51 casos por 100000 hombres; en 2017 la tasa de incidencia aumentó a 61,9 casos por 100000 (Caballero, 2021)**.** Es por lo que, el cáncer de próstata se considera un gran problema en la salud pública.

La mayor parte de datos publicados acerca del cáncer de próstata sobre los procesos celulares conocidos se obtienen de experimentos realizados en condiciones bidimensionales. Estos cultivos en monocapa celulares convencionales son simples y poco realistas, por lo que no reflejan en su totalidad la fisiología esencial de los tejidos nativos (Hoarau-Véchot et al., 2018) En la actualidad, el desarrollo de modelos de cultivos celulares tridimensionales, que utilizan andamios o soportes, han demostrado poseer un gran potencial como modelo de cultivo celular, debido a que imita de manera eficiente el microambiente tumoral nativo (Yahya et al., 2021)**.**

Estos modelos se caracterizan por brindar un alto rendimiento y una dimensión compacta que optimiza el microambiente tumoral de los sistemas *in vivo* (Ul-Islam et al., 2019)**.** Por lo que, con la finalidad de estudiar de manera eficiente el cáncer de próstata se ha enfatizado la necesidad de evaluar un modelo de cultivo celular tridimensional robusto que se pueda utilizar como un valioso modelo tumoral *in vitro* (Song et al., 2024)**.** Las investigaciones enfocadas en el tratamiento y estudio de cáncer de próstata en andamios pueden representar una fuente confiable de aplicaciones médicas.

Considerando los anteriores antecedentes, esta investigación plantea la caracterización biológica de andamios biológicos elaborados a partir de polímeros naturales como el quitosano y nanocelulosa

vegetal con la finalidad de que representen el punto de partida para modelos tridimensionales de investigaciones en líneas celulares de cáncer de próstata.

1.1.1. Cáncer de próstata (CaP)

El primer caso de cáncer de próstata fue descrito en el año 1853, desde entonces el CaP se ha convertido en un problema de salud mundial donde se ha demostrado que el CaP aumenta más rápido con la edad en comparación a otros tipos de cáncer (Andreasson & Johansson, 2024). El CaP es una enfermedad que se forma cuando las células normales se convierten en células malignas (cancerosas) en los tejidos de la próstata. Los síntomas más comunes son el flujo débil de orina u orinar con más frecuencia de lo normal (National Cancer Institute, 2024). Aunque el cáncer de próstata localizado tiene alta tasa de supervivencia a largo plazo, el cáncer de próstata metastásico sigue siendo en gran medida incurable. La mortalidad de la enfermedad ha ido en aumento, debido a la falta de opciones terapéuticas capaces de obtener respuestas duraderas en el contexto de una heterogeneidad tumoral muy diferente a nivel biológico y genético celular (G. Wang et al., 2018).

1.1.2. Modelos Experimentales para el estudio de cáncer de próstata

Se han desarrollado varios modelos para el estudio de la fisiopatología del CaP, el estándar de oro en los últimos años ha sido utilizar modelos de xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de humano injertadas en ratones (Olson et al., 2018)**.** Entre los modelos tradicionales también se encuentran experimentos basados en cultivos celulares en condiciones de monocapa bidimensional (2D) (Namekawa et al., 2019). El cultivo celular es una herramienta *in vitro* ampliamente utilizada para profundizar en la comprensión de la biología celular, los mecanismos de las enfermedades, la producción de proteínas y el desarrollo de la ingeniería de tejidos. Gran parte de la investigación en biología del cáncer se basa en experimentos realizados en cultivos celulares bidimensionales (2D) *in vitro* (Kapałczyńska et al., 2018).

Sin embargo, estos modelos no reproducen completamente el microambiente tumoral del cáncer de próstata (CaP), lo que conlleva a diferencias significativas en las respuestas celulares, incluyendo alteraciones en la morfología, las vías metabólicas, la expresión génica y la tasa de proliferación. Como resultado, el desarrollo de cultivos tridimensionales (3D) de células cancerosas ha demostrado

generar respuestas celulares que se asemejan en mayor medida a las observadas *in vivo* (K. Xu et al., 2019) **.**

1.1.2.1. Modelos Experimentales 2D

Los cultivos celulares tradicionales, también denominados cultivos bidimensionales (2D), se han convertido en una metodología establecida y un modelo de cultivo conveniente y sencillo. Las células en este modelo crecen como monocapas en un matraz o en placas planas donde se adhieren y proliferan formando una monocapa de células sobre una superficie de plástico (Souza et al., 2018)**.** Las células cultivadas en sistemas bidimensionales (2D) presentan numerosas limitaciones, ya que no logran imitar de forma adecuada las condiciones fisiológicas ni el microambiente natural, que incluyen la estructura tridimensional de los tejidos, las señales biológicas específicas y las interacciones célula-matriz.

Este tipo de cultivo obliga a las células a alterar diversas funciones biológicas complejas, como la apoptosis, la invasión celular, la regulación transcripcional y la expresión de receptores (Habanjar et al., 2021). En este modelo de cultivo, las células cancerosas tienen más área de contacto con el plástico y el medio de cultivo que con las propias células, ignorando la complejidad de las interacciones observadas en tumores *in vivo* (Fontoura et al., 2020).

1.1.2.2. Modelos Experimentales 3D

Los modelos 3D se utilizan cada vez más en la medicina en diferentes aplicaciones, este modelo de estudio sirve para la planificación quirúrgica, ensayo de procedimiento y formación de nuevas generaciones de médicos y la educación a los pacientes (Wake et al., 2019)**.** En el organismo vivo, el comportamiento celular está directamente influenciado por las acciones de las diferentes señales que proporciona el microambiente, que interacciona cooperativamente en tres dimensiones. Las señales micro ambientales son importantes en las interacciones de unión célula-matriz, además, las propiedades mecánicas de la matriz extracelular (ECM) influyen significativamente en las reacciones celulares (Hippler et al., 2019)**.**

Los modelos in vitro en 3D representan una novedosa plataforma para la práctica de estudios ayudando a dilucidar de mejor manera las múltiples etapas del CaP dentro del tejido primario y tejido óseo secundario. La fabricación de un microambiente en 3D es beneficiosa para la comprensión de varios componentes que desempeñan un papel en la matriz extracelular cuando se desarrolla y progresa el CaP (Safarulla et al., 2021)**.** Un método tridimensional ampliamente utilizado es el cultivo de esferoides de cáncer de próstata (CaP), el cual se basa en el autoensamblaje de las células en condiciones de cultivo no adherentes.

En este sistema, las células tumorales se ven forzadas a agregarse sobre una superficie que limita la adhesión, generalmente recubierta con agarosa. A pesar de su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad, este modelo ofrece un gran potencial para el estudio de las interacciones celulares. Sin embargo, presenta limitaciones importantes, ya que hasta la fecha no se han reportado ensayos precisos que evalúen la viabilidad celular en esferoides de CaP.

Dado que, como es bien sabido, la matriz extracelular influye significativamente en la organización celular y en las funciones tisulares, se han desarrollado modelos 3D más complejos que incorporan geles biomiméticos de matriz extracelular. Entre estos se incluyen el Matrigel, el alginato y el colágeno. Las células de CaP cultivadas en estos geles tienden a agregarse espontáneamente, formando tumores que representan de manera más precisa las interacciones entre las células tumorales y la matriz extracelular artificial (Fontana et al., 2020). El desarrollo de modelos 3D utilizando andamios e hidrogeles de bioingeniería muestra una gran promesa y da como finalizada la era de la "biología plana" para los cultivos celulares.

La bioingeniería brinda como resultado modelos más sofisticados, reportando en la literatura intentos de generar un "tumor de próstata en andamio" con su respectivo microambiente tumoral (Risbridger et al., 2018). Los andamios porosos 3D para el cultivo *in vitro* de CaP ha demostrado representar el ambiente microtumoral, favoreciendo el crecimiento celular donde se da la transición epitelial a mesenquimal en el CaP (Xu et al., 2019).

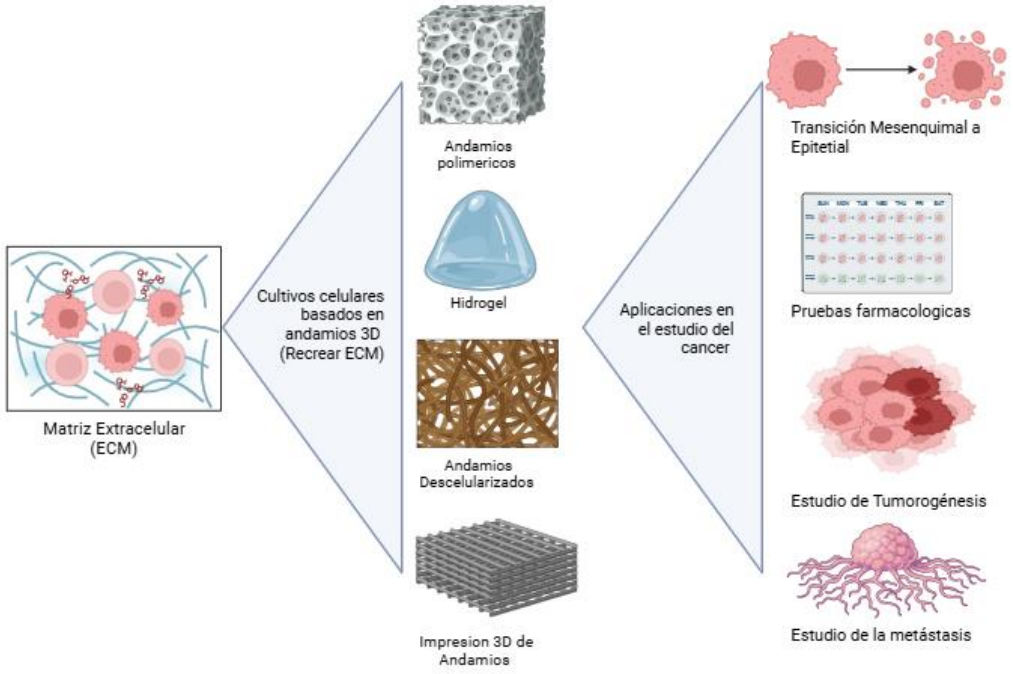


Figura 1. *Andamios 3D como modelo para el estudio del cáncer*

Diferentes tipos de andamios 3D para aplicaciones relaciones con el estudio del cáncer de próstata adaptado de Abuwatfa et al. (2024).

1.1.3. Componentes necesarios para el cultivo celular en 3D.

1.1.3.1. Células

La célula constituye la unidad básica tanto en la estructura como en las funciones de todos los seres vivos. Se organizan para formar tejidos y crear sistemas. En los cultivos celulares 3D las células necesitan reproducir la organización y microarquitectura de un órgano vivo, seleccionar una fuente adecuada para el aislamiento de células es una fase crucial para determinar el éxito del estudio o investigación (Cacciamali et al., 2022). Para el estudio tridimensional del cáncer de próstata (CaP), las células cancerosas han cobrado un papel central en la investigación de la biología del cáncer (Libanje et al., 2019).

Estas células se obtienen a partir de diversas fuentes, tales como pacientes con cáncer, células tumorales primarias, células madre cancerosas, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células

del microambiente tumoral y organoides tumorales (Paradiso et al., 2021). Los organoides tumorales derivados de pacientes han demostrado un gran potencial, ya que conservan tanto la heterogeneidad como las características genéticas de los tejidos tumorales originales. Esto los convierte en herramientas prometedoras para el desarrollo de enfoques personalizados en la medicina oncológica. Además, estos modelos permiten estudiar en profundidad el papel de los procesos mutacionales en la tumorogénesis (Cacciamali et al., 2022).

Las células madre cancerosas (CSC) son responsables del crecimiento sostenido e incontrolado de los tumores y desempeñan un papel fundamental en la metástasis y la recurrencia del cáncer. A diferencia de las células madre normales, las CSC presentan alteraciones tanto en su proceso de división celular como en sus perfiles genéticos y epigenéticos, lo que implica su capacidad para evadir los mecanismos de control y promover la progresión tumoral (Afify & Seno, 2019).

1.1.3.2. Factores de crecimiento (GF)

Los factores de crecimiento (GF, por sus siglas en inglés) son moléculas encargadas en la señalización endógena, responsables de regular diversas respuestas celulares, tales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (Nicolas et al., 2020). Estas proteínas pueden ser inducidas por estímulos externos y son secretadas por varias células, incluyendo plaquetas, leucocitos, fibroblastos y células epiteliales. Los GF actúan a través de mecanismos autocrinos, paracrinos o endocrinos, al unirse a receptores específicos ubicados en la membrana o en el citoplasma celular. Aun en concentraciones bajas, los factores de crecimiento pueden ejercer un efecto notable en el microambiente celular, estimulando de manera rápida procesos como la migración, proliferación y diferenciación celular (Yamakawa & Hayashida, 2019).

Los GF pueden clasificarse en diversas familias, entre las que se incluyen: la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la del factor de crecimiento transformante β (TGF-β), la del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la del factor de crecimiento epidérmico (EGF), la del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la familia de las neurotrofinas. Estas moléculas se emplean con frecuencia en el estudio y tratamiento de enfermedades hematológicas y oncológicas, así como en aplicaciones de ingeniería de tejidos (Zhang et al., 2019).

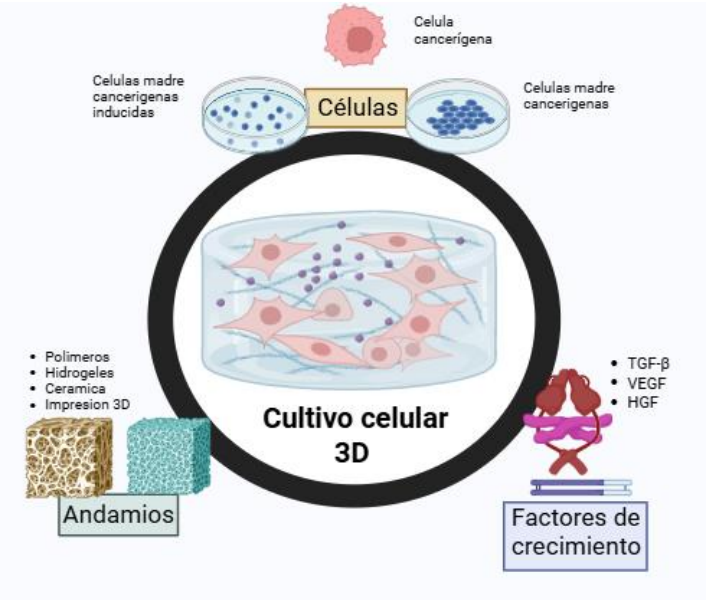


Figura 2. *Partes esenciales para el desarrollo de cultivos 3D*

Los modelos 3D se encuentra integrada de tres componentes: 1) células 2) andamios que actúan como soporte y 3) nutrientes, principalmente factores de crecimiento (GF).

1.1.3.3. Andamios Biológicos (scaffolds)

En el contexto de la biomedicina e ingeniería en tejidos (IT) el andamio es el material de soporte tridimensional (3D), el cual proporciona señales químicas y físicas para la siembra de células que tienen un papel primordial en las misiones celulares. Debido a esto, se han desarrollado andamios biológicos debido a su papel fundamental ya que actúan como una matriz extracelular artificial (ECM) sirviendo de soporte para células, manteniendo la organización tridimensional y participando en la formación de nuevos tejidos (Krishani et al., 2023)**.** Estas matrices deben brindar un microambiente especifico dependiente del tejido para mantener la función celular y regular el comportamiento (Elitok et al., 2018)**.** Existen una gran variedad de materiales para elaborar andamios, los biopolímeros sintéticos y naturales son los más comunes por sus características biológicas y fisicoquímicas únicas (Abbasian et al., 2019)**.**

Según su origen, los andamios se clasifican como alogénicos, aloplasticos, xenogénicos y construcciones vivas (cuando se incluyen células) (Tavelli et al., 2020)**.** Una de las características clave es la biocompatibilidad, debido a la capacidad de un andamio de coexistir e interactuar con tejidos específicos o sistemas fisiológicos sin infligir una reacción inmune o de rechazo al receptor

(Naahidi et al., 2017). Además, los andamios biológicos deben tener una interconectividad y tamaño de poro óptimo para el crecimiento del tejido ya que es esencial para el transporte de nutrientes y oxígeno. Otro aspecto importante es la proliferación y adhesión celular dentro de los poros como en la superficie, para promover la vascularización (Bharadwaz & Jayasuriya, 2020).

1.1.4. Métodos para la elaboración de andamios biológicos

La fabricación de una estructura porosa que posea la resistencia mecánica y las características fisicoquímicas necesarias para permitir el cultivo celular requiere un enfoque integral que combine conocimientos de ingeniería y ciencia de materiales. En este contexto, diversos campos interdisciplinarios han desarrollado múltiples técnicas para la elaboración de andamios que cumplen con este propósito (Deb et al., 2018). La técnica de fabricación elegida debe permitir obtener un andamio adecuado, que cuente con buenas propiedades mecánicas y una estructura porosa tridimensional con poros interconectados y distribuidos de manera uniforme. La arquitectura del andamio se analiza en tres niveles nano, micro y macro, los cuales desempeñan un papel clave en la interacción entre las células y la matriz. En particular, una estructura a escala nanométrica favorece la adecuada unión de moléculas de señalización, lo que facilita procesos fundamentales como la proliferación adhesión y diferenciación celular (Krishani et al., 2023).

Los métodos convencionales para la fabricación de andamios en ingeniería de tejidos abarcan una amplia gama de técnicas, entre ellas la separación de fases inducida térmicamente (TIPS), la unión de fibras, el electrohilado, el moldeo con disolventes y la lixiviación de partículas, así como la laminación de membranas, la liofilización y la espumación con gases. En los últimos años, el campo ha avanzado notablemente gracias a la incorporación de tecnologías de fabricación más precisas y personalizables, las técnicas avanzadas integran software de diseño asistido por ordenador (CAD). Entre estas innovaciones se encuentran la estereolitografía, el bioplotting, el moldeo libre con disolventes, las técnicas de modelado combinado, la deposición fundida, la impresión 3D y la sinterización selectiva por láser (SLS) (Kumar & Jacob, 2022).

1.1.4.1. Métodos convencionales

La técnica de lixiviación de partículas mediante fundición con disolventes (SCPL) es actualmente una de las más utilizadas en la fabricación de andamios poliméricos para ingeniería de tejidos óseos. Este método consiste en disolver un polímero en un disolvente adecuado y luego mezclar esta solución con una sal insoluble. Tras la evaporación del disolvente, se forma una matriz compuesta de sal y polímero, la cual se somete a un proceso de lavado para eliminar las partículas de sal. Como resultado, se obtiene una estructura porosa controlada. (Sola et al., 2019). El electrohilado es una técnica ampliamente utilizada para la síntesis de fibras a partir de una gran variedad de polímeros.

Mediante fuerzas electrostáticas, se extraen fibras desde una solución polimérica, lo que permite la formación de estructuras con diámetros en el rango submicrométrico. Esta capacidad convierte al electrohilado en una herramienta valiosa para los investigadores (Zulkifli et al., 2023). La espumación con gas para aplicaciones biomédicas y de investigación se ha desarrollado principalmente mediante espumado físico. Esta técnica se basa en la sorción de agentes de soplado, como CO_2 y N_2, a alta presión dentro de una matriz polimérica biocompatible. Posteriormente, al liberar la presión mientras se mantiene la temperatura ambiente, se induce la formación de poros en la matriz, generando una estructura porosa adecuada (Fanovich et al., 2023).

1.1.4.2. Liofilización

La liofilización es un proceso comúnmente utilizado para la elaboración de andamios a partir de biopolímeros. Esta técnica se considera un método suave, ya que generalmente se lleva a cabo utilizando agua como disolvente. La ausencia de otros solventes o productos químicos durante el proceso puede favorecer la obtención de andamios con una biocompatibilidad y bioactividad superiores (Katrilaka et al., 2023). El polímero seleccionado se disuelve en un disolvente, que puede ser agua o un disolvente orgánico. Luego, la solución se vierte en un molde y se congela para permitir su solidificación. Por último, el disolvente solidificado se elimina mediante sublimación, utilizando un equipo de liofilización (Koyyada & Orsu, 2021).

La liofilización es sumamente eficiente para la fabricación de andamios con una alta porosidad, puede alcanzar aproximadamente el 90 %, y con tamaños de poro que varían entre 20 y 200 micrómetros. Estas características estructurales se controlan ajustando variables como la concentración del

polímero, la velocidad de congelación y las temperaturas utilizadas durante el proceso (Collins et al., 2021).

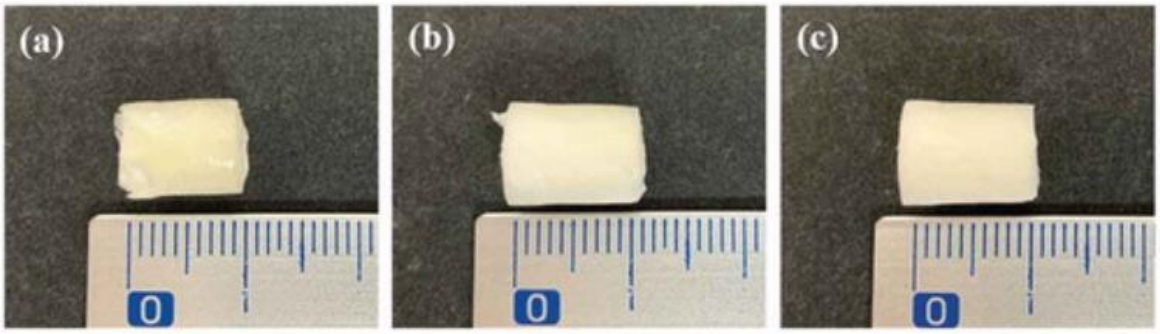


Figura 3. *Andamios biológicos elaborados mediante liofilización*

Fuente: (Kuo et al., 2021). Se observan andamios elaborados con vidrios bioactivos y quitosano mediante el proceso de liofilización. a) andamio al 100 % de quitosano b) y c) andamios al 1 y 3 % vidrio bioactivo/quitosano

1.1.5. Biopolímeros para la fabricación de andamios biológicos

Los polímeros son macromoléculas de cadena larga formados por monómeros repetidos, los biomateriales que se utilizan en la elaboración de andamios se consiguen a partir de la estructura molecular polimérica (Biswal, 2021). Los biopolímeros se producen a partir de organismos vivos y son sustancias estructurales poliméricas que brindan propiedades mecánicas como fuerza, flexibilidad y firmeza. Estos incluyen plantas o se obtienen de varios tipos de microorganismos y animales. El origen de los principales biopolímeros vegetales son la celulosa, hemicelulosa, pectina y la lignina. Estos se han clasificado en base a su naturaleza biológica, como ceras lipídicas, carbohidratos, proteínas, polifenoles, ácidos nucleicos y polihidroxialcanoatos (PHA) (Aggarwal et al., 2020).

Para la fabricación de andamios se utilizan dos enfoques primordiales. En primer lugar, se busca un andamiaje como sistema de soporte celular para sembrar células *in vitro*, el andamio estimula otras células para establecer la matriz que será la base del tejido. El desarrollo reciente de la IT demanda la aplicación de nuevos biomateriales que puedan asemejarse con el entorno y las indicaciones locales. En la actualidad las tecnologías avanzadas se enfocan en fabricar biomateriales (naturales o sintéticos) para el diseño de andamios que apoyan la formación de tejidos tridimensionales complejos (Reddy et al., 2021a).

1.1.5.1. Biopolimeros sintéticos

Los biopolímeros sintéticos se obtienen a partir de recursos no renovables, como los hidrocarburos, y comprenden una amplia gama de materiales termoplásticos y termoestables. El término "biopolímero" hace referencia a una variedad de polímeros que pueden tener un origen biológico o fósil. Sin embargo, no todos los polímeros de origen biológico son biodegradables, mientras que algunos polímeros de origen sintético sí lo son. La biodegradabilidad de estos materiales depende, en gran medida, de su estructura química, peso molecular, grado de cristalinidad o amorfismo, así como del entorno en el que se encuentren (Mtibe et al., 2021). Varios polímeros sintéticos disponibles comercialmente presentan propiedades físicas, químicas y mecánicas similares a las de los tejidos biológicos.

Los polímeros sintéticos biodegradables representan una categoría relevante, ya que pueden producirse bajo condiciones controladas, con características mecánicas y físicas predecibles y reproducibles, como la tasa de degradación, el módulo de Young y la resistencia. No obstante, una de las principales limitaciones de estos materiales en aplicaciones como andamios para ingeniería de tejidos radica en que exhiben distintos niveles de biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades mecánicas. Hasta el momento, ningún polímero ha logrado combinar estas tres características en un nivel óptimo (Reddy et al., 2021b).

1.1.5.2. Biopolímeros naturales

Los biopolímeros son polímeros de origen natural que se encuentran en organismos vivos, un biopolímero es una molécula de cadena larga formada por monómeros que se encuentran unidos covalentemente para dar una molécula biodegradable. Las proteínas como la fibrina, colágeno y elastina que se hallan en el cuerpo humano en conjunto con los polisacáridos como el quitosano, seda, gelatina y alginato, se encuentran dentro de la categoría de biopolímeros naturales (Das et al., 2023)**.** Según el origen de los polímeros naturales, los biopolímeros se pueden clasificar en 3 grupos, polímeros fabricados a partir de biomasa renovable como los agropolimeros provenientes de los residuos agrícolas; polímeros de productos microbianos o de origen animal que suelen ser útiles en aplicaciones médicas y farmacéuticas; y polímeros biodegradables sintetizados químicamente o

modificados a partir de polímeros naturales (Kumaran et al., 2020)**.** Las principales características de estos biopolímeros son su alta biocompatibilidad, no citotoxicidad y biodegradabilidad que han hecho que sean investigados para su uso en la elaboración de andamios biológicos (Yahya et al., 2021)**.**

1.1.5.3. Nanocelulosa como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

La nanocelulosa es una fibra que se obtiene mediante la descomposición de la celulosa. Se caracteriza por tener dimensiones en nanoescala (Rajasekharan et al., 2023). La fibra de nanocelulosa generalmente contiene un diámetro menor a 100 nm y varios micrómetros de longitud (Phanthong et al., 2018). Obtenida por medio de celulosa nativa, esta se encuentra principalmente en animales, plantas y bacterias. Las 3 principales formas de nanocelulosa son: nanofibrillas de celulosa (CNF) y celulosa microfibrilida; nanocristales de celulosa (CNC); y por último nanocelulosa microbiana o bacteriana (BC) (Randhawa et al., 2022).

Las CNF se obtienen generalmente por desintegración de las fibras de celulosa a lo largo de su eje longitudinal con molinos, homogeneizadores, microfluidizador, etc., manteniendo la longitud y la cristalinidad de las fibrillas. Los métodos tradicionales para obtener CNF son mecánicos, que consumen una cantidad elevada de energía debido a las interacciones de enlaces entre las nanofibrillas. Los CNC se producen eliminando las regiones amorfas de la celulosa mediante oxidación e hidrolisis alcalina manteniendo la región simétrica (cristalina). Se han reportado varios ácidos para la formación de CNC, los más comunes suelen ser el ácido sulfúrico, acido bromhídrico, ácido clorhídrico, etc. La BC se han producido tanto por bacterias gran negativas como por bacterias gran positivas mediante la fermentación del medio con nutrientes esenciales para dichas bacterias (Chu et al., 2020).

Las características físicas y químicas pueden ser diferentes según el origen y los procesos de purificación. La nanocelulosa posee propiedades como: una óptima resistencia mecánica; gran área superficial; ambiente no toxico; biodegradable; biocompatible; y amigable con el medioambiente, esto la hace idónea para aplicaciones en la bioingeniería o biomedicina, además, se puede extraer de una amplia gama de biomasa Las propiedades superficiales y la compatibilidad interfacial de la celulosa son de suma importancia para el rendimiento de su aplicación, (Kaur et al., 2021)**.**

1.1.5.4. Quitosano como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

Después de la celulosa, la quitina es el biopolímero más abundante en la naturaleza, se encuentra en una gran variedad de especies eucariotas como insectos, hongos y sobre todo en los crustáceos. El polímero conocido como quitosano se forma cuando el polímero *N*-acetil-D-glucosamina se somete a la desacetilación dando como resultado una predominancia en la ausencia de los grupos acetilo en los monómeros de la cadena, es decir, como β-1,4-D-glucosamina (Kou et al., 2021)**.** El quitosano es el producto desacetilado de la quitina, esta se considera quitosano cuando el grado de desacetilación supera el 50%, es un polisacárido alcalino natural que no tiene toxicidad ni presenta efectos secundarios en la salud, posee buenas propiedades de adsorción e hidratación (Budishevska et al., 2020).

El quitosano contiene grupos hidroxilo y amino, que ayudan a la formación de enlaces covalentes por medio de diferentes reacciones como la esterificación, la eterificación y la aminación reductora. Estos grupos desempeñan un papel fundamental en la solubilidad del quitosano, brinda importantes propiedades intrínsecas como la capacidad antimicrobiana, mucoadhesion y la mejora de la permeabilidad. El grado de desacetilación junto al peso molecular son las propiedades más importantes del quitosano (Harugade et al., 2023).

Los derivados del quitosano pueden obtenerse en diversas formas, dependiendo del método o la tecnología empleada para optimizar sus funciones. Estos compuestos presentan propiedades fisicoquímicas favorables y destacan por sus excelentes actividades biológicas. Tanto el quitosano como sus derivados tienen múltiples aplicaciones en áreas como la alimentación, la química y la biomedicina, debido a que se consideran compuestos seguros, no tóxicos, con buena biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además, se les atribuyen propiedades antioxidantes, hemostáticas, promotoras de la cicatrización de heridas y moduladoras del sistema inmunológico (Tang et al., 2023). Actualmente, los derivados del quitosano se utilizan ampliamente en el campo biomédico y en el desarrollo de materiales médicos. Con el avance de la nanotecnología, estos compuestos han sido diseñados como nanomateriales, incluyendo hidrogeles, microesferas, nanopartículas y micelas (W. Wang et al., 2020).

1.1.6. Extracción de nanocelulosa a partir de residuos de banano para su aplicación como biomaterial en la elaboración de andamios biológicos

1.1.6.1. Residuos del banano

La relevancia económica de la industria bananera tiene como eje principal los ingresos por las exportaciones y en la creación de empleo directo para millones de personales a nivel mundial, incluyendo a quienes realizan la distribución y venta en supermercados alrededor del mundo (Evans & Ballen, 2012). A nivel mundial, se producen cerca de 114 millones de toneladas métricas de banano, generando problemas ambientales siendo el principal la emisión de gases invernadero. Estos residuos son ricos en contenido de gran importancia industrial, como celulosa, hemicelulosa, lignina y fibras naturales que se pueden modificar mediante diferentes procesos para obtener bioplásticos, fertilizantes, biocombustibles (Acevedo et al., 2021).

El banano es una fruta que se cultiva principalmente en países de clima tropical. Tras la cosecha, los bananos destinados a la exportación atraviesan rigurosos procesos para asegurar que lleguen a su destino en óptimas condiciones. Como resultado, alrededor del 60 % de su biomasa es desechada. En las plantas procesadoras, los frutos que no cumplen con ciertos estándares —como el grado de madurez, el tamaño adecuado, o que presentan magulladuras, golpes, manchas o presencia de insectos— son descartados y considerados desperdicio. Estos residuos contienen celulosa (29 %), hemicelulosa (25 %), lignina (10 %), fructosa (2,7 %), glucosa (3,2 %), sacarosa (7,8 %) y fibras naturales en base seca (Santiago et al., 2022).

1.1.6.2. Métodos de extracción de nanocelulosa

La extracción de nanocelulosa a partir de materiales celulósicos derivados de residuos agrícolas ha recibido una gran visualización debido a su sostenibilidad y a su aprovechamiento en desechos que afectan al medio ambiente (Samsalee et al., 2023). Los residuos agrícolas contienen grandes cantidades de materiales celulósicos de los cuales se obtienen nanocelulosa mediante diversos métodos físicos, biológicos y químicos. Estos residuos se conocen como biomasa lignocelulósica,

debido a que posee celulosa, lignina y hemicelulosa en grandes cantidades, que se deben pretratar para ser eliminados en la obtención de nanocelulosa (Padhi et al., 2023).

La extracción de nanocelulosa requiere una serie de procesos de purificación intensivos, los cuales pueden generar subproductos no deseados. En la etapa de despulpado, cuyo objetivo es eliminar la hemicelulosa y la lignina, se emplean comúnmente métodos químicos, siendo la hidrólisis alcalina uno de los más utilizados. En este proceso, el material previamente tratado se somete a una solución de hidróxido de sodio, con el fin de remover estos componentes.

Para asegurar la obtención de celulosa pura, se aplica posteriormente un proceso de blanqueo o deslignificación, que consiste en el uso de hipoclorito de sodio en bajas concentraciones o ácido acético. Este tratamiento permite eliminar los restos de lignina y otras impurezas, lo que se evidencia en el color blanco de las fibras de celulosa, indicador de una purificación efectiva. Entre los métodos más comunes para la obtención de nanocelulosa se encuentran la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática y los tratamientos mecánicos (Mehanny et al., 2021).

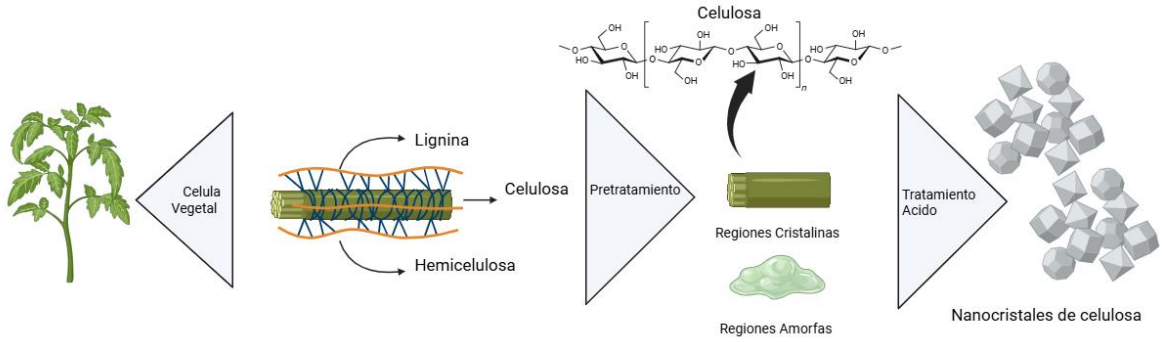


Figura 4. *Extracción de nanocelulosa*

Procedimiento estándar para la extracción de nanocelulosa vegetal a partir de cualquier residuo o muestra vegetal. Adaptado de Padhi et al. (2023).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Caracterizar andamios elaborados con nanocelulosa vegetal y quitosano mediante ensayos biológicos.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Construir andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano por el método de criodesecación.

- Evaluar la hemocompatibilidad de los andamios biológicos mediante pruebas hemostáticas

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

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

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

2.1.1. Reactivos

- Ácido sulfúrico (H2SO4) 65 %
- Ácido acético (CH_3COOH) 0.05 M
- Agarosa 0.5 %
- Agua destilada
- Caldo Müller – Hilton
- Carbonato de sodio (Na2CO3)
- Citrato de sodio
- Cloruro de Calcio (CaCl2)
- Hidróxido de sodio (NaOH) 5 %
- Hipoclorito de sodio (NaClO) 1 %
- Quitosano
- Pastillas de PBS (Tampón fosfato sódico)
- Plasma sanguíneo
- Kit de cuantificación de LDH
- Kit de ensayo de hemoglobina
- Medio Agar – Agar
- Medio Müller – Hilton
- PBS ▪ Sangre
- Tritón X-100

2.1.2. Material fungible

- Cajas petri de plástico
- Frasco ámbar de 500 mL
- Frascos de vidrio de tapa azul de 500 mL 33
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Micropipetas de 0 a 100 µL
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Embudo de vidrio
- Paquete de fundas Ziplock
- Paquete de papel aluminio
- Paquete de guantes de nitrilo
- Paquete de placas Petri
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Placas no estériles de 96 pocillos
- Portaobjetos
- Tubos de centrífuga
- Tubos Falcon
- Tela Filtro
- Vasos de precipitación de 50, 100, 200, 500 y 1000 mL

2.1.3. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Centrífuga
- Congeladora
- Espectrofotómetro
- Incubadora

- Liofilizador
- Microscopio electrónico de barrido (SEM)
- Plancha de calentamiento
- Ultracongeladora

2.2. Métodos

2.2.1. Construir andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano por el método de criodesecación.

2.2.1.1. Obtención del residuo del banano (*Musa paradisiaca*)

Para la extracción de nanocelulosa vegetal se trabajó con 500 g de residuos vegetales de banano que se obtuvo del Centro Comercial Simón Bolívar del Cantón Ambato, los cuales fueron seleccionados en base a las características de un color amarillento maduro, sin sobrepasar la madurez de la fruta. Se almacenó en un refrigerador con hielos para evitar la degradación hasta transportarse a los laboratorios de investigación (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (Nuñez, 2024).

2.2.1.2. Pretratamiento del residuo vegetal

Se lavó el residuo vegetal con abundante agua destilada con el fin de eliminar polvo, material adherido, insectos muertos y otras impurezas (Romruen et al., 2022). El residuo se secó en un deshidratador por convección forzada a 50 º C durante 30 h (Harini et al., 2018; Nuñez, 2024). Posteriormente, se molió el residuo para formar un polvo. Luego, el polvo se almacenó en bolsas ziploc para realizar el pretratamiento que consistió en lavar el polvo del residuo del banano en agua destilada a 60 ºC por 4 h con una relación fibra/agua de 1:10. Al finalizar el tiempo se filtró y secó en una estufa hasta eliminar la humedad del residuo (De Carvalho et al., 2015).

2.2.1.3. Extracción de la celulosa vegetal.

Se tomó 25 g del material vegetal en polvo y se trató durante 2 h con una solución de NaOH al 5% con una relación fibra/solución de 1:20 con agitación vigorosa (De Carvalho et al., 2015). Una vez finalizado el tiempo, se filtró la solución, el residuo insoluble (filtrado) se lavó con abundante agua destilada hasta que se alcanzó el pH neutro (Mishra et al., 2023). Posteriormente se realizó el blanqueo con una solución de NaClO al 1% en una relación fibra/solución de 1:10 durante 1 h a 95 °C con agitación vigorosa. Este tratamiento se debe repetir las veces necesarias hasta obtener el color blanquecino típico de la celulosa, al finalizar se filtró la celulosa y se lavó con agua destilada caliente hasta que se alcanzó un pH neutro del agua del lavado indicando la eliminación de la solución de NaClO. La celulosa se secó a temperatura ambiente, además se trituró y almacenó en un recipiente de vidrio (Melikoğlu et al., 2019)**;** Sanaguano, 2021).

2.2.1.4. Extracción y obtención de nanocelulosa mediante hidrolisis ácida

Se tomó 5 g de la celulosa en polvo para tratarlo con una solución de H2SO4 al 60% p/p en una relación fibra/H2SO4 de 1:20, se controlará que la temperatura no supere los 45 °C durante 45 min con agitación vigorosa. Cuando terminó el tiempo de reacción se detuvo la hidrolisis con agua destilada fría. Se dejó precipitar y se eliminó el medio de reacción para posteriormente centrifugar la muestra a 4000 rpm por 10 min hasta que la suspensión alcance la neutralidad (Melikoğlu et al., 2019)**.**

2.2.1.5. Obtención de quitosano

El quitosano utilizado en este estudio fue suministrado por la marca Chemsavers y se caracterizó por un grado de desacetilación del 90% y un bajo peso molecular. Donado por el Dr. Irvin Tubón, docente-investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.2. Elaboración de un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal y quitosano mediante liofilización

2.2.2.1. Preparación de solución de nanocelulosa con quitosano para la liofilización

Se preparó 4 soluciones de nanocelulosa y quitosano con la combinación de concentraciones 1 y 1; 1.5 y 1.5; 1 y 1.5: 1.5 y 1 % respectivamente en ácido acético 0.5 M (Yin et al., 2019a). Se elaboró una solución de agarosa al 0.1 % como gelificante disuelto en 1 ml de solución PBS para cada una de las concentraciones de las soluciones. Después de ello, se añadió la solución de agarosa sobre la solución de quitosano y nanocelulosa, manteniendo una temperatura de 90 °C y agitación constante hasta su homogenización.

2.2.2.2. Formación de andamios biológicos por liofilización

Cuando se obtuvo las soluciones, se vertieron en placas de 96 pocillos y se refrigeraron por 24 h. Luego se ultracongelaron a -75 °C por 24 h. Posteriormente, las placas con la solución de biopolímeros se colocaron en el liofilizador a -57 °C y 127 mT durante 17 h para sublimar completamente los disolventes del material y obtener una estructura porosa sin contenido de agua. Por último, las placas se retiraron del equipo y se colocaron en el desecador hasta su posterior uso (Pipattanawarothai et al., 2017).

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

Las pruebas de hemocompatibilidad se desarrollaron de acuerdo con el 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.

Las pruebas de hemocompatibilidad son fundamentales debido a la interacción directa de los andamios con la sangre. En este contexto, es esencial que el entorno favorezca la proliferación celular

dentro del tejido, minimizando así el riesgo de coagulación y la activación de una respuesta inmune que podría generar el rechazo del andamio implantado. Para evaluar estos aspectos, se llevaron a cabo pruebas hemostáticas utilizando muestras de sangre de donantes sanos, siguiendo la metodología descrita por (Jimenez et al., 2022) con ciertas modificaciones implementadas por (Ramírez & Piñaloza, 2023).

2.2.3.1. Capacidad máxima de hinchazón y degradación del andamio

La capacidad máxima de hinchazón se determinó en base a la Ecuación 1. Para lo cual los andamios previamente pesados (*Wo*) se sumergieron en 500 µL de agua destilada, PBS y sangre por 5 s, 15 s, 30 s, 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min; y se volverán a pesar (*Wf*).

$$Hinchazón\ (\%) = \frac{Wf - Wo}{Wo}\ x\ 100 \qquad \textbf{(1)}$$

La degradación del andamio se determinó mediante el porcentaje de peso residual, empleando la Ecuación 2 donde los andamios previamente pesados (*Wo*) se colocaron en placas de 96 pocillos, posterior se añadió sangre con una capacidad máxima de hinchazón mayor al 100% y se incubaron a 37°C. Los andamios se evaluaron en un lapso de 2, 4 y 7 días, en cada punto se lavaron las muestras con PBS, liofilizaron y pesaron (*Wf*).

$$Peso\ residual\ (\%) = \frac{Wf - Wo}{Wo}\ x\ 100 \qquad \textbf{(2)}$$

2.2.3.2. Coagulación de sangre entera *in vitro*

Se utilizó el kit de ensayo de Hemoglobin liguicold HUMAN. El índice de coagulación sanguínea (BCI) se determinó con la Ecuación 3. Se necesitaron 4,5 mL de sangre entera con citrato. Se precaliento tubos eppendorf con muestras a 37 °C por 30 min, se añadió 300 µL de sangre entera con citrato en cada tubo eppendorf. Para coagular la sangre se agregaron 10 µL de $CaCl_2$ (0.2 M) e incubaron a 37 °C por 10 min a 110 rpm. Se adicionaron 300 µL de agua desionizada y finalmente se

recolectó el sobrenadante para cuantificar el contenido de hemoglobina a 540nm (*Is*). Se realizó una solución de referencia (*Ir*) y se midió la absorbancia de la celda vacía (*Io*).

$$BCI\ (\%) = \frac{Is - Io}{Ir - lo}\ x\ 100 \qquad \textbf{(3)}$$

Se evaluaron los coágulos de forma visual, para ello, se colocaron las muestras en tubos Eppendorf. Se añadió 125 µL de sangre entera con citrato y 125 µL de CaCl2 (10 mM) y se incubaron a 37 °C por 1 min y se agitaron suavemente.

2.2.3.3. Ensayo de hemólisis in vitro

Se determinó la tasa de hemolisis con la Ecuación 4. Se añadió 300 µL de sangre entera con citrato diluida en solución salina normal en una proporción 1:5 sobre las muestras previamente colocadas en tubos Eppendorf. A continuación, se incubaron a 37 °C por 1 h y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min- Se recolectó el sobrenadante para cuantificar el contenido de hemoglobina *(Is)* empleando el kit HUMAN. El control positivo *(Ir)* y el control negativo (Io), se agregaron 100 µL de sangre entera en agua desionizada y PBS.

$$Hemolisis\ (\%) = \frac{Is - Io}{Ir - lo}\ x\ 100 \qquad \textbf{(4)}$$

2.2.3.4. Adhesión de glóbulos rojos *in vitro*

Se empleo el kit de ensayo de hemoglobina (HUMAN). Se determinó la adhesión de glóbulos rojos mediante la Ecuación 5. Se añadió 300 µL de sangre entera con citrato sobre las muestras en los tubos Eppendorf y se incubaron a 37 °C por 5 min y se ubicó en un tubo Eppendorf, se añadió 200 µL de agua desionizada sobre el andamio para liberar los glóbulos rojos adheridos y se cuantificó el contenido de hemoglobina resultante *(Is)*.

$$Hemoglobina = Is\ x\ 29{,}4 \quad \textbf{(5)}$$

2.2.3.5. Adhesión plaquetaria *in vitro*

Para la determinación de la liberación de LDH se utilizó la Ecuación 6. Se estudiaron mediante el uso del kit de ensayo deshidrogenasa láctica (LDH) (LDH SCE mod. liquidUV). Primero se centrifugó sangre entera con citrato de sodio a 3200 rpm por 15 min para obtener plasma rico en plaquetas. Seguido, se agregó 300 µL de plasma rico en plaquetas a cada muestra colocadas en tubos eppendorf y se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente se añadió 200 µL de solución salina normal y se sumergieron el material liberando las plaquetas que no se adhirieron. Los andamios se trasladaron a tubos Eppendorf añadiendo 300 µL Tritón X-100 al 1% disuelto en PBS, se incubaron a 37 °C por 1 h y se cuantificó el contenido de LDH (*Is*). Para el control positivo (*Ir*) y negativo (*Io*) se añade 100 µL de plasma rico en plaquetas en 200 µL Triton X-100 al 1% y PBS respectivamente, y se medió la absorbancia a 340 nm.

$$Liberación\ de\ LDH\ (\%) = \frac{Is - Io}{Ir - lo}\ x\ 100 \quad \textbf{(6)}$$

2.2.4. Verificar la viabilidad de los andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano para futuros ensayos con líneas celulares.

2.2.4.1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó medio Agar Sangre para la evaluación de los métodos de esterilización. Para su preparación, se disolvieron 9 g de Agar - Agar en 500 mL de agua desmineralizada. La mezcla fue calentada hasta lograr una completa integración de los componentes y se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos. Una vez enfriado el medio a 50 y 55 °C, se incorporó sangre en una proporción del 5% v/v, mezclando suavemente. Finalmente, se vertió en placas estériles y se dejó solidificar.

2.2.4.2. Neutralización de los andamios

Para la neutralización de los andamios se basó en la metodología modificada descrita por (Azueta et al., 2022), estos fueron sumergidos inicialmente en agua destilada durante 30 segundos, con el fin de evaluar su nivel de pH. Se verificó que el pH no se encontraba dentro del rango de neutralidad, por lo que se preparó una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 0.5 M. Los andamios fueron entonces inmersos en dicha solución durante 20 segundos. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con agua destilada durante 10 segundos cada uno, repitiendo el procedimiento las veces necesarias hasta alcanzar un pH neutro. Una vez neutralizados, los andamios se conservaron en refrigeración durante 24 horas, seguidos de una etapa de ultracongelación por 24 horas. Finalmente, se sometieron a un proceso de liofilización con una duración de 4 horas.

2.2.4.3. Esterilización de los andamios

Esterilización por luz UV

Para la esterilización mediante luz UV, los andamios se colocaron individualmente en cajas Petri y se expusieron en una cámara con luz ultravioleta durante 30 minutos. Finalmente, fueron retirados de la cámara.

2.2.4.4. Evaluación de la actividad microbiana

Se determinó la inhibición celular preparando una concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* considerando una escala 0.5 McFarland equivalente a 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Se preparó el reactivo de resazurina al 0.2%, para ello se pesó 0.2 g de resazurina y se aforó a 100 mL en agua destilada. En una placa de 96 pocillos, se colocaron andamios esterilizados y sin esterilizar, después se colocaron 200 µL de caldo Müller-Hilton (MH) en cada pocillo con 100 µL de solución bacteriana, se dejó incubar por 24h. Posteriormente al tiempo, se añadió 50 µL de resazurina en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1h en la oscuridad. Para el control negativo (C-) se colocó caldo, gentamicina (40mg) y solución bacteriana; para el control

positivo (C +) no se colocó antibiótico, los controles se incubaron por 1h a temperatura en oscuridad, finalmente se midió la absorbancia 540 nm.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Obtención de nanocelulosa

3.1.1.1. Obtención de nanocelulosa

Para la obtención de los andamios biológicos se realizó un procedimiento previo para obtener la nanocelulosa empleada en la elaboración de estos. Se observa en la Tabla 1, después del proceso de deshidratación de la cascara de plátano, los 500,30 g de muestra vegetal inicial disminuyeron a 51,27 g, dando como resultado un porcentaje de humedad del 89 %. La considerable reducción en el peso del material vegetal inicial se explica por su alto contenido de agua. Estudios previos han reportado un porcentaje de humedad que varía entre el 72% y el 87% en los residuos del banano (Kabenge et al., 2018).

Tabla 1. *Cantidades obtenidos de los diversos procesos para la obtención de nanocelulosa a partir de residuo vegetal*

	Fase 1. Secado de material vegetal		
Residuo de banano	**Peso húmedo del residuo (g)**	**Peso final después de la deshidratación (g)**	**% Humedad**
	500,30	51,27	89,75
	Fase 2. Tratamiento alcalino		
Tratamiento alcalino y blanquimiento	**Peso inicial del material vegetal (g)**	**Peso final en seco (g)**	
	25	7,03	
	Fase 3. Obtención de nanocelulosa		
Hidrolisis ácida	**Peso inicial del material vegetal (g)**	**Peso final en seco (g)**	
	5	4.15	

Al someter el material vegetal a un tratamiento alcalino con NaOH al 5 % a temperatura ambiente, se observó una reducción de hasta un 28 % en su peso inicial. Este descenso se debe a los efectos del hidróxido de sodio sobre la estructura de la biomasa. Al entrar en contacto con la solución alcalina, la pared celular del material se hincha, lo que provoca la ruptura de los enlaces que unen la lignina y la hemicelulosa con la celulosa en las capas externas (Banvillet et al., 2021). Como resultado, durante el proceso de filtrado, los residuos solubilizados de lignina y hemicelulosa tiñen la solución resultante de un color negro característico (licor negro). Se realizó de seguido un proceso de blanqueo con NaOCl al 1 %, donde se observa una disminución en el peso del material debido a la eliminación de lignina aun presente en la muestra tratada alcalinamente (Noremylia et al., 2022).

Tras el proceso de hidrólisis ácida, se observó una disminución en la masa total del material vegetal, como se muestra en la Tabla 1. Esta reducción se debe a la eliminación de compuestos celulósicos no fibrilados, impurezas residuales de los tratamientos previos y a la pérdida de material durante los lavados realizados para neutralizar el pH de la suspensión. La hidrólisis ácida provoca la ruptura de los enlaces glucosídicos presentes en las regiones amorfas de la celulosa, degradándolas y dejando intactas las regiones cristalinas. Estas últimas, al ser más ordenadas y compactas, presentan una mayor resistencia al ataque del ácido y permanecen como el residuo principal del proceso (Bacha, 2022).

Tabla 2. *Rendimiento de la extracción de nanocelulosa vegetal*

Peso inicial del material vegetal pretratada (g)	**Peso final de nanocelulosa (g)**	**% Rendimiento**
25	5.12	20.48

De acuerdo con la Tabla 2 el rendimiento de nanocelulosa por cada 25 gramos de materia seca pretratada fue del 20.48 %. El resultado varía por la materia vegetal empleada, el uso del material de filtrado, los métodos mecánicos combinados, el tiempo y la concentración de cada reactivo utilizado en la extracción de nanocelulosa. Este resultado se compara con el obtenido por Y. Guo et al. (2020) en donde el rendimiento de nanocelulosa fue del 32% teniendo en cuenta que la concentración del ácido fue la misma que se utilizó en este estudio con la diferencia en el tiempo de reacción, de igual manera resultados obtenidos por Mohd et al. (2022) reporta un rendimiento del 28,1% tomando en cuenta que la concentración del ácido fue inferior al 30%.

3.1.2. Construcción andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano por el método de criodesecación.

Por medio de la liofilización se obtuvo ABs híbridos de nanocelulosa y quitosano. Éstos se elaboraron con la finalidad de evaluar las características biológicas. Para la construcción de los andamios se utilizó las concentraciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. *Composición de los andamios biológicos elaborados por liofilización.*

Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB hibrido 1	Quitosano	1
	Nanocelulosa	1
	Agarosa	0.5
AB hibrido 2	Quitosano	1.5
	Nanocelulosa	1.5
	Agarosa	0.5
AB hibrido 3	Quitosano	1
	Nanocelulosa	1.5
	Agarosa	0.5
AB hibrido 4	Quitosano	1.5
	Nanocelulosa	1
	Agarosa	0.5

Con el fin de optimizar el proceso de la formación de redes poliméricas de ambos polímeros se incorporó agarosa, debido a que este polímero posee la capacidad de penetrar otros andamios formando redes interconectadas en el proceso de reticulación térmica (Samrot et al., 2023). Además, los polímeros naturales, como la agarosa en combinación con el quitosano, han demostrado una mayor adhesión y proliferación celular en comparación con los polímeros sintéticos, convirtiéndolos en una excelente opción para la fabricación de andamios Felfel et al. (2019a). La nanocelulosa ha emergido como un material de gran interés en el ámbito biomédico, principalmente debido a su biocompatibilidad, su elevada área superficial específica y la abundancia de grupos funcionales en su superficie química.

No obstante, su naturaleza bioinerte y la limitada posibilidad de modificar sus propiedades mecánicas restringen su capacidad intrínseca para favorecer la adhesión celular, lo cual es esencial para promover directamente el crecimiento y la proliferación celular (Felfel et al., 2019a). Con el propósito

de superar estas limitaciones, se ha explorado su combinación con otros biopolímeros, destacando el quitosano como un material complementario ideal (Wei et al., 2021).

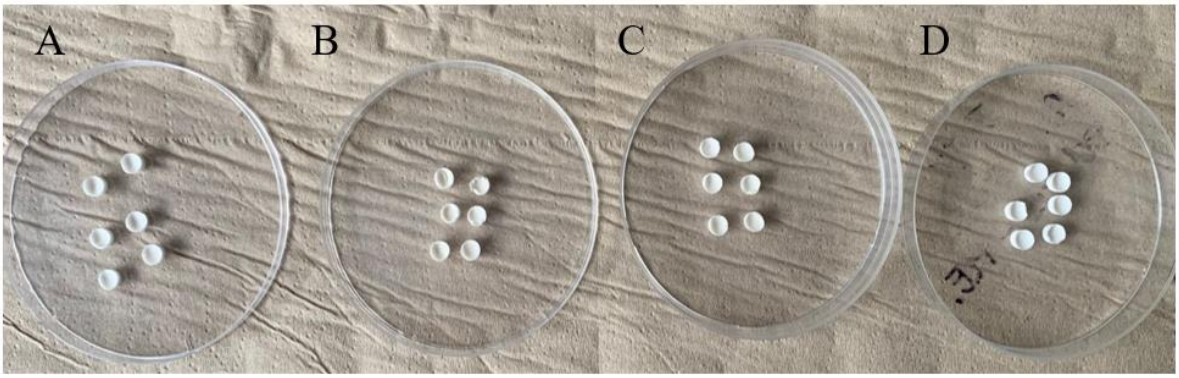


Figura 5. *Andamios biológicos de nanocelulosa/quitosanos obtenidos mediante liofilización.*
Nota: La concentración de polímeros (nanocelulosa/quitosano) respectivamente son; A) 1 y 1 % B) 1.5 y 1.5 % C) 1 y 1.5 % y D) 1.5 y 1%

En la Figura 5 se presentan los andamios con sus diferentes concentraciones. Para su elaboración, los ABs se prepararon en placas de 96 pocillos y fueron retirados cuidadosamente para su posterior análisis y uso. Visualmente, todos los ABs presentaron una coloración blanca. En cuanto a sus propiedades físicas, se observó que los andamios con menor concentración de quitosano eran más frágiles y mostraban una estructura porosa, lo que los hacía propensos a deformaciones. En contraste, los andamios con mayor concentración de quitosano presentaron una mayor rigidez estructural facilitando su manipulación para las posteriores pruebas biológicas.

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

3.1.2.1. Evaluación de la capacidad máxima de hinchazón

Las propiedades mecánicas de la matriz extracelular influyen significativamente en diversos comportamientos celulares, desde la proliferación hasta la transducción de señales. En este contexto, la capacidad de hinchamiento de un andamio está intrínsecamente relacionada con su porosidad, siendo ideal que el material no se deforme ni pierda masa durante este proceso. Además, la rigidez

del andamio al hincharse en soluciones que simulan el entorno de la matriz extracelular también desempeña un papel fundamental, especialmente en el estudio de patologías donde estas condiciones físicas resultan determinantes (Baruffaldi et al., 2021).

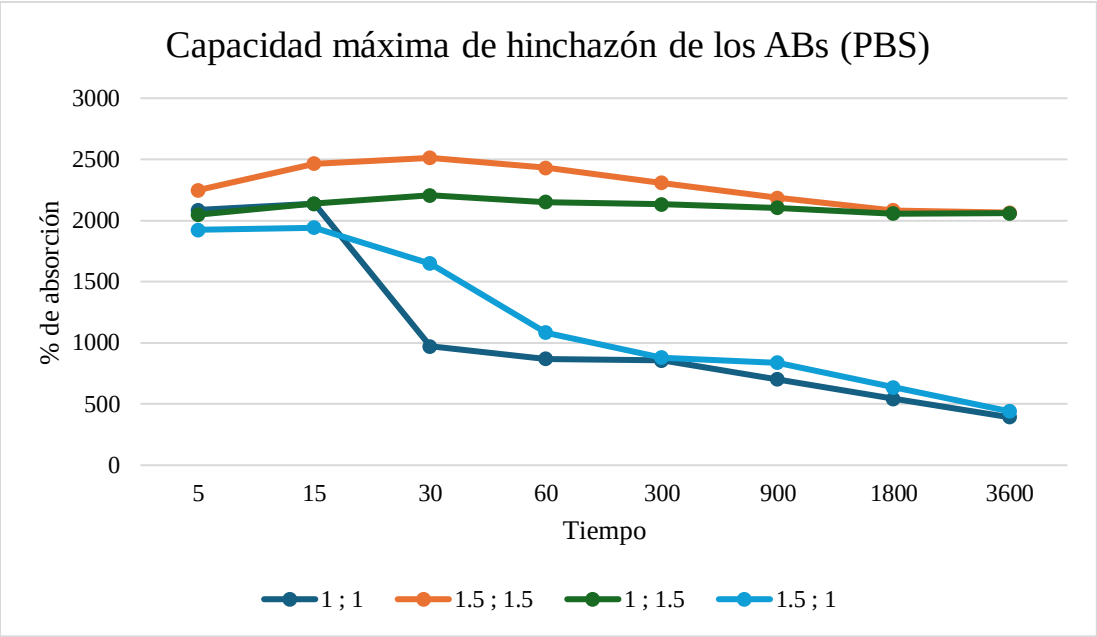


Figura 6. Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (PBS).

Con el objetivo de evaluar la capacidad máxima de hinchamiento de los andamios biológicos, se realizaron mediciones tras su inmersión en agua destilada y en solución salina tamponada (PBS) durante un periodo de 60 minutos. Para determinar el momento en que los andamios alcanzan su máxima absorción de líquido y como este puede aumentar o disminuir con el transcurso del tiempo, para ello se registró su peso a intervalos regulares (Felfel et al., 2019a).

La Figura 6 muestra los resultados del hinchamiento en PBS. El andamio con una concentración de 1.5 % de nanocelulosa y 1.5 % de quitosano presentó la mayor capacidad de absorción, alcanzando un valor máximo promedio de 2512 % a los 30 segundos. Le siguieron los andamios con concentraciones de 1 % de nanocelulosa y 1.5 % de quitosano, que alcanzaron un pico de hinchamiento del 2206 %, también a los 30 segundos. En contraste, los andamios con menor capacidad de hinchamiento fueron los que contenían 1 % de nanocelulosa y 1 % de quitosano, y aquellos con 1.5 % de nanocelulosa y 1 % de quitosano, alcanzando valores máximos de 2138 % y 1940 %, respectivamente, ambos a los 15 segundos. El uso de PBS permite simular las condiciones

fisiológicas de la matriz extracelular (ECM) nativa, gracias a su concentración de sales similar a la del cuerpo humano y su pH controlado. Esto facilita la evaluación de la capacidad de hinchamiento de los andamios en un entorno más realista.

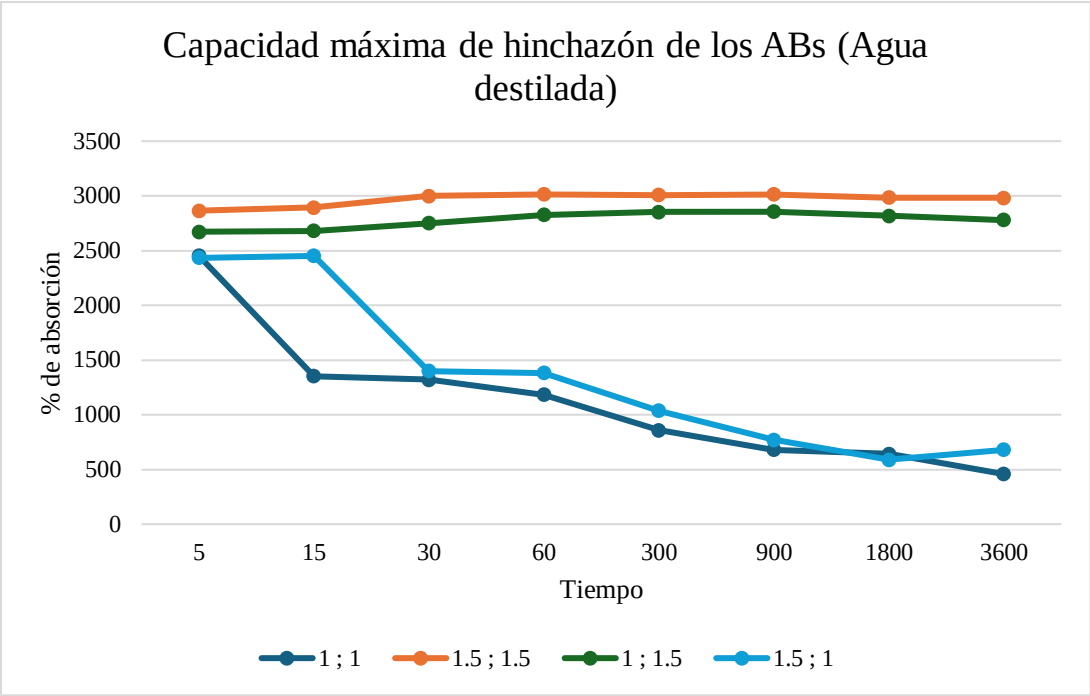


Figura 7. *Perfiles de capacidad máxima de hinchazón de los ABs (Agua destilada).*

La Figura 7 presenta los perfiles de hinchamiento de los andamios con diferentes proporciones de nanocelulosa/quitosano, evidenciando comportamientos similares en la absorción de agua destilada. Los andamios con una concentración de 1.5 %: 1.5 % registraron la mayor capacidad de hinchamiento, alcanzando un valor máximo de 3012 % a los 15 minutos. De manera comparable, los andamios con concentración 1 %: 1.5 % alcanzaron su valor pico de 2854 % también a los 15 minutos. Estos resultados sugieren que ambas formulaciones, debido a su estructura porosa y resistencia mecánica, presentan una elevada capacidad de retención de agua sin comprometer su integridad estructural ni experimentar pérdida significativa de masa.

En contraste, los andamios con concentraciones de 1 y 1 % mostraron una capacidad máxima de hinchamiento de 2452 % a los 5 segundos, mientras que los andamios con proporción 1.5 %: 1 % presentaron el menor valor registrado, con un pico de 2451 % a los 15 segundos. El agua destilada se

utilizó como una solución neutra, sin sales ni tampones, lo que evita interferencias iónicas durante el proceso de absorción (Souness et al., 2018). Por esta razón, los porcentajes de hinchamiento obtenidos fueron más elevados en comparación con los registrados en PBS.

Estos datos indican que una menor proporción de quitosano en la formulación reduce la capacidad de hinchamiento, probablemente debido a una menor cohesión estructural. Se observó que, desde los primeros segundos de exposición a medios acuosos (PBS y agua destilada), los andamios con concentraciones de 1 %: 1 % y 1.5 %: 1 % presentaron signos visibles de degradación estructural, lo que dificultó su manipulación y evidenció una pérdida parcial de masa atribuible a su baja estabilidad mecánica.

Si bien no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de absorción entre los andamios con concentraciones de 1.5: 1.5 % y 1 %: 1.5 % en ambos medios, el primero alcanzó una mayor capacidad de retención máxima. No obstante, todos los andamios evaluados mostraron una disminución progresiva en su hinchamiento a lo largo del tiempo, fenómeno asociado a la pérdida de integridad de su red porosa, lo que sugiere un límite en su estabilidad estructural bajo condiciones de hidratación prolongada.

Todos los andamios evaluados presentaron inicialmente una elevada capacidad de hinchamiento al ser expuestos a la solución empleada, lo que refleja una alta afinidad por el medio acuoso. Estos resultados son consistentes con los reportados por Felfel et al. (2019b), quienes observaron porcentajes de hinchamiento superiores al 1500 % en andamios formulados con polímeros como quitosano y agarosa. Esta elevada capacidad de absorción puede atribuirse a la naturaleza hidrofílica de ambos biopolímeros, la cual se debe a la presencia de grupos funcionales hidroxilo y amino en sus estructuras químicas.

Los andamios con concentraciones de 1.5: 1.5 % y 1 %: 1.5 % de nanocelulosa/quitosano superaron ampliamente el umbral del 1500 % de hinchamiento sin presentar deformaciones estructurales significativas. Este comportamiento se atribuye a que una mayor proporción de quitosano favorece el autoensamblaje de la nanocelulosa sobre su estructura, lo cual mejora la cohesión del andamio y permite una distribución más homogénea de las cargas mecánicas. Como consecuencia, se observan

módulos de elasticidad, límites de deformación y tenacidad considerablemente superiores en las mezclas de nanocelulosa/quitosano en comparación con los andamios compuestos únicamente por quitosano (Yin et al., 2019b).

Si bien no existe un valor definido para la capacidad máxima de hinchamiento ni una norma específica según el tipo de tejido, esta propiedad está estrechamente vinculada con parámetros como el tamaño de los poros, su interconectividad y el volumen general del andamio. Al producirse el hinchamiento, se incrementan tanto el tamaño de los poros como la porosidad total, lo cual amplía la superficie interna disponible. Este fenómeno resulta beneficioso durante el cultivo celular, ya que favorece la migración de células al interior del andamio y mejora su adherencia a la superficie. No obstante, este aumento en la capacidad de absorción también puede comprometer las propiedades mecánicas del AB.

3.1.2.2. Biodegradabilidad de los andamios biológicos

Para su adecuada funcionalidad, estos biomateriales deben estar compuestos por sustancias que presenten propiedades mecánicas apropiadas y sean biodegradables. Es importante que los materiales utilizados en los modelos 3D no provoquen la muerte celular, por lo que deben ser biocompatibles y biodegradables (Sztankovics et al., 2023). En el estudio de modelos tumorales y células cancerígenas, se emplean biomateriales conformados por mezclas de hidrogeles, andamios biológicos y células tanto tumorales como normales asociadas al cáncer.

Con el objetivo de evaluar el porcentaje de degradación de los andamios, se empleó sangre completa, lo que permitió analizar su biodegradación y estabilidad en un entorno biológico que imita las condiciones fisiológicas del ECM. Este fluido biológico está compuesto principalmente por coagulantes, proteínas plasmáticas, enzimas, electrolitos, células inmunológicas y minerales, los cuales no solo contribuyen a mantener el equilibrio del pH sanguíneo, sino que también interactúan directamente con el andamio, influyendo en su proceso de degradación (Jimenez-Martin et al., 2022).

Los resultados correspondientes a la degradación de los distintos tipos de andamios se presentan en la Figura 8. Se observó que los andamios con menor concentración de quitosano, específicamente las formulaciones 1 %: 1 % y 1.5 %: 1 % nanocelulosa/quitosano, se degradaron completamente al cuarto día con una tasa de biodegradabilidad del 6 % y 10 % respectivamente. Por otro lado, en el séptimo día se evidenció, una degradación de los andamios con concentraciones de 1.5 %: 1.5 % y 1 % 1.5 % nanocelulosa/quitosano del 44 % y 23 % respectivamente.

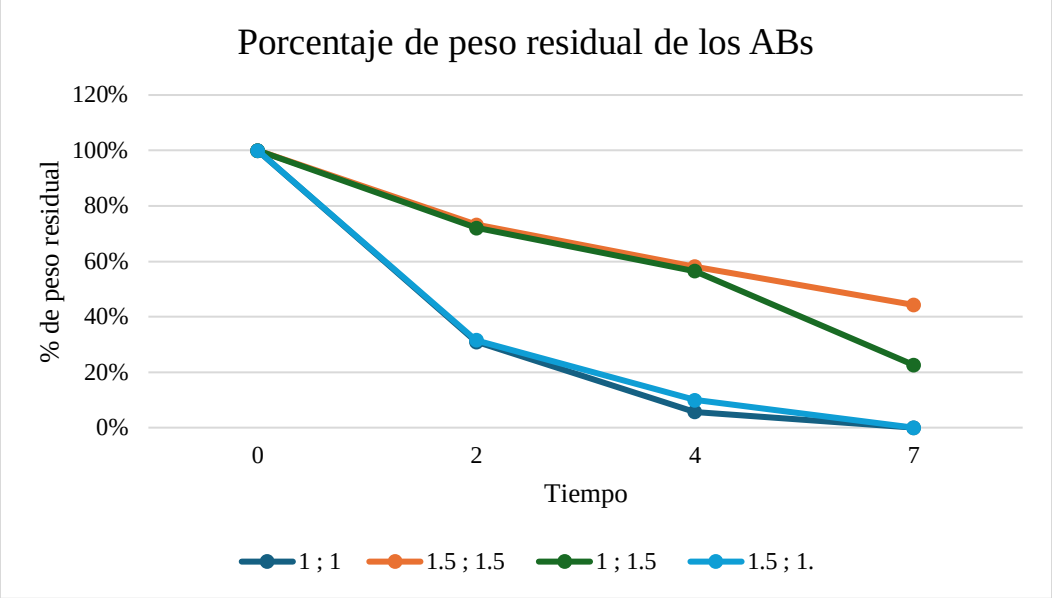


Figura 8. Porcentaje de peso residual de los ABs.

La degradación de los andamios con menor concentración con quitosano demostró tener mayor biodegradabilidad, según Abbasi et al. (2020) esto puede atribuirse al tamaño de los poros que influye directamente en el proceso de degradación de los andamios; una mayor porosidad incrementa la permeabilidad del material y disminuye su resistencia a la compresión, lo que favorece su degradación progresiva. En el caso de la nanocelulosa, aunque las células de mamíferos carecen de enzimas específicas como la celulasa para degradar la celulosa, la sangre al estar compuesta en gran parte por agua puede facilitar la degradación de la nanocelulosa.

Esto se debe a que, al ser un material hidrofílico, la nanocelulosa se dispersa fácilmente en medios acuosos mediante la formación de puentes de hidrógeno, generando una suspensión que favorece su

desintegración. Además, la ausencia de una alta concentración de cristales de celulosa en combinación con el quitosano da lugar a una estructura altamente porosa, como se evidenció en la prueba de hinchamiento, lo que acelera aún más el proceso de degradación del andamio (Abdul et al., 2020).

En los andamios con mayor concentración de polímeros, la incorporación de nanocelulosa ha demostrado mejorar las propiedades biológicas de los modelos tridimensionales, especialmente cuando se combina con otros biomateriales. De acuerdo con lo reportado por Revati et al. (2022) los andamios elaborados a partir de nanofibras de celulosa presentaron una biodegradabilidad prolongada sin afectar negativamente el crecimiento de células epiteliales. En consonancia con estos hallazgos, los resultados obtenidos en este estudio indican que las formulaciones con concentraciones de 1.5:1.5 % y 1:1.5 % de nanocelulosa/quitosano evidenciaron una tasa de degradación moderada al estar en contacto con sangre, lo cual sugiere una buena estabilidad estructural sin comprometer la viabilidad del modelo.

Aunque la nanocelulosa presenta una baja tasa de degradación *in vivo* debido a la ausencia de enzimas específicas en el organismo, su degradación controlada es una característica altamente deseable para su aplicación como modelo en cultivos celulares tridimensionales. Para superar la limitada biodegradabilidad de la nanocelulosa, se ha optado por combinarla con otros biopolímeros con mayor tasa de degradación, como el quitosano, en bajas concentraciones, lo que mejora su desempeño como soporte temporal en modelos 3D. La biodegradabilidad es un aspecto fundamental, ya que durante el crecimiento celular las células deben reemplazar progresivamente el andamio a medida que proliferan y secretan su propia matriz extracelular. Este proceso permite que el material se degrade de forma gradual y sea sustituido por nuevo tejido, lo cual favorece un desarrollo celular más representativo del entorno fisiológico *in vivo*, como ocurre en modelos tumorales. (Santillán-Mercado et al., 2017).

3.1.2.3. Evaluación coagulación de sangre entera *in vitro*

La formación del coágulo es un proceso biológico que se activa en respuesta a una herida o lesión en los vasos sanguíneos. Este mecanismo implica la activación de las plaquetas y culmina con la generación de una masa compacta denominada coágulo, la cual desempeña un papel fundamental en

la promoción de la cicatrización. Sin embargo, una formación excesiva o acelerada de coágulos puede desencadenar eventos patológicos, como la trombosis (Braune et al., 2019).

En el contexto del cáncer de próstata (CaP), la correlación observada entre el índice de coagulación sanguínea de los andamios biológicos (ABs) empleados como un modelo de cultivo celular tridimensional (3D) se relaciona con la activación de mecanismos compartidos que regulan la hemostasia, la angiogénesis, la cascada de factores de crecimiento, las citoquinas y diversas señales bioquímicas. Estos procesos son comunes tanto en la coagulación sanguínea como en la progresión tumoral (Olgasi et al., 2024).

Para la evaluación del índice de coagulación se utilizó sangre completa, estandarizando el tiempo de coagulación en 30 minutos bajo condiciones de oscuridad, de acuerdo con lo reportado en estudios previos (X. Guo et al., 2018). Posteriormente, se cuantificó el contenido de hemoglobina mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. En este análisis, un valor de absorbancia elevado se interpretó como indicativo de un proceso de coagulación más lento, lo que refleja una mayor presencia de glóbulos rojos libres o adheridos al andamio.

En la Figura 9 se observa que el índice de coagulación biológica (BCI) fue más elevado en los andamios con una concentración de 1.5 % y 1.5 % de nanocelulosa/quitosano, alcanzando un valor del 45.91%. Le siguieron los andamios con concentraciones de 1 % y 1.5 % (45.67 %), 1.5 % y 1 % (45.20 %) nanocelulosa/quitosano y, finalmente, los de 1% y 1 % con un 42.40 %. Con base en estos datos, se puede inferir que no existe una variación significativa entre las distintas formulaciones, lo que indica que ninguno de los andamios presenta un proceso de coagulación acelerado. Esta característica resulta favorable para su aplicación como modelos tridimensionales (3D) en cultivos celulares de cáncer de próstata, ya que permite estudiar no solo el crecimiento tumoral, sino también los procesos de transducción de señales involucrados en la formación de tumores (Xu et al., 2020).

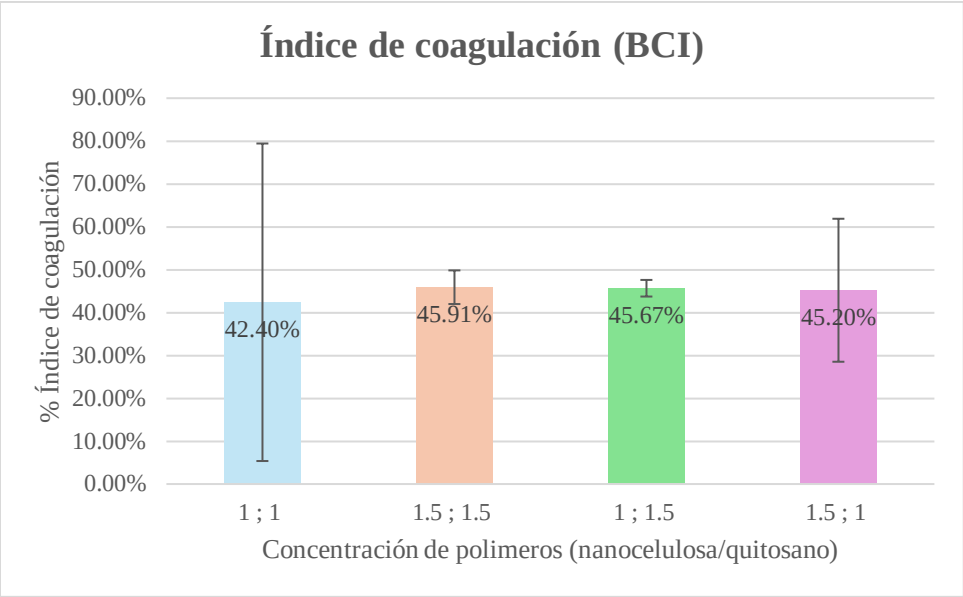


Figura 9. *Resultados evaluación coagulación de sangre entera in vitro.*

Se implementó un diseño factorial 2^2 para determinar si la concentración de nanocelulosa (factor A) y la concentración de quitosano (factor B) empleadas en la formulación de los andamios biológicos (ABs) influyen significativamente en los resultados obtenidos en las pruebas hemostáticas (variable de respuesta). Un diseño factorial completo 2^2 es un enfoque estadístico que permite evaluar de forma simultánea los efectos de dos factores, cada uno con dos niveles, sobre una variable de respuesta cuantitativa. Este tipo de diseño no solo analiza los efectos principales de cada factor por separado, sino también la interacción entre ellos, es decir, si el efecto de un factor depende del nivel del otro.

Con base en los datos obtenidos del diseño factorial 2^2, según el análisis de varianza (ANOVA) presentado en el Anexo H (Tabla 15), se obtuvieron valores de *p* inferiores a 0.005 para todos los factores principales. Esto permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, evidenciando que los factores evaluados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta. Entre ellos, el quitosano presentó el mayor efecto, mientras que la interacción entre factores mostró el menor efecto significativo sobre el índice de coagulación del andamio.

3.1.2.4. Evaluación de hemólisis *in vitro*

La evaluación *in vitro* de la hemólisis permite cuantificar la liberación de hemoglobina resultante de la ruptura de las membranas de los eritrocitos tras su exposición a un material extraño. En este contexto, una mayor cantidad de destrucción de glóbulos rojos se traduce en un porcentaje más elevado de hemólisis, lo que refleja una menor compatibilidad hemática del material evaluado (Sæbø et al., 2023).

Este parámetro está regulado por las normas ISO 10993-4, las cuales establecen que los biomateriales exógenos empleados en aplicaciones médicas deben presentar un porcentaje de hemólisis igual o inferior al 5 %. Bajo este umbral, el material se considera de bajo riesgo biológico y, por tanto, adecuado en términos de biocompatibilidad (Chi Perera et al., 2020). Las normativas definen rangos específicos para la interpretación del porcentaje de hemólisis, clasificando a los biomateriales con valores superiores al 5 % como hemolíticos, entre 2 % y 5 % como ligeramente hemolíticos, y por debajo del 2 % como no hemolíticos.

En la Figura 11 se muestra el índice de hemólisis obtenido para cada andamio en sus respectivas concentraciones. El andamio con una combinación de 1.5% y 1 % de nanocelulosa/quitosano presentó un valor de hemólisis del 5.67 %, el andamio con concentración 1 %: 1 % obtuvo un valor de hemolisis del 6.18 %. En cambio, los andamios con concentraciones de 1.5 %: 1.5 % y 1 %: 1.5 % mostraron valores considerablemente menores, con índices de hemólisis de 1.69 % y 1.43 %, respectivamente. En base a los resultados, los ABs con concentraciones de 1.5 %: 1.5% y 1%: 1.5% de celulosa/quitosano presentan condiciones no hemolíticas (inferiores al 2%) mientras que, los andamios con concentraciones del 1% y 1.5%: 1% se consideran como hemolíticos.

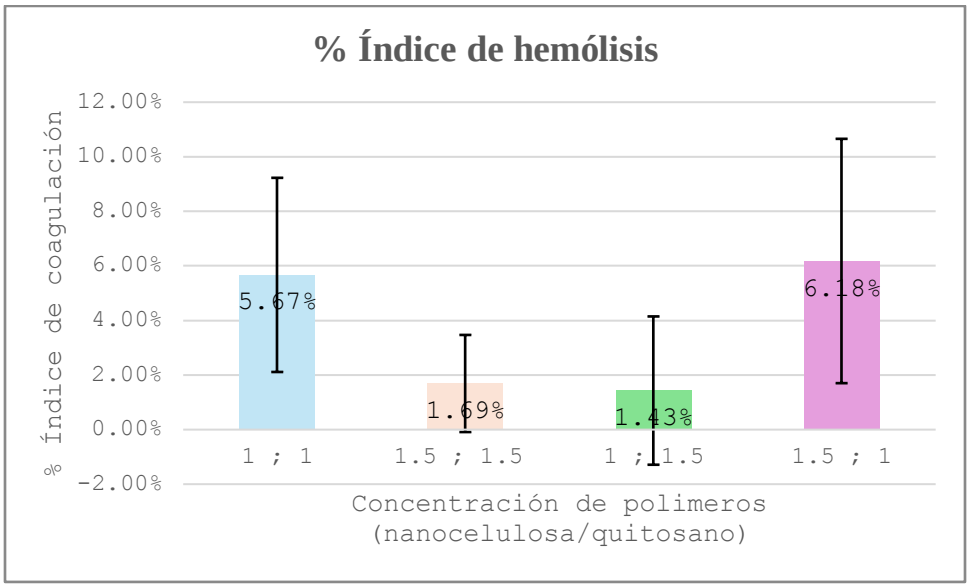


Figura 10. *Capacidad hemolítica (%) de los andamios biológicos in vitro.*

La evaluación del porcentaje de hemólisis constituye un parámetro crítico en la validación de modelos tridimensionales (3D) para cultivo celular, ya que estos sistemas deben emular, en la mayor medida posible, las condiciones de la matriz extracelular nativa. El daño a las células sanguíneas indica que cualquier célula mamífera en contacto con un material hemolítico se ve comprometida en su capacidad para adherirse, crecer y desarrollarse adecuadamente.

Además, la ruptura de eritrocitos puede generar consecuencias fisiológicas adversas, como una disminución en el transporte de oxígeno hacia los tejidos, la inducción de toxicidad y la alteración de funciones celulares esenciales (Weber et al., 2018). Los andamios que presentan mayor concentración de quitosano fueron los que no generan lisis celular, este resultado en contraste con los obtenidos por Ul-Islam et al. (2019) la penetración del quitosano en la estructura de la nanocelulosa mejoró considerablemente la biocompatibilidad de líneas celulares del cáncer.

Con base en los resultados obtenidos del diseño experimental descrito en el ensayo anterior, se analizaron los efectos de los factores mediante un análisis de varianza (ANOVA), cuyos datos se presentan en el Anexo H (Tablas 18 y 19). Los resultados indican que no existe una interacción estadísticamente significativa entre los factores A y B, ya que el efecto del factor A no varía en función del nivel del factor B. Esto se confirma por los valores de *p* mayores a 0.05 tanto para el

efecto principal de A como para la interacción AB, lo cual lleva a aceptar las respectivas hipótesis nulas y concluir que dichos efectos no influyen significativamente sobre la variable de respuesta.

En contraste, el factor B presentó un *p*-valor inferior a 0.05, lo que indica que su efecto sobre la hemólisis en los andamios biológicos evaluados es altamente significativo desde el punto de vista estadístico. Esto sugiere que las variaciones en la concentración de quitosano tienen un impacto claro sobre el comportamiento hemostático

3.1.2.5. Evaluación de adhesión glóbulos rojos *in vitro*

Para determinar la adhesión de glóbulos rojos al andamio, se utilizó un kit de cuantificación de hemoglobina. Los andamios fueron sumergidos en sangre completa anticoagulada con citrato y, posteriormente, se retiraron para liberar las células sanguíneas adheridas mediante lisis osmótica utilizando agua desionizada (solución hipotónica). La cantidad de hemoglobina liberada como resultado de la lisis celular fue proporcional al número de glóbulos rojos adheridos a la superficie del andamio.

En la Figura 13 se muestra la concentración de hemoglobina obtenida en cada uno de los andamios fabricados con diferentes proporciones de los polímeros empleados. Los valores más altos de adhesión de glóbulos rojos se observaron en los andamios con concentraciones de 1.5 %: 1.5 %, 1%: 1.5 % y 1.5 %: 1 % de nanocelulosa/quitosano, con valores de 3838, 3546 y 5333 mg de eritrocitos/dL de sangre, respectivamente. En contraste, el valor más alto que fue de 5436 mg/dL en el andamio con una concentración de 1:1 %. Estos resultados, en relación con la cantidad total de eritrocitos en sangre, corresponden aproximadamente al 21 %, 19 %, 29 % y 30 %, respectivamente.

En base con estos resultados, según Ullah et al. (2023) validan los andamios biológicos que presentan una menor cantidad de adhesión de eritrocitos, no inducen adhesión indeseada de celulas sanguíneas, lo cual es importante para evitar interferencias en el cultivo de celulas epiteliales, endoteliales o tumorales. En comparación con la prueba de hemolisis realizada, los andamios con una mayor

concentración de quitosano presentan una mejor biocompatibilidad hemática, volviéndolos compatibles para aplicaciones en modelos 3D de cultivo celular vascularizado.

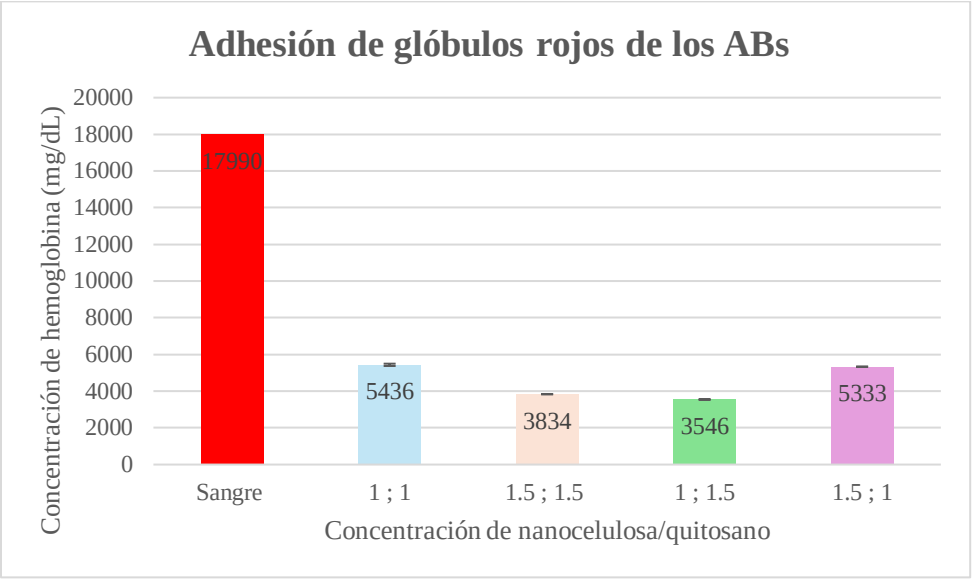


Figura 11. *Resultados evaluación de adhesión glóbulos rojos in vitro.*

La adhesión de los glóbulos rojos se relaciona con la idoneidad del andamio desarrollado para su aplicación como modelo 3D en cultivos celulares de líneas cancerígenas. Una baja adhesión de eritrocitos sugiere que el material no es altamente trombogénico, es decir, no induce daño celular, lo cual resulta favorable para el crecimiento y mantenimiento de células mamíferas. En cambio, una alta adhesión de glóbulos rojos indica que la superficie del andamio promueve interacciones no deseadas, lo que podría comprometer la viabilidad celular en cultivos in vitro (Shefa et al., 2019).

A pesar que la adhesión de eritrocitos se considera un punto de partida para evaluar la capacidad de la superficie de un andamio en la adherencia de células mamíferas, los resultados obtenidos por Hatakeyama & Kitaoka (2022) demuestran que el tratamiento aplicado durante la elaboración de andamios a base de nanocelulosa, en combinación con proteínas adhesivas como la fibronectina y factores que promueven la adhesión celular, tiene un impacto significativo en la adhesión y proliferación de células cancerígenas.

Para evaluar el efecto de los polímeros empleados en esta prueba, se calcularon los efectos principales e interacción sobre la variable de respuesta, según se detalla en el Anexo H (Tabla 22). Los resultados muestran que tanto el factor A (nanocelulosa) como la interacción AB ejercen un efecto directamente proporcional sobre la adhesión de glóbulos rojos, siendo ambos estadísticamente significativos. Cabe destacar que el efecto combinado de A y B (interacción AB) fue el que mostró mayor magnitud, lo que sugiere que la sinergia entre los dos polímeros es el principal determinante del comportamiento observado.

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) presentado en el Anexo H (Tabla 23), todos los factores evaluados arrojaron valores de *p* inferiores a 0.05, lo cual permite rechazar las hipótesis nulas correspondientes y confirmar que los factores A, B y su interacción AB influyen significativamente en la variable de respuesta. Entre ellos, el factor B (quitosano) resultó ser el más influyente, ya que su valor de F calculado fue considerablemente superior al valor crítico de F, lo que evidencia su alta significancia dentro del modelo estadístico.

3.1.2.6. Evaluación plaquetaria *in vitro*

Para que un andamio sea viable como modelo tridimensional (3D) en el cultivo de células cancerígenas de próstata, debe presentar una alta biocompatibilidad y favorecer la adhesión celular; en este sentido, la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se emplea como un parámetro indicativo de lisis celular, especialmente en materiales que buscan imitar las funciones de la matriz extracelular nativa. Esta enzima se libera al medio extracelular únicamente cuando se ve comprometida la integridad de la membrana plasmática. Por consiguiente, dependiendo del enfoque experimental, niveles elevados de LDH en los andamios pueden utilizarse como un indicador de citotoxicidad o, de manera complementaria, como una herramienta para evaluar la viabilidad celular (Nazarkina et al., 2025).

En este estudio, la cuantificación de LDH se utilizó con el último propósito anteriormente nombrado, evaluar la adhesión plaquetaria. Para ello, se incorporó Tritón X-100 como agente surfactante, el cual induce la lisis de las plaquetas adheridas a la superficie del andamio. De esta forma, la cantidad de LDH liberada estima exclusivamente el número de plaquetas adheridas, sin representar un indicador

del daño celular general. La adhesión plaquetaria de los cuatro tipos de andamios se evaluó de forma indirecta mediante la cuantificación del porcentaje de liberación de LDH, lo cual refleja la cantidad de plaquetas adheridas a la superficie de cada muestra.

Los andamios con concentraciones de 1.5 %: 1.5%, 1 %: 1.5 % y 1.5 %: 1 % de nanocelulosa/quitosano presentaron niveles de adhesión plaquetaria de 74.18 %, 70.29 % y 77.70 %, respectivamente. En contraste, los andamios con la menor concentración de los polímeros evaluados (1 %: 1 %) mostraron un valor significativamente inferior, con un 30.94 % de adhesión, lo que indica una baja afinidad de la superficie del andamio para la interacción con plaquetas.

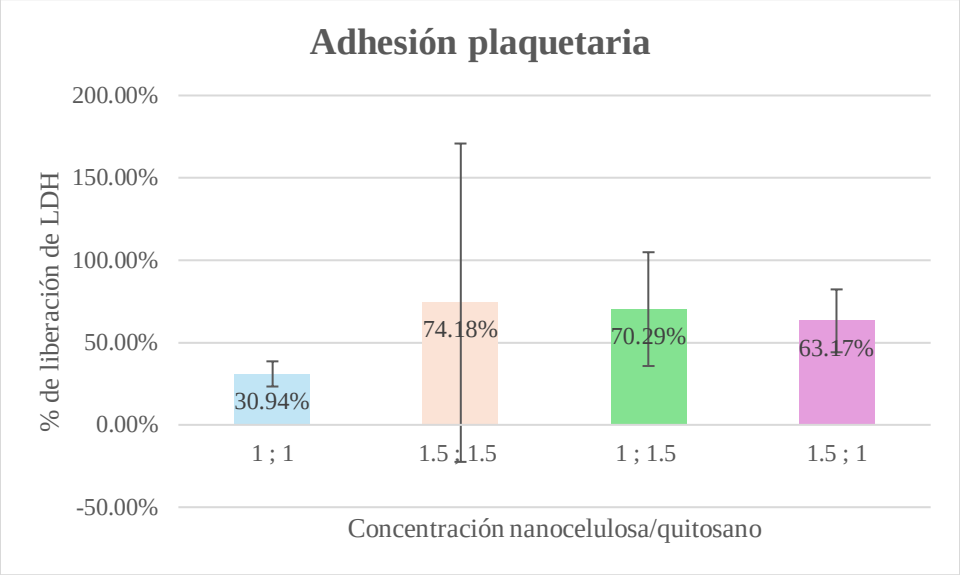


Figura 12. *Resultados evaluación de adhesión plaquetaria in vitro.*

En la Figura 15 se identifica una alta tasa de adhesión plaquetaria en los andamios con mayor concentración de quitosano. Este comportamiento se atribuye a las propiedades de la nanocelulosa y quitosano como biopolímeros altamente biocompatibles, según Kulkarni et al. (2021) el quitosano a pesar de sus características idóneas que se asemejan a la matriz extracelular, presenta adhesión celular limitada y carece de bioseñalización, es por ello que en conjunto con la nanocelulosa, este factor puede aumentar ya que resultados reportados por Rosendahl et al. (2021) han conseguido andamios 3D de nanocelulosa con un índice de adhesión celular elevado de celulas de cáncer en los primeros días del cultivo.

Según los resultados presentados en el Anexo H (Tabla 26), el factor A (concentración de nanocelulosa) mostró un efecto positivo sobre la variable de respuesta, lo que indica una relación directamente proporcional: a mayor concentración de nanocelulosa, mayor es la adhesión plaquetaria observada. Por otro lado, el factor B (concentración de quitosano) presentó un efecto de mayor magnitud en comparación con A, lo que sugiere que su influencia sobre la variable de respuesta es ligeramente más significativa.

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) mostrado en el Anexo H (Tabla 27), todos los factores evaluados arrojaron valores de *p* menores a 0.05, lo cual permite rechazar las hipótesis nulas y concluir que tanto los efectos principales como la posible interacción entre A y B son estadísticamente significativos sobre la adhesión plaquetaria. Entre los factores, B fue el más determinante, como se evidencia por su valor de F calculado considerablemente mayor que el F crítico, lo que confirma su alta significancia estadística dentro del modelo. Este resultado sugiere que el quitosano podría estar modulando de forma más eficiente la interacción entre las plaquetas y la superficie del andamio, desempeñando un papel clave en el comportamiento hemostático del material.

3.1.2. Verificación si los andamios biológicos de nanocelulosa vegetal y quitosano poseen condiciones óptimas para futuros ensayos con líneas celulares

3.1.2.1. Neutralización de los andamios

Durante el proceso de neutralización de las distintas concentraciones de los andamios, se midió el pH de cada uno mediante su inmersión en agua destilada, obteniéndose un valor promedio de pH de 5.4 en los andamios biológicos ABs. Para corregir este valor, los andamios fueron sumergidos en una solución de NaOH al 0.5 M durante 30 segundos. Posteriormente, tras realizar los lavados con agua destilada, los andamios neutralizados alcanzaron un pH promedio de 7.3. Se observaron cambios evidentes en las características físicas y estructurales de los andamios tras el proceso de liofilización.

Como se muestra en la Figura 17, el tamaño de los andamios después de la inmersión es considerablemente menor en comparación con los andamios sin neutralizar. Asimismo, se evidencian modificaciones en el aspecto superficial, de igual manera el color de los andamios neutralizados se tornó más blanquecinos. La neutralización de los andamios constituye un paso fundamental, ya que el entorno de la matriz extracelular presenta un pH cercano a la neutralidad. Por ello, lograr que los andamios se asemejen lo más posible a este entorno es crucial para garantizar su efectividad como modelo tridimensional (3D) en cultivos celulares, especialmente en estudios relacionados con células cancerígenas.

Mantener un pH neutro, sin sobrepasar un valor de 7.4, ha demostrado favorecer la viabilidad celular y reducir la citotoxicidad de los andamios, como se evidenció en el estudio de (Moldero et al., 2020). Además, se destaca la importancia de evitar fluctuaciones significativas en el pH del entorno extracelular, ya que estas podrían comprometer el desarrollo y comportamiento celular en el sistema de cultivo.

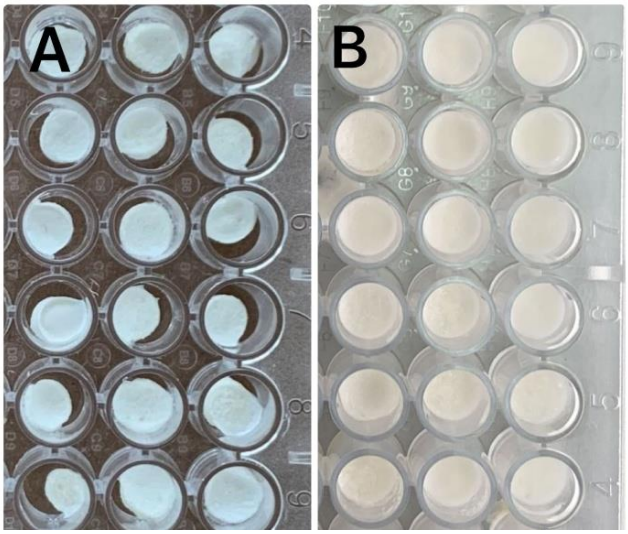


Figura 13. Neutralizacion de andamios de nanocelulosa/quitosano

Nota: A) andamios neutralizados después del proceso de liofilización B) andamios sin neutralizar después del proceso de liofilización.

3.1.2.2. Esterilización de los andamios biológicos

En el diseño de andamios para aplicaciones biomédicas en el cultivo celular, la selección del método de esterilización es un aspecto fundamental, ya que este procedimiento modificarse significativamente las propiedades estructurales y químicas del material. Para andamios fabricados a partir de biopolímeros, los métodos de esterilización más utilizados incluyen tratamientos térmicos, el uso de agentes químicos como etanol, óxido de etileno, yodo y dióxido de carbono (CO_2), así como técnicas basadas en radiación, entre ellas radiación gamma, haz de electrones y luz ultravioleta (Dai et al., 2016).

En el presente estudio, se empleó radiación ultravioleta (UV) como método de esterilización para todos los andamios, elaborados con diferentes concentraciones de nanocelulosa y quitosano. Con el fin de evaluar la eficacia del proceso de esterilización, se procedió a la inoculación de los andamios previamente esterilizados en placas con medio Agar Sangre. Este medio de cultivo, altamente enriquecido, es ampliamente utilizado para el crecimiento de microorganismos y la identificación de bacterias hemolíticas. A diferencia de otros medios nutritivos, el Agar Sangre proporciona un entorno fisiológicamente adecuado para el desarrollo de microorganismos asociados a humanos, lo que lo convierte en un sistema sensible y eficaz para la detección de contaminación microbiana residual en andamios biológicos esterilizados (Francisco et al., 2021).

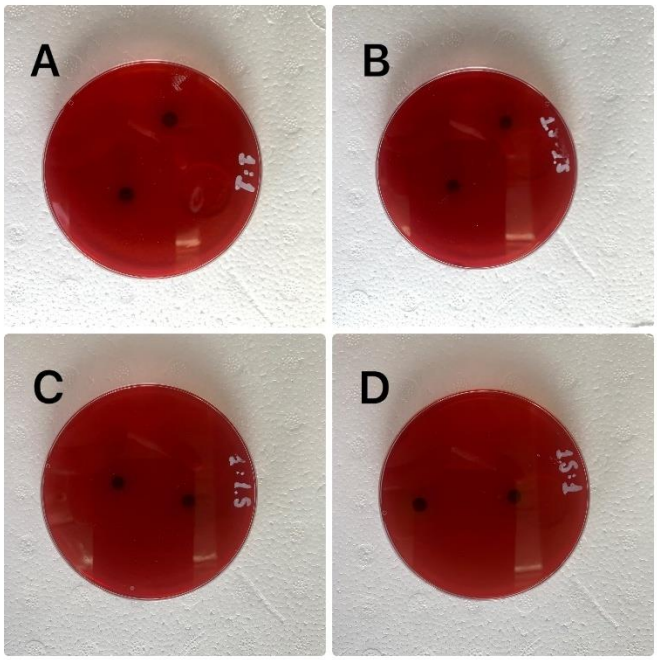


Figura 14. *Evaluación del método de esterilidad UV en Agar Sangre*

Nota: A) Andamios con concentracion 1 % y 1 % nanocelulosa/quitosano B) Andamios con concentracion 1.5 % y 1.5 % nanocelulosa/quitosano C) Andamios con concentracion 1 % y 1.5 % nanocelulosa/quitosano D) Andamios con concentracion 1.5 % y 1 % nanocelulosa quitosano

La esterilización de andamios destinados al uso como modelos tridimensionales (3D) en estudios de cáncer de próstata (CaP) es un requisito fundamental, ya que garantiza un entorno libre de interferencias biológicas que puedan afectar el desarrollo y comportamiento celular. En el estudio sobre la transición epitelial-mesenquimal en células de CaP realizado por Xu et al. (2020b), los andamios utilizados fueron previamente esterilizados, lo que permitió un análisis adecuado de todas las fases del proceso celular. De manera similar, en investigaciones centradas en la influencia del fenotipo tumoral en CaP, los andamios empleados también fueron esterilizados antes del cultivo celular, asegurando así condiciones óptimas para el estudio de las interacciones celulares y la progresión del modelo in vitro (Molla et al., 2020).

3.1.2.3. Evaluación del ensayo de resazurina

El ensayo de resazurina es una herramienta útil para realizar mediciones rápidas y confiables de la viabilidad celular en cultivos de células de mamífero y bacterias. Las células metabólicamente activas reducen la resazurina, un compuesto azul y no fluorescente, a resorufina, un compuesto rosado y fluorescente. Esta conversión es proporcional al nivel de actividad metabólica, por lo que actúa como un indicador indirecto de viabilidad celular. Además, la resazurina presenta baja citotoxicidad y permite realizar un análisis no destructivo, lo que la hace especialmente adecuada para monitorear de forma continua la proliferación celular en andamios u otros biomateriales durante el cultivo en modelos tridimensionales (3D). La intensidad del cambio de color o fluorescencia puede correlacionarse directamente con la cantidad de células viables presentes en el sistema (Gong et al., 2020).

En este estudio, se aplicó el ensayo de resazurina para evaluar la proliferación bacteriana en distintos tipos de andamios biológicos (ABs) expuestos a *S. aureus* en agar nutritivo. Se realizaron cuatro tratamientos experimentales, que incluyeron andamios esterilizados y no esterilizados. Cada grupo fue sembrado en 2300 µL de agar nutritivo, y posteriormente inoculado con *S. aureus*. Este enfoque

permitió no solo evaluar la efectividad del proceso de esterilización por radiación UV, sino también determinar la actividad antimicrobiana inherente de los andamios, atribuible a los polímeros utilizados en su formulación.

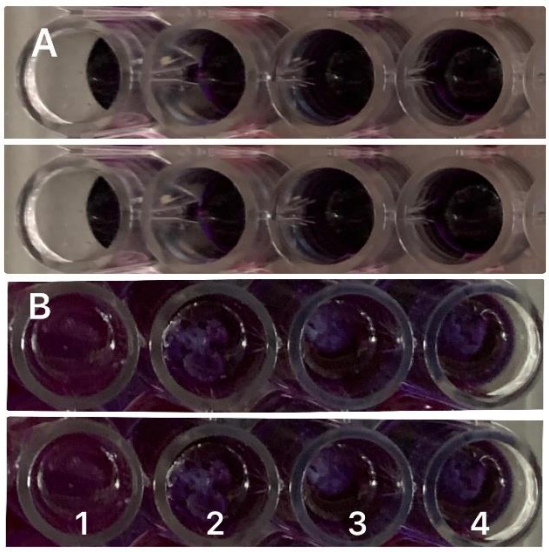


Figura 15. *Evaluación de inhibición celular (Resazurina).*

Nota: a) Andamios esterilizados en presencia de Agar nutritivo b) Andamios esterilizados en presencia de agar nutritivo *S. aureus* y antibiótico. La numeración en cada columna de pocillos corresponde a una diferente concentración de andamios. 1) 1 % y 1 % nanocelulosa/quitosano 2) 1.5 % y 1.5 % nanocelulosa/quitosano 3) 1 % y 1.5 % nanocelulosa/quitosano 4) 1.5 % y 1 % nanocelulosa/quitosano

En la Figura 19 se observa que, tras la adición de resazurina, los andamios expuestos únicamente a agar nutritivo no presentaron cambio de color hacia el tono rosado característico de la resorufina, lo que indica ausencia de actividad metabólica bacteriana y, por tanto, confirma la efectividad del proceso de esterilización. La esterilidad del andamio como modelo 3D en presencia de medios nutritivos es de suma importancia

Sin embargo, en los andamios inoculados con *Staphylococcus aureus*, se evidenció una leve coloración rosada, particularmente en aquellos elaborados con una concentración de 1:1 % de nanocelulosa/quitosano. Esta tinción sugiere una posible proliferación bacteriana residual. Una explicación probable es que la mayor porosidad de estos andamios facilita la retención de bacterias

en zonas más profundas, lo que podría reducir la eficacia de la esterilización y permitir el crecimiento bacteriano en espacios no totalmente expuestos al agente esterilizante (Lee et al., 2020)**.**

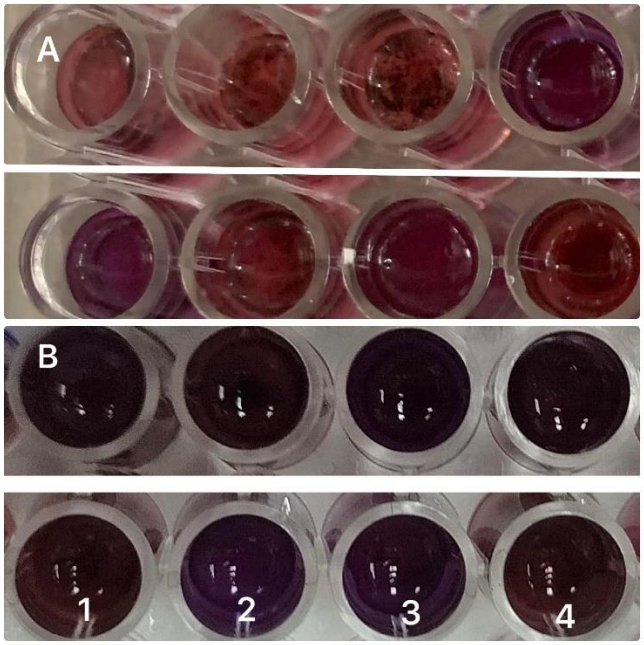


Figura 16. *Evaluación de inhibición celular (Resazurina).*

Nota: a) Andamios sin esterilizar en presencia de Agar nutritivo b) Andamios sin esterilizar en presencia de agar nutritivo *S. aureus* y antibiótico. La numeración en cada columna de pocillos corresponde a una diferente concentración de andamios. 1) 1 % y 1 % nanocelulosa/quitosano 2) 1.5 % y 1.5 % nanocelulosa/quitosano 3) 1 % y 1.5 % nanocelulosa/quitosano 4) 1.5 % y 1 % nanocelulosa/quitosano

En el caso de los andamios no esterilizados, se observa en la Figura 20 que aquellos que fueron sumergidos únicamente en agar nutritivo presentaron crecimiento microbiano visible. Este resultado podría atribuirse a varios factores, como la exposición prolongada de los andamios al ambiente, la manipulación previa al ensayo, o el tiempo transcurrido desde su fabricación. Además, considerando que los polímeros empleados no presentan propiedades citotóxicas, es posible que las estructuras porosas de los andamios favorezcan la colonización microbiana.

En contraste, los andamios tratados con antibiótico no mostraron señales de proliferación microbiana, lo que se evidencia por la ausencia de tinción, excepto en los andamios con concentraciones de 1:1 % y 1.5:1 % de nanocelulosa/quitosano. En estos casos, la leve tinción observada sugiere una posible

persistencia de microorganismos, lo que podría relacionarse con una mayor porosidad o una menor eficacia de difusión del antibiótico en dichas formulaciones.

En el contexto de la viabilidad celular, se puede establecer una correlación preliminar entre el crecimiento de *S. aureus* y la capacidad de proliferación celular en un modelo 3D, ya que ambos procesos requieren una estructura que no sea citotóxica para las células. En este sentido, los andamios evaluados demostraron ser biocompatibles, lo cual es esencial para su aplicación como soporte en cultivos celulares tridimensionales.

Los andamios elaborados con nanocelulosa han mostrado, en estudios de cultivo con líneas celulares, no inducir citotoxicidad, lo que representa un aspecto clave para el desarrollo de modelos 3D funcionales en investigaciones relacionadas con el cáncer de próstata. Las células cultivadas sobre estos andamios no evidenciaron daño en la membrana plasmática ni alteraciones en la densidad celular, lo que sugiere condiciones favorables para su viabilidad y proliferación (Landberg et al., 2020).

.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Los andamios elaborados a partir de nanocelulosa vegetal y quitosano en proporciones 1:1, 1.5:1.5, 1:1.5 y 1.5:1 presentaron una coloración blanquecina sin diferencias perceptibles entre las concentraciones evaluadas, además de encontrarse completamente secos debido al proceso de liofilización. Se evidenció que los andamios con menor concentración de quitosano mostraron mayor fragilidad y fueron más susceptibles a daños durante las diferentes pruebas realizadas, presentando también características visuales menos favorables, como una mayor porosidad. El procedimiento previo para la obtención de la nanocelulosa influye significativamente en su calidad, ya que, al tratarse de un material insoluble en cualquier medio, la reticulación dentro de la solución polimérica afecta los resultados finales en términos de las propiedades físicas de los andamios. Asimismo, la nanocelulosa obtenida mostró un mayor tiempo de dispersión en la solución durante la fabricación de los andamios.

- Los andamios formulados con concentraciones de 1.5:1.5 % y 1:1.5 % de nanocelulosa:quitosano mostraron las condiciones más favorables para este propósito. Estos presentaron una tasa de coagulación inferior al 50 %, lo que representa un tiempo adecuado que evita la formación de agregados celulares, permitiendo así el estudio eficiente de las interacciones célula-célula. Asimismo, exhibieron bajas tasas de hemólisis (1.64 % y 1.23 %, respectivamente), lo que indica que la superficie del andamio no induce lisis eritrocitaria. En cuanto a la adhesión eritrocitaria y plaquetaria, estos andamios presentaron una adhesión adecuada, favoreciendo fenómenos clave como la vascularización, señalización celular y transducción de señales. Estos aspectos son fundamentales para comprender los procesos genéticos asociados a la progresión tumoral y a la metástasis en el contexto del CaP.

- Las concentraciones de nanocelulosa y quitosano mostraron efectos estadísticamente significativos en la prueba de coagulación sanguínea, lo que indica que ambos polímeros influyen en la formación del coágulo. En la prueba de hemólisis, únicamente el quitosano presentó un efecto significativo, reduciendo el daño eritrocitario gracias a sus propiedades no

citotóxicas. En cambio, la nanocelulosa no tuvo un impacto relevante sobre la hemólisis, por lo que su combinación con quitosano tampoco generó un efecto significativo en este parámetro. En las pruebas de adhesión eritrocitaria y plaquetaria, las concentraciones de ambos polímeros influyeron significativamente en la variable de respuesta, evidenciando que la composición del andamio afecta directamente la interacción con células sanguíneas. Los gráficos de interacción revelaron que los factores actúan de manera independiente, sin interacción significativa entre ellos, lo que implica que cada polímero ejerce su efecto de forma aislada. Entre los factores evaluados, el quitosano fue el más relevante en términos biológicos, ya que demostró efectos estadísticamente significativos en la mayoría de las pruebas, posicionándolo como un componente clave en la formulación de andamios con propiedades biofuncionales adecuadas para aplicaciones en modelos celulares tridimensionales.

- Los andamios utilizados como modelos tridimensionales (3D) para el estudio de líneas celulares del cáncer de próstata (CaP) deben presentar una viabilidad celular óptima, ya que esta es esencial para asegurar la proliferación adecuada de las células. En este sentido, garantizar un entorno neutro es un paso fundamental para replicar las condiciones de la matriz extracelular (ECM), dado que el microambiente nativo de esta patología se caracteriza por un pH ligeramente alcalino, sin sobrepasar un valor de 7.5. Asimismo, la esterilidad de los andamios constituye un aspecto crítico, ya que la presencia de microorganismos o células no deseadas compromete la funcionalidad del modelo 3D como sistema de cultivo celular. Por otro lado, la evaluación de la viabilidad bacteriana ofrece una aproximación preliminar para determinar si los andamios generan un entorno compatible con la proliferación celular. No obstante, dado que las bacterias requieren menos condiciones para su crecimiento, su presencia únicamente brinda una referencia superficial sobre la biocompatibilidad del entorno. Por lo tanto, este ensayo permite identificar si la combinación de nanocelulosa/quitosano junto con los medios nutritivos altera el microambiente líquido, volviéndolo potencialmente tóxico.

4.2. Recomendaciones

- Implementar una diferente metodología en la extracción de nanocelulosa para evaluar el efecto de este en la elaboración de los andamios

- Modificar las cantidades de sangre empleadas para evaluar el comportamiento de los andamios.

- Aplicar otras técnicas de esterilización sobre los andamios biológicos.

- Explorar la combinación de nanocelulosa con otros biopolímeros con el fin de evaluar cómo estas mezclas influyen en el desempeño como modelos 3D.

BIBLIOGRAFÍA

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

Abbasian, M., Massoumi, B., Mohammad-Rezaei, R., Samadian, H., & Jaymand, M. (2019). Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering? *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 673–694. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.04.197

Abdul Khalil, H. P. S., Jummaat, F., Yahya, E. B., Olaiya, N. G., Adnan, A. S., Abdat, M., Nasir, N. A. M., Halim, A. S., Seeta Uthaya Kumar, U., Bairwan, R., & Suriani, A. B. (2020). A Review on Micro- to Nanocellulose Biopolymer Scaffold Forming for Tissue Engineering Applications. *Polymers* , *12*(9), 2043. https://doi.org/10.3390/POLYM12092043

Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., & Husseini, G. A. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science* , *31*(1), 1–39. https://doi.org/10.1186/S12929-024-00994-Y

Acevedo, S. A., José, Á., Carrillo, D., Flórez-López, E., David Grande-Tovar, C., Marchetti, N., Costi, R., & Co, (Á J D C. (2021). Recovery of Banana Waste-Loss from Production and Processing: A Contribution to a Circular Economy. *Molecules* , *26*(17), 5282. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26175282

Afify, S. M., & Seno, M. (2019). Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers* , *11*(3), 345. https://doi.org/10.3390/CANCERS11030345

Aggarwal, J., Sharma, S., Kamyab, H., & Kumar, A. (2020). The Realm of Biopolymers and Their Usage: An Overview. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, *8*(2), 1005–1016. http://www.jett.dormaj.com

Andreasson, J., & Johansson, T. (2024). The Cultural History of the Prostate. *Prostate Cancer, Sexual Health, and Ageing Masculinities*, 15–30. https://doi.org/10.1007/978-3-031-53039-5_2

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

Bacha, E. G. (2022). Response Surface Methodology Modeling, Experimental Validation, and Optimization of Acid Hydrolysis Process Parameters for Nanocellulose Extraction. *South African Journal of Chemical Engineering*, *40*, 176–185. https://doi.org/10.1016/J.SAJCE.2022.03.003;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;JOURNAL:JOURNAL:CHEMENG;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:CHEMENG;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Banvillet, G., Depres, G., Belgacem, N., & Bras, J. (2021). Alkaline treatment combined with enzymatic hydrolysis for efficient cellulose nanofibrils production. *Carbohydrate Polymers*, *255*, 117383. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117383

Baruffaldi, D., Palmara, G., Pirri, C., & Frascella, F. (2021). 3D Cell Culture: Recent Development in Materials with Tunable Stiffness. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(3), 2233–2250. https://doi.org/10.1021/ACSABM.0C01472/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MT0C01472_M002.GIF

Bharadwaz, A., & Jayasuriya, A. C. (2020). Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering*, *110*, 110698. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.110698

Biswal, T. (2021). Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*, *41*, 397–402. https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.09.628

Braune, S., Latour, R. A., Reinthaler, M., Landmesser, U., Lendlein, A., & Jung, F. (2019). In Vitro Thrombogenicity Testing of Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, *8*(21), 1900527. https://doi.org/10.1002/ADHM.201900527;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Budishevska, O., Popadyuk, N., Musyanovych, A., Kohut, A., Donchak, V., Voronov, A., & Voronov, S. (2020). Formation of three-dimensional polymer structures through radical and ionic reactions of peroxychitosan. *Studies in Natural Products Chemistry*, *64*, 365–390. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00012-7

Caballero, H. (2021). SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER SOLCA NÚCLEO DE QUITO Boletín Epidemiológico. In *Caballero, Henry* (Vol. 02). https://solcaquito.org.ec/wp-content/uploads/2022/04/boletin2ProstataRev.pdf

Cacciamali, A., Villa, R., & Dotti, S. (2022). 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. *Frontiers in Physiology*, *13*, 836480. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.836480/XML/NLM

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

Chu, Y., Sun, Y., Wu, W., & Xiao, H. (2020). Dispersion Properties of Nanocellulose: A Review. *Carbohydrate Polymers*, *250*, 116892. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116892

Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, *31*(21), 2010609. https://doi.org/10.1002/ADFM.202010609;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION

Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, *7*. https://doi.org/10.1177/2041731416648810

Das, A., Ringu, T., Ghosh, S., & Pramanik, N. (2023). A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers. *Polymer Bulletin*, *80*(7), 7247–7312. https://doi.org/10.1007/S00289-022-04443-4/FIGURES/31

De Carvalho, C., Sgambato, N., Guimaraes, C., & Furtado, A. M. (2015). Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from corn husk. *Materials Letters*, *148*, 26–29. https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2015.02.047

Deb, P., Deoghare, A. B., Borah, A., Barua, E., & Das Lala, S. (2018). Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Materials Today: Proceedings*, *5*(5), 12909–12919. https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2018.02.276

Dozzo, A., Chullipalliyalil, K., McAuliffe, M., O'Driscoll, C. M., & Ryan, K. B. (2023). Nano-Hydroxyapatite/PLGA Mixed Scaffolds as a Tool for Drug Development and to Study Metastatic Prostate Cancer in the Bone. *Pharmaceutics*, *15*(1), 242. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15010242/S1

Elitok, M. S., Gunduz, E., Gurses, H. E., & Gunduz, M. (2018). Tissue Engineering: Towards Development of Regenerative and Transplant Medicine. *Omics Technologies and Bio-*

Engineering: Towards Improving Quality of Life, *1*, 471–495. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00020-8

Evans, E., & Ballen, F. (2012). Banana Market. *EDIS*, *2012*(3). https://doi.org/10.32473/EDIS-FE901-2012

Fanovich, M. A., Di Maio, E., & Salerno, A. (2023). Current Trend and New Opportunities for Multifunctional Bio-Scaffold Fabrication via High-Pressure Foaming. *Journal of Functional Biomaterials* , *14*(9), 480. https://doi.org/10.3390/JFB14090480

Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Zakir Hossain, K. M., Roberts, G. A. F., & Grant, D. M. (2019a). Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, *204*, 59–67. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.10.002

Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Zakir Hossain, K. M., Roberts, G. A. F., & Grant, D. M. (2019b). Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, *204*, 59–67. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.10.002

Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2020). Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* , *21*(18), 6806. https://doi.org/10.3390/IJMS21186806

Fontoura, J. C., Viezzer, C., dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., Antonow, D., Severino, P., & Bonorino, C. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering* , *107*, 110264. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110264

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), 10089–10098. https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1008910098

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

Guo, X., Sun, T., Zhong, R., Ma, L., You, C., Tian, M., Li, H., & Wang, C. (2018). Effects of Chitosan Oligosaccharides on Human Blood Components. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 431684. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01412/BIBTEX

Guo, Y., Zhang, Y., Zheng, D., Li, M., & Yue, J. (2020). Isolation and characterization of nanocellulose crystals via acid hydrolysis from agricultural waste-tea stalk. *International Journal of Biological Macromolecules*, *163*, 927–933. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.009

Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular* , *22*(22), 12200. https://doi.org/10.3390/IJMS222212200

Harini, K., Ramya, K., & Sukumar, M. (2018). Extraction of nano cellulose fibers from the banana peel and bract for production of acetyl and lauroyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, *201*, 329–339. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.08.081

Harugade, A., Sherje, A. P., & Pethe, A. (2023). Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, *191*, 105634. https://doi.org/10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2023.105634

Hatakeyama, M., & Kitaoka, T. (2022). Surface-Carboxylated Nanocellulose-Based Bioadaptive Scaffolds for Cell Culture. *Cellulose*, *29*(5), 2869–2883. https://doi.org/10.1007/S10570-021-04154-5/METRICS

Hippler, M., Lemma, E. D., Bertels, S., Blasco, E., Barner-Kowollik, C., Wegener, M., & Bastmeyer, M. (2019). 3D Scaffolds to Study Basic Cell Biology. *Advanced Materials*, *31*(26), 1808110. https://doi.org/10.1002/ADMA.201808110

Hoarau-Véchot, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences* , *19*(1), 181. https://doi.org/10.3390/IJMS19010181

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

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

Kabenge, I., Omulo, G., Banadda, N., Seay, J., Zziwa, A., & Kiggundu, N. (2018). Characterization of Banana Peels Wastes as Potential Slow Pyrolysis Feedstock. *Journal of Sustainable Development*, *11*(2), 14. https://doi.org/10.5539/jsd.v11n2p14

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, *14*(4), 910–919. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743

Katrilaka, C., Karipidou, N., Petrou, N., Manglaris, C., Katrilakas, G., Tzavellas, A. N., Pitou, M., Tsiridis, E. E., Choli-Papadopoulou, T., & Aggeli, A. (2023). Freeze-Drying Process for the Fabrication of Collagen-Based Sponges as Medical Devices in Biomedical Engineering. *Materials 2023* , *16*(12), 4425. https://doi.org/10.3390/MA16124425

Kaur, P., Sharma, N., Munagala, M., Rajkhowa, R., Aallardyce, B., Shastri, Y., & Agrawal, R. (2021). Nanocellulose: Resources, Physio-Chemical Properties, Current Uses and Future Applications. *Frontiers in Nanotechnology*, *3*, 747329. https://doi.org/10.3389/FNANO.2021.747329/BIBTEX

Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, *169*, 85–94. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.12.005

Koyyada, A., & Orsu, P. (2021). Recent Advancements and Associated Challenges of Scaffold Fabrication Techniques in Tissue Engineering Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, *7*(2), 147–159. https://doi.org/10.1007/S40883-020-00166-Y/METRICS

Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels* , *9*(2), 100. https://doi.org/10.3390/GELS9020100

Kulkarni, N., Shinde, S. D., Jadhav, G. S., Adsare, D. R., Rao, K., Kachhia, M., Maingle, M., Patil, S. P., Arya, N., & Sahu, B. (2021). Peptide-Chitosan Engineered Scaffolds for Biomedical

Applications. *Bioconjugate Chemistry*, *32*(3), 448–465. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.1C00014/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BC1C00014_0010.GIF

Kumar, A., & Jacob, A. (2022). Techniques in scaffold fabrication process for tissue engineering applications: A review. In *Journal of Applied Biology and Biotechnology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 163–176). Open Science Publishers LLP Inc. https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100321

Kumaran, S. K., Chopra, M., Oh, E., & Choi, H. J. (2020). Biopolymers and natural polymers. *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, 245–256. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00011-X

Kuo, C. K., Huang, H. W., Chen, L. G., & Chou, Y. J. (2021). Fabrication and characterization of freeze dried strontium-doped bioactive glasses/chitosan composite scaffolds for biomedical engineering. *Journal of Asian Ceramic Societies*. https://doi.org/10.1080/21870764.2021.1946269

Landberg, G., Fitzpatrick, P., Isakson, P., Jonasson, E., Karlsson, J., Larsson, E., Svanström, A., Rafnsdottir, S., Persson, E., Gustafsson, A., Andersson, D., Rosendahl, J., Petronis, S., Ranji, P., Gregersson, P., Magnusson, Y., Håkansson, J., & Ståhlberg, A. (2020). Patient-derived scaffolds uncover breast cancer promoting properties of the microenvironment. *Biomaterials*, *235*. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119705

Lee, J. H., Baik, J. M., Yu, Y. S., Kim, J. H., Ahn, C. B., Son, K. H., Kim, J. H., Choi, E. S., & Lee, J. W. (2020). Development of a heat labile antibiotic eluting 3D printed scaffold for the treatment of osteomyelitis. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64573-5

Libanje, F., Raingeaud, J., Luan, R., Thomas, Z., Zajac, O., Veiga, J., Marisa, L., Adam, J., Boige, V., Malka, D., Goéré, D., Hall, A., Soazec, J., Prall, F., Gelli, M., Dartigues, P., & Jaulin, F. (2019). ROCK 2 inhibition triggers the collective invasion of colorectal adenocarcinomas . *The EMBO Journal*, *38*(14). https://doi.org/10.15252/EMBJ.201899299,

Mehanny, S., Abu-El Magd, E. E., Ibrahim, M., Farag, M., Gil-San-Millan, R., Navarro, J., El Habbak, A. E. H., & El-Kashif, E. (2021). Extraction and characterization of nanocellulose from three types of palm residues. *Journal of Materials Research and Technology*, *10*, 526–537. https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2020.12.027

Melikoğlu, A. Y., Bilek, S. E., & Cesur, S. (2019). Optimum alkaline treatment parameters for the extraction of cellulose and production of cellulose nanocrystals from apple pomace. *Carbohydrate Polymers*, *215*, 330–337. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.03.103

Mishra, S., Prabhakar, B., Kharkar, P. S., & Pethe, A. M. (2023). Banana Peel Waste: An Emerging Cellulosic Material to Extract Nanocrystalline Cellulose. *ACS Omega*, *8*(1), 1140–1145. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C06571/ASSET/IMAGES/LARGE/AO2C06571_0006.JPEG

Mohd Jamil, N. A., Jaffar, S. S., Saallah, S., Misson, M., Siddiquee, S., Roslan, J., & Lenggoro, W. (2022). Isolation of Cellulose Nanocrystals from Banana Peel Using One-Pot Microwave and Mild Oxidative Hydrolysis System. *Nanomaterials*, *12*(19), 3537. https://doi.org/10.3390/NANO12193537/S1

Moldero, I. L., Chandra, A., Cavo, M., Mota, C., Kapsokalyvas, D., Gigli, G., Moroni, L., & del Mercato, L. L. (2020). Probing the pH Microenvironment of Mesenchymal Stromal Cell Cultures on Additive-Manufactured Scaffolds. *Small*, *16*(34), 2002258. https://doi.org/10.1002/SMLL.202002258;JOURNAL:JOURNAL:16136829;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION

Molla, M. S., Katti, D. R., Iswara, J., Venkatesan, R., Paulmurugan, R., & Katti, K. S. (2020). Prostate Cancer Phenotype Influences Bone Mineralization at Metastasis: A Study Using an In Vitro Prostate Cancer Metastasis Testbed. *JBMR Plus*, *4*(2). https://doi.org/10.1002/JBM4.10256/7499079

Mtibe, A., Motloung, M. P., Bandyopadhyay, J., & Ray, S. S. (2021). Synthetic Biopolymers and Their Composites: Advantages and Limitations—An Overview. *Macromolecular Rapid Communications*, *42*(15), 2100130. https://doi.org/10.1002/MARC.202100130

Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., & Chen, P. (2017). Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, *35*(5), 530–544. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.05.006

Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2019). Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* , *8*(1), 74. https://doi.org/10.3390/CELLS8010074

National Cancer Institute. (2024, June). *Tratamiento del cáncer de próstata*. https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/paciente/tratamiento-prostata-pdq

Nazarkina, Z. K., Stepanova, A. O., Savostyanova, T. A., & Laktionov, P. P. (2025). Application of a modified lactate dehydrogenase assay to evaluate the viability of cells cultured on 3D scaffolds when commonly used assays fail. *Cytotechnology*, *77*(1), 1–9. https://doi.org/10.1007/S10616-024-00670-X/METRICS

Nicolas, J., Magli, S., Rabbachin, L., Sampaolesi, S., Nicotra, F., & Russo, L. (2020). 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. *Biomacromolecules*, *21*(6), 1968–1994. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.0C00045/ASSET/IMAGES/LARGE/BM0C00045_0012.JPEG

Noremylia, M. B., Hassan, M. Z., & Ismail, Z. (2022). Recent advancement in isolation, processing, characterization and applications of emerging nanocellulose: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *206*, 954–976. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.03.064

Nuñez, C. (2024). *Extracción de nanocelulosa vegetal a partir de residuos de banano (Musa paradisiaca) y su aplicación en andamios biológicos [Tesis de grado, Universidad Tecnica de Ambato]*. https://repositorio.uta.edu.ec/items/c214f4ad-f670-4caf-a6b4-3d32fa4b3bc6

Olgasi, C., Assanelli, S., Cucci, A., & Follenzi, A. (2024). Hemostasis and endothelial functionality: the double face of coagulation factors. *Haematologica*, *109*(7), 2041. https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2022.282272

Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T., & Patnaik, A. (2018). Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discovery*, *8*(11), 1358–1365. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0044/333671/P/MOUSE-MODELS-FOR-CANCER-IMMUNOTHERAPY

Padhi, S., Singh, A., & Routray, W. (2023). Nanocellulose from agro-waste: a comprehensive review of extraction methods and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* , *22*(1), 1–27. https://doi.org/10.1007/S11157-023-09643-6

Paradiso, F., Serpelloni, S., Francis, L. W., & Taraballi, F. (2021). Mechanical Studies of the Third Dimension in Cancer: From 2D to 3D Model. *International Journal of Molecular Sciences* , *22*(18), 10098. https://doi.org/10.3390/IJMS221810098

Phanthong, P., Reubroycharoen, P., Hao, X., Xu, G., Abudula, A., & Guan, G. (2018). Nanocellulose: Extraction and application. *Carbon Resources Conversion*, *1*(1), 32–43. https://doi.org/10.1016/J.CRCON.2018.05.004

Pipattanawarothai, A., Suksai, C., Srisook, K., & Trakulsujaritchok, T. (2017). Non-cytotoxic hybrid bioscaffolds of chitosan-silica: Sol-gel synthesis, characterization and proposed application. *Carbohydrate Polymers*, *178*, 190–199. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.09.047

Rajasekharan, R., Paul, S. A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Awasthi, M. K., & Pandey, A. (2023). Green strategies for extraction of nanocellulose from agricultural wastes—Current trends and future perspectives. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 269–288. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95156-2.00006-4

Ramírez, V., & Piñaloza, L. (2023). *Caracterización in vitro de andamios biológicos elaborados a partir de biopolímeros naturales para aplicaciones en ingeniería de tejidos. [Tesis de grado, Universidad Tecnica de Ambato]*. *DSpace UTA*. https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/39361

Randhawa, A., Dutta, S. D., Ganguly, K., Patil, T. V., Patel, D. K., & Lim, K. T. (2022). A Review of Properties of Nanocellulose, Its Synthesis, and Potential in Biomedical Applications. *Applied Sciences* , *12*(14), 7090. https://doi.org/10.3390/APP12147090

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021a). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers* , *13*(7), 1105. https://doi.org/10.3390/POLYM13071105

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021b). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers* , *13*(7), 1105. https://doi.org/10.3390/POLYM13071105

Revati, R., Majid, M. S. A., Ridzuan, M. J. M., Mamat, N., Cheng, E. M., & Alshahrani, H. A. (2022). In vitro biodegradation, cytotoxicity, and biocompatibility of polylactic acid/napier cellulose nanofiber scaffold composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, *223*, 479–489. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.11.041

Risbridger, G. P., Toivanen, R., & Taylor, R. A. (2018). Preclinical Models of Prostate Cancer: Patient-Derived Xenografts, Organoids, and Other Explant Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(8), a030536. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030536

Romruen, O., Karbowiak, T., Tongdeesoontorn, W., Shiekh, K. A., & Rawdkuen, S. (2022). Extraction and Characterization of Cellulose from Agricultural By-Products of Chiang Rai Province, Thailand. *Polymers* , *14*(9), 1830. https://doi.org/10.3390/POLYM14091830

Rosendahl, J., Svanström, A., Berglin, M., Petronis, S., Bogestål, Y., Stenlund, P., Standoft, S., Ståhlberg, A., Landberg, G., Chinga-Carrasco, G., & Håkansson, J. (2021). 3D printed nanocellulose scaffolds as a cancer cell culture model system. *Bioengineering*, *8*(7). https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING8070097,

Sæbø, I. P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E., & Booth, J. A. (2023). Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2914. https://doi.org/10.3390/IJMS24032914/S1

Safarulla, S., Khillar, P. S., Kini, S., & Jaiswal, A. K. (2021). Tissue engineered scaffolds as 3D models for prostate cancer metastasis to bone. *Materials Today Communications*, *28*, 102641. https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2021.102641

Samrot, A. V., Sathiyasree, M., Rahim, S. B. A., Renitta, R. E., Kasipandian, K., Krithika Shree, S., Rajalakshmi, D., Shobana, N., Dhiva, S., Abirami, S., Visvanathan, S., Mohanty, B. K., Sabesan, G. S., & Chinni, S. V. (2023). Scaffold Using Chitosan, Agarose, Cellulose, Dextran and Protein for Tissue Engineering—A Review. *Polymers* , *15*(6), 1525. https://doi.org/10.3390/POLYM15061525

Samsalee, N., Meerasri, J., & Sothornvit, R. (2023). Rice husk nanocellulose: Extraction by high-pressure homogenization, chemical treatments and characterization. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *6*, 100353. https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2023.100353

Sanaguano, S. (2021). *Obtención de nanocelulosa a partir de la hoja de mazorca de maíz (Zea mays L.) mediante el proceso de hidrólisis ácida. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. *DSpace ESPOCH.* . http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/14991

Santiago, B., Moreira, M. T., Feijoo, G., & González-García, S. (2022). Environmental comparison of banana waste valorisation strategies under a biorefinery approach. *Waste Management*, *142*, 77–87. https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2022.02.005

Santillán-Mercado, J. A., Rodríguez-Avilés, Y. G., Bello, S. A., González-Feliciano, J. A., & Nicolau, E. (2017). Electrospun Cellulose and Nanocellulose Composites as a Biomaterial. *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*, 57–107. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70049-6_3

Shefa, A. A., Taz, M., Lee, S. Y., & Lee, B. T. (2019). Enhancement of hemostatic property of plant derived oxidized nanocellulose-silk fibroin based scaffolds by thrombin loading. *Carbohydrate Polymers*, *208*, 168–179. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.12.056

Sola, A., Bertacchini, J., D'Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmiroli, S., & Messori, M. (2019). Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. *Materials Science and Engineering: C*, *96*, 153–165. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.10.086

Song, W. H., Lim, Y. S., Kim, J. E., Kang, H. Y., Lee, C., Rajbongshi, L., Hwang, S. Y., Oh, S. O., Kim, B. S., Lee, D., Song, Y. J., & Yoon, S. (2024). A Marine Collagen-Based 3D Scaffold for In Vitro Modeling of Human Prostate Cancer Niche and Anti-Cancer Therapeutic Discovery. *Marine Drugs* , *22*(7), 295. https://doi.org/10.3390/MD22070295

Souness, A., Zamboni, F., Walker, G. M., & Collins, M. N. (2018). Influence of scaffold design on 3D printed cell constructs. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *106*(2), 533–545. https://doi.org/10.1002/JBM.B.33863

Souza, A. G., Silva, I. B. B., Campos-Fernandez, E., Barcelos, L. S., Souza, J. B., Marangoni, K., Goulart, L. R., & Alonso-Goulart, V. (2018). Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(15), 1689–1694. https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304

Sztankovics, D., Moldvai, D., Petővári, G., Gelencsér, R., Krencz, I., Raffay, R., Dankó, T., & Sebestyén, A. (2023). 3D bioprinting and the revolution in experimental cancer model systems—A review of developing new models and experiences with in vitro 3D bioprinted breast cancer tissue-mimetic structures. *Pathology and Oncology Research*, *29*. https://doi.org/10.3389/pore.2023.1610996

Tang, W., Wang, J., Hou, H., Li, Y., Wang, J., Fu, J., Lu, L., Gao, D., Liu, Z., Zhao, F., Gao, X., Ling, P., Wang, F., Sun, F., & Tan, H. (2023). Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, *240*, 124398. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124398

Tavelli, L., McGuire, M. K., Zucchelli, G., Rasperini, G., Feinberg, S. E., Wang, H. L., & Giannobile, W. V. (2020). Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-

implant soft tissue regeneration. *Journal of Periodontology*, *91*(1), 17–25. https://doi.org/10.1002/JPER.19-0351

Ul-Islam, M., Subhan, F., Islam, S. U., Khan, S., Shah, N., Manan, S., Ullah, M. W., & Yang, G. (2019). Development of three-dimensional bacterial cellulose/chitosan scaffolds: Analysis of cell-scaffold interaction for potential application in the diagnosis of ovarian cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, *137*, 1050–1059. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.050

Ullah, M. W., Subhan, F., Manan, S., Ul-Islam, M., Alabbosh, K. F., Kamal, T., Khan, K. A., Liu, J., Yang, G., & Sun, J. (2023). Impact of structural features of acetylated bacterial cellulose on cell-scaffold and scaffold-blood interactions in vitro. *Cellulose* , *30*(16), 10373–10399. https://doi.org/10.1007/S10570-023-05518-9

Wake, N., Rosenkrantz, A. B., Huang, R., Park, K. U., Wysock, J. S., Taneja, S. S., Huang, W. C., Sodickson, D. K., & Chandarana, H. (2019). Patient-specific 3D printed and augmented reality kidney and prostate cancer models: impact on patient education. *3D Printing in Medicine*, *5*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/S41205-019-0041-3/FIGURES/2

Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, *32*(17–18), 1105–1140. https://doi.org/10.1101/GAD.315739.118

Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences* , *21*(2), 487. https://doi.org/10.3390/IJMS21020487

Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. P., & Avci-Adali, M. (2018). Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*, 395774. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2018.00099/XML/NLM

Wei, Z., Wu, C., Li, R., Yu, D., & Ding, Q. (2021). Nanocellulose based hydrogel or aerogel scaffolds for tissue engineering. *Cellulose* , *28*(12), 7497–7520. https://doi.org/10.1007/S10570-021-04021-3

Xu, K., Ganapathy, K., Andl, T., Wang, Z., Copland, J. A., Chakrabarti, R., & Florczyk, S. J. (2019). 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines. *Biomaterials*, *217*, 119311. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119311

Xu, K., Wang, Z., Copland, J. A., Chakrabarti, R., & Florczyk, S. J. (2020a). 3D porous chitosan-chondroitin sulfate scaffolds promote epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Biomaterials*, *254*, 120126. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120126

Xu, K., Wang, Z., Copland, J. A., Chakrabarti, R., & Florczyk, S. J. (2020b). 3D porous chitosan-chondroitin sulfate scaffolds promote epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Biomaterials*, *254*, 120126. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120126

Xu, P., Wasielewski, L. J., Yang, J. C., Cai, D., Evans, C. P., Murphy, W. J., & Liu, C. (2022). The Immunotherapy and Immunosuppressive Signaling in Therapy-Resistant Prostate Cancer. *Biomedicines 2022, Vol. 10, Page 1778*, *10*(8), 1778. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10081778

Yahya, E. B., Amirul, A. A., Abdul Khalil, H. P. S., Olaiya, N. G., Iqbal, M. O., Jummaat, F., Atty Sofea, A. K., & Adnan, A. S. (2021). Insights into the Role of Biopolymer Aerogel Scaffolds in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Polymers* , *13*(10), 1612. https://doi.org/10.3390/POLYM13101612

Yamakawa, S., & Hayashida, K. (2019). Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns and Trauma*, *7*. https://doi.org/10.1186/S41038-019-0148-1/37962303/BURNS_V7_1_148.PDF

Yin, K., Divakar, P., & Wegst, U. G. K. (2019a). Plant-Derived Nanocellulose as Structural and Mechanical Reinforcement of Freeze-Cast Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, *20*(10), 3733–3745. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.9B00784/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BM9B00784_0011.GIF

Yin, K., Divakar, P., & Wegst, U. G. K. (2019b). Plant-Derived Nanocellulose as Structural and Mechanical Reinforcement of Freeze-Cast Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, *20*(10), 3733–3745. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.9B00784/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BM9B00784_0011.GIF

Zhang, F., Zheng, L., Cheng, S., Peng, Y., Fu, L., Zhang, X., & Linhardt, R. J. (2019). Comparison of the Interactions of Different Growth Factors and Glycosaminoglycans. *Molecules 2019*, *24*(18), 3360. https://doi.org/10.3390/MOLECULES24183360

Zulkifli, M. Z. A., Nordin, D., Shaari, N., & Kamarudin, S. K. (2023). Overview of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Polymers* , *15*(11), 2418. https://doi.org/10.3390/POLYM15112418

ANEXOS

Anexo A. Pretratamiento del material vegetal.

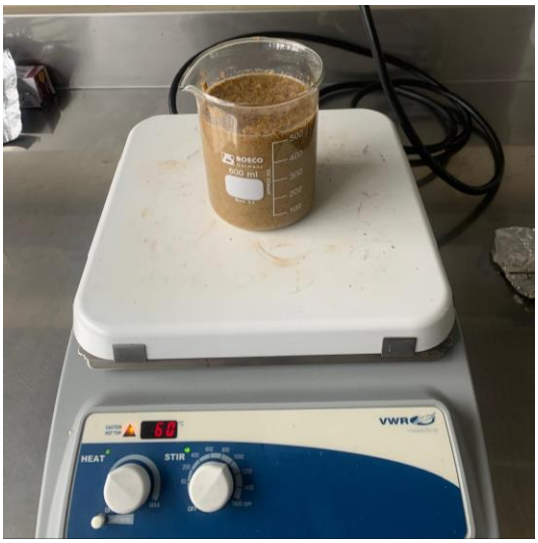


Figura . *Pretratamiento de la cascara de banano.*

Anexo B. Hidrolisis del material vegetal

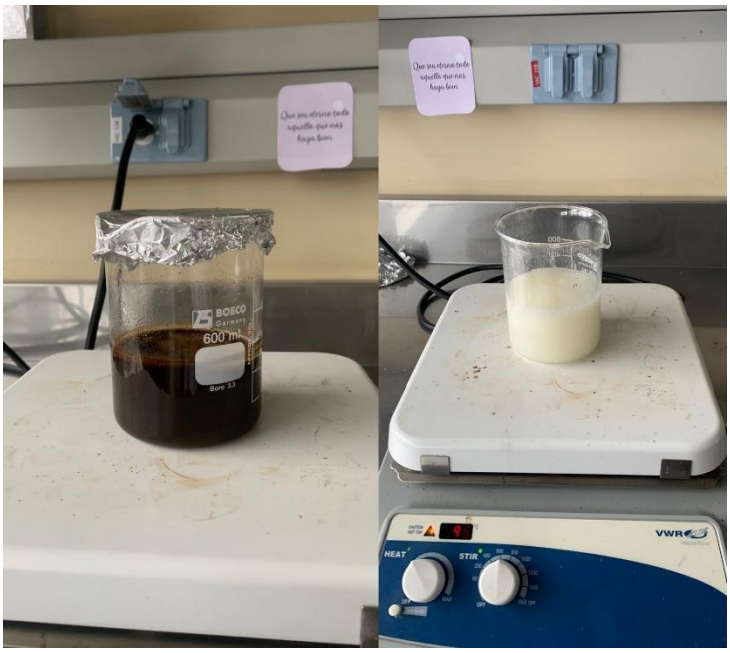


Figura . Hidrolisis alcalina y blanqueamiento de la muestra vegetal

A) Hidrolisis acida B) Blanqueamiento

Anexo C. Extracción de nanocelulosa

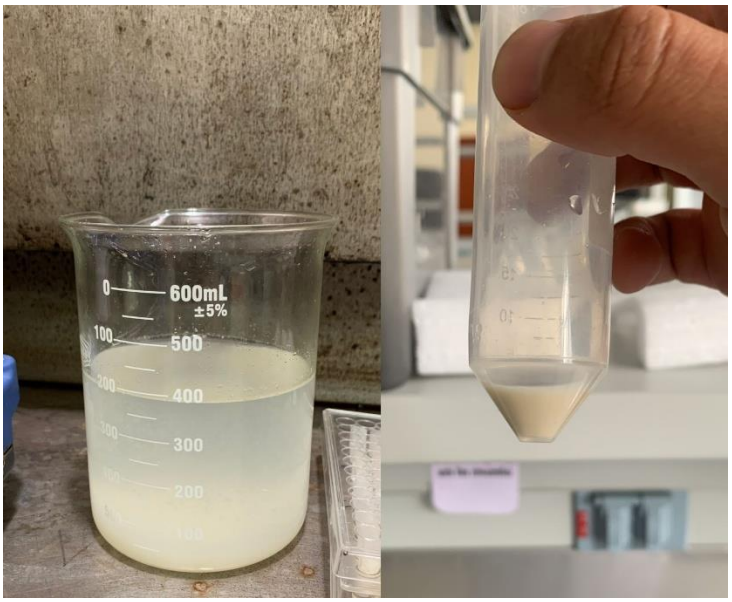


Figura . Hidrolisis acida del material vegetal

A) Extracción de nanocelulosa B) obtención del hidrogel de nanocelulosa

Anexo D. Elaboración de andamios biológicos



Figura . Elaboración de los andamios biológicos de nanocelulosa y quitosano

A) Solución polimérica de nanocelulosa/quitosano B) Liofilización de las placas de 96 micropocillos

Anexo E. Coagulación de sangre en andamios biológicos.



Figura . Prueba de coagulación de sangre en ABs de nanocelulosa/quitosano

Anexo F. Hemolisis in vitro en andamios bioligicos



Figura . Evaluación de hemolisis en andamios de nanocelulosa/quitosano

Anexo G. Adhesión de glóbulos rojos



Figura . Evaluación de adhesión de eritrocitos en andamios de nanocelulosa/quitosano

Anexo H. Adhesión plaquetaria



Figura . Evaluación de adhesión de plaquetas en andamios de nanocelulosa/quitosano

Anexo I. Tablas con datos obtenidos para las pruebas morfológicas y biológicas.

Tabla 1. *Pesos iniciales para la determinación del % de hinchamiento de los ABs*

Concentración de polímeros (%)	1 : 1	1.5 : 1.5	1 : 1.5	1,5 : 1
		PBS		
Réplica 1	0.004	0.0048	0.0044	0.0049
Réplica 2	0.005	0.0049	0.0046	0.0045
Réplica 3	0.004	0.0052	0.0045	0.004
		Agua destilada		
Réplica 1	0.0043	0.0048	0.0048	0.0043
Réplica 2	0.0051	0.0045	0.0041	0.0056
Réplica 3	0.0041	0.0052	0.0045	0.0048

Tabla 2. *Pesos obtenidos para la determinación del % de hinchamiento en PBS de los ABs*

Concentración de polímeros (%)	1 : 1	1.5 : 1.5	1 : 1.5	1.5 : 1
		5 seg		
Réplica 1	0.0901	0.112	0.0863	0.0845
Réplica 2	0.0912	0.1213	0.1014	0.0933
Réplica 3	0.0992	0.1164	0.1026	0.091
		15 seg		
Réplica 1	0.0932	0.1295	0.0866	0.0852
Réplica 2	0.0926	0.1326	0.1099	0.0939
Réplica 3	0.1013	0.1191	0.1059	0.0919
		30 seg		
Réplica 1	0.0442	0.13	0.0955	0.0761
Réplica 2	0.0433	0.1288	0.115	0.0845
Réplica 3	0.0498	0.1194	0.1123	0.0727
		1 min		
Réplica 1	0.0382	0.1288	0.0908	0.0498

Réplica 2	0.0381	0.129	0.1071	0.0533
Réplica 3	0.0477	0.1184	0.1063	0.0541
		5 min		
Réplica 1	0.0414	0.1221	0.0903	0.0479
Réplica 2	0.0353	0.1189	0.1032	0.0396
Réplica 3	0.0452	0.1174	0.1081	0.0432
		15 min		
Réplica 1	0.0381	0.1099	0.0877	0.0471
Réplica 2	0.0353	0.1153	0.1041	0.0354
Réplica 3	0.0452	0.1151	0.1061	0.0425
		30 min		
Réplica 1	0.0342	0.0962	0.0868	0.0369
Réplica 2	0.0258	0.1151	0.1013	0.0295
Réplica 3	0.0222	0.1144	0.1032	0.0319
		60 min		
Réplica 1	0.0281	0.0955	0.0869	0.0286
Réplica 2	0.0171	0.115	0.1014	0.0239
Réplica 3	0.0173	0.1123	0.1034	0.0203

Tabla 3. *Pesos obtenidos para la determinación del % de hinchamiento en agua destilada de los ABs*

Concentración de polímeros (%)	**1 : 1**	**1.5 : 1.5**	**1 : 1.5**	**1.5 : 1**
		5 seg		
Réplica 1	0.1134	0.1468	0.1253	0.1201
Réplica 2	0.1189	0.1401	0.1287	0.1245
Réplica 3	0.1102	0.1416	0.1156	0.1241
		15 seg		
Réplica 1	0.1143	0.1469	0.1255	0.1211

Réplica 2	0.1194	0.1439	0.1286	0.1252
Réplica 3	0.1116	0.1417	0.1166	0.1249
		30 seg		
Réplica 1	0.0614	0.1528	0.1283	0.0703
Réplica 2	0.0689	0.1515	0.1297	0.0743
Réplica 3	0.0607	0.1427	0.1221	0.0737
		1 min		
Réplica 1	0.0539	0.1518	0.1316	0.0695
Réplica 2	0.0578	0.1499	0.1353	0.0733
Réplica 3	0.0598	0.148	0.1233	0.0731
		5 min		
Réplica 1	0.0413	0.1514	0.1318	0.0593
Réplica 2	0.0467	0.149	0.1361	0.0525
Réplica 3	0.0410	0.1485	0.1256	0.0523
		15 min		
Réplica 1	0.0321	0.1519	0.1315	0.0419
Réplica 2	0.0353	0.1489	0.1353	0.0417
Réplica 3	0.0369	0.149	0.1271	0.0425
		30 min		
Réplica 1	0.0301	0.1509	0.1302	0.0371
Réplica 2	0.0342	0.147	0.1323	0.0301
Réplica 3	0.0349	0.148	0.1266	0.0321
		60 min		
Réplica 1	0.0291	0.1501	0.1291	0.0362
Réplica 2	0.0224	0.1473	0.1301	0.0383
Réplica 3	0.0229	0.1477	0.1251	0.0392

Tabla 4. *Porcentajes de hinchamiento en PBS obtenidos para los ABs.*

Concentración de polímeros (%)	1 : 1	1.5 : 1.5	1 : 1.5	1.5 : 1
		5 seg		
Réplica 1	2152.5	2233.33333	1861.36364	1624.4898
Réplica 2	1724	2375.5102	2104.34783	1973.33333
Réplica 3	2380	2138.46154	2180	2175
		15 seg		
Réplica 1	2230	2597.91667	1868.18182	1638.77551
Réplica 2	1752	2606.12245	2289.13043	1986.66667
Réplica 3	2432.5	2190.38462	2253.33333	2197.5
		30 seg		
Réplica 1	1005	2608.33333	1984.09091	1453.06122
Réplica 2	766	2732.65306	2347.82609	1777.77778
Réplica 3	1145	2196.15385	2288.88889	1717.5
		1 min		
Réplica 1	855	2583.33333	1963.63636	916.326531
Réplica 2	662	2532.65306	2228.26087	1084.44444
Réplica 3	1092.5	2176.92308	2262.22222	1252.5
		5 min		
Réplica 1	935	2443.75	1952.27273	877.55102
Réplica 2	606	2326.53061	2143.47826	780
Réplica 3	1030	2157.69231	2302.22222	980
		15 min		
Réplica 1	852.5	2189.58333	1893.18182	861.22449
Réplica 2	502	2253.06122	2163.04348	686.666667
Réplica 3	752.5	2113.46154	2257.77778	962.5
		30 min		
Réplica 1	755	1904.16667	1872.72727	653.061224
Réplica 2	416	2248.97959	2102.17391	555.555556

Réplica 3	455	2100	2193.33333	697.5
		60 min		
Réplica 1	602.5	1889.58333	1875	483.673469
Réplica 2	242	2246.93878	2104.34783	431.111111
Réplica 3	332.5	2059.61538	2197.77778	407.5

Tabla 5. *Porcentajes de hinchamiento en agua destilada obtenidos para los ABs.*

Concentración de polímeros (%)	**1 : 1**	**1.5 : 1.5**	**1 : 1.5**	**1.5 : 1**
		5 seg		
Réplica 1	2537.2093	2958.33333	2510.41667	2693.02326
Réplica 2	2231.37255	3013.33333	3039.02439	2123.21429
Réplica 3	2587.80488	2623.07692	2468.88889	2485.41667
		15 seg		
Réplica 1	1395.34884	2960.41667	2514.58333	2716.27907
Réplica 2	1260.78431	3097.77778	3036.58537	2135.71429
Réplica 3	1402.43902	2625	2491.11111	2502.08333
		30 seg		
Réplica 1	1327.90698	3083.33333	2572.91667	1534.88372
Réplica 2	1250.98039	3266.66667	3063.41463	1226.78571
Réplica 3	1380.4878	2644.23077	2613.33333	1435.41667
		1 min		
Réplica 1	1153.48837	3062.5	2641.66667	1516.27907
Réplica 2	1033.33333	3231.11111	3200	1208.92857
Réplica 3	1358.53659	2746.15385	2640	1422.91667
		5 min		
Réplica 1	860.465116	3054.16667	2645.83333	1279.06977
Réplica 2	815.686275	3211.11111	3219.5122	837.5
Réplica 3	900	2755.76923	2691.11111	989.583333
		15 min		
Réplica 1	646.511628	3064.58333	2639.58333	874.418605
Réplica 2	592.156863	3208.88889	3200	648.214286
Réplica 3	800	2765.38462	2724.44444	785.416667
		30 min		
Réplica 1	600	3043.75	2612.5	762.790698
Réplica 2	570.588235	3166.66667	3126.82927	437.5
Réplica 3	751.219512	2746.15385	2713.33333	568.75
		60 min		
Réplica 1	576.744186	3027.08333	2589.58333	741.860465
Réplica 2	339.215686	3173.33333	3073.17073	583.928571

Réplica 3	458.536585	2740.38462	2680	716.666667

Tabla 6. Promedio de la capacidad de hinchazón en PBS

Tiempo	**1 ; 1**	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
5	2085.5	2249.10169	2048.57049	1924.27438
15	2138.16667	2464.80791	2136.88186	1940.98073
30	972	2512.38008	2206.93529	1649.44633
60	869.833333	2430.96982	2151.37315	1084.42366
300	857	2309.32431	2132.65774	879.183673
900	702.333333	2185.3687	2104.66769	836.797052
1800	542	2084.38209	2056.07817	635.37226
3600	392.333333	2065.37916	2059.04187	440.761527

Tabla 7. Promedio de la capacidad de hinchazón en agua destilada

Tiempo	**1 ; 1**	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
5	2452.12891	2864.91453	2672.77665	2433.88474
15	1352.85739	2894.39815	2680.75994	2451.3589
30	1319.79172	2998.07692	2749.88821	1399.0287
60	1181.7861	3013.25499	2827.22222	1382.7081
300	858.71713	3007.01567	2852.15221	1035.38437
900	679.556164	3012.95228	2854.67593	769.349852
1800	695.121951	2985.5235	2817.5542	589.680233
3600	458.165486	2980.26709	2780.91802	680.818568

Tabla 8. *Peso inicial para la evaluación de degradación de los ABs*

Concentración de polímeros (%)	**1 : 1**	**1.5 : 1.5**	**1 : 1.5**	**1.5 : 1**
		2 día		
Réplica 1	0.0052	0.0056	0.0049	0.004
Réplica 2	0.0043	0.0048	0.0048	0.0045
Réplica 3	0.0036	0.0069	0.0054	0.0048

	4 día			
Réplica 1	0.0059	0.0055	0.0055	0.005
Réplica 2	0.004	0.0058	0.0049	0.0052
Réplica 3	0.0039	0.0054	0.0048	0.0049
	7 día			
Réplica 1	0.0053	0.0071	0.005	0.0051
Réplica 2	0.004	0.0071	0.0048	0.0038
Réplica 3	0.0054	0.0049	0.0043	0.0047

Tabla 9. *Pesos obtenidos en la evaluación de degradación de los ABs*

Concentración de polímeros (%)	**1 : 1**	**1.5 : 1.5**	**1 : 1.5**	**1.5 : 1**
	2 día			
Réplica 1	0.0017	0.004	0.0035	0.0012
Réplica 2	0.0014	0.0035	0.0033	0.0015
Réplica 3	0.0011	0.0052	0.0041	0.0015
	4 día			
Réplica 1	0.0004	0.0032	0.0031	0.0005
Réplica 2	0.0002	0.0034	0.0028	0.0006
Réplica 3	0.0002	0.0031	0.0027	0.0005
	7 día			
Réplica 1	Degradado	0.0031	0.0011	Degradado
Réplica 2	Degradado	0.003	0.0012	Degradado
Réplica 3	Degradado	0.0023	0.0009	Degradado

Tabla 10. *Porcentaje del peso residual de los ABs.*

Concentración de polímeros (%)	**1 : 1**	**1.5 : 1.5**	**1 : 1.5**	**1.5 : 1**
	2 día			
Réplica 1	32.69231	71.42857	71.42857	30

Réplica 2	32.55814	72.91667	68.75	33.33333
Réplica 3	30.55556	75.36232	75.92593	31.25
		4 día		
Réplica 1	6.779661	58.18182	56.36364	10
Réplica 2	5	58.62069	57.14286	11.53846
Réplica 3	5.128205	57.40741	56.25	10.20408
		7 día		
Réplica 1	Degradado	43.66197	22	Degradado
Réplica 2	Degradado	42.25352	25	Degradado
Réplica 3	Degradado	46.93878	20.93023	Degradado

Tabla 10. *Porcentaje de biodegradabilidad de los ABs*

Concentración de polímeros (%)	***Porcentaje de biodegradabilidad***			
1 ; 1	100%	31%	6%	0%
1.5 ; 1.5	100%	73.23%	58.06%	44%
1 ; 1.5	100%	72.03%	56.50%	23%
1.5 ; 1.	100%	31.52%	10%	0%

Tabla 11. Absorbancia de la prueba de coagulación en ABs

	Concentración de polímeros (%)			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	0.1788	0.1895	0.1885	0.1857
Replica 2	0.1781	0.1891	0.1883	0.1876
Replica 3	0.1752	0.189	0.1883	0.1871

Tabla 12. Absorbancia de celdas vacías para la prueba de coagulación en ABs

Abs Celda Vacia (Io)			
Concentración de polímeros (%)			
1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**

Replica 1	0.0312	0.0313	0.0312	0.0313
Replica 2	0.0312	0.0312	0.0312	0.0313
Replica 3	0.0321	0.0312	0.0312	0.0312

Tabla 13. Porcentaje del índice de coagulación en ABs

	Porcentaje de Coagulacion			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	42.8945074	45.9883721	45.7134554	44.8837209
Replica 2	42.6910782	45.8878233	45.6553328	45.4360465
Replica 3	41.6958042	45.858762	45.6553328	45.3065969
Promedio	42.4271299	45.9116525	45.674707	45.2087881

Tabla 14. *Efectos de los factores A y B (nanocelulosa y quitosano) sobre la coagulación.*

Fuente	**Efecto**
A	1.506
B	1.97
AB	-1.27

Tabla 15. *ANOVA del diseño factorial 2^2 para la coagulación de sangre*

Fuente	**SS**	**GL**	**MS**	**Fcal**	**Fcri**	**p-value**
A	6.81	1	6.81	82	5.32	1.7×10^{-6}
B	11.68	1	11.68	141	5.32	2.2×10^{-7}
AB	4.86	1	4.86	58	5.32	5.3×10^{-6}
Error	0.66	8	0.0085			
Total	48.02	11				

Tabla 16. Absorbancias de la prueba de hemolisis en ABs

	Concentración de polímeros (%)			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	0.0774	0.0654	0.0625	0.0812

Replica 2	0.08	0.0667	0.0646	0.0786
Replica 3	0.0762	0.0633	0.0643	0.0799

Tabla 17. Porcentaje del índice de hemolisis de la prueba de hemolisis en ABs

	Concentración de polímeros (%)			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	5.42372881	1.7257319	0.83204931	6.59476117
Replica 2	6.22496148	2.12634823	1.47919877	5.79352851
Replica 3	5.05392912	1.07858243	1.38674884	6.19414484
Promedio	5.5675398	1.64355419	1.23266564	6.19414484

Tabla 18. *Efectos de los factores A y B (nanocelulosa y quitosano) sobre la hemolisis*

Fuente	**Efecto**
A	0.473
B	-4.445
AB	-0.108

Tabla 19. *ANOVA del diseño factorial 2^2 para la hemolisis*

Fuente	**SS**	**GL**	**MS**	**Fcal**	**Fcri**	**p-value**
A	0.806	1	0.806	2.05	5.32	0.187
B	57.94	1	57.94	147	5.32	0.000000
AB	0.036	1	0.036	0.091	5.32	0.77
Error	3.1502	8	0.393			
Total	61.93	11				

Tabla 20. Absorbancias de la prueba de adhesión de glóbulos rojos en ABs

	Concentración de polímeros (%)			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	0.1828	0.1303	0.1201	0.1822

Replica 2	0.1827	0.1309	0.121	0.1807
Replica 3	0.1892	0.1301	0.1208	0.1813

Tabla 21. Cantidad de adhesión de glóbulos rojos en ABs

	Concentración de polímeros (%)			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	5374.32	3830.82	3530.94	5356.68
Replica 2	5371.38	3848.46	3557.4	5312.58
Replica 3	5562.48	3824.94	3551.52	5330.22
Promedio	5436.06	3834.74	3546.62	5333.16

Tabla 22. *Efectos de los factores A y B (nanocelulosa y quitosano) sobre la adhesión de glóbulos rojos*

Fuente	**Efecto**
A	92.5
B	-1694
AB	195.5

Tabla 23. *ANOVA del diseño factorial 2^2 para la adhesión de glóbulos rojos*

Fuente	**SS**	**GL**	**MS**	**Fcal**	**Fcri**	**p-value**
A	25668	1	25668	8	5.32	0.0259
B	8610602	1	8610602	2687	5.32	0.000000
AB	114660	1	114660	35	5.32	0.000029
Error	25639	8	3204			
Total		11				

Tabla 24. Absorbancias normalizadas de la prueba de adhesión de plaquetas en ABs

Concentración de polímeros (%)			
1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**

Replica 1	0.008291	0.0089173	0.008895	0.0087715
Replica 2	0.008287	0.0089468	0.0088828	0.008781
Replica 3	0.0082883	0.0089678	0.0088773	0.008779

Tabla 25. Porcentaje de adhesión plaquetaria en ABs

	Concentración de polímeros (%)			
	1 ; 1	**1.5 ; 1.5**	**1 ; 1.5**	**1.5 ; 1**
Replica 1	31.08910891	72.4290429	70.95709571	62.80528053
Replica 2	30.82508251	74.37623762	70.15181518	63.43234323
Replica 3	30.91089109	75.76237624	69.78877888	63.30033003
Promedio	30.94169417	74.18921892	70.29922992	63.17931793

Tabla 26. *Efectos de los factores A y B (nanocelulosa y quitosano) sobre la adhesión de glóbulos rojos*

Fuente	**Efecto**
A	18.06
B	25.18
AB	-14.17

Tabla 27. *ANOVA del diseño factorial 2^2 para la adhesión de glóbulos rojos*

Fuente	**SS**	**GL**	**MS**	**Fcal**	**Fcri**	**p-value**
A	979.03	1	979.03	1398	5.32	0.000000
B	1902.34	1	1902.34	2717	5.32	0.000000
AB	602.79	1	602.79	861	5.32	0.000000
Error	5.62	8	0.70			
Total		11				

ANEXO J. Carta de aprobación de protocolo de investigación del comité de ética COD. 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