



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



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

CARERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Elaboración de andamios biológicos a partir de biopolímeros naturales mediante métodos manuales y bioimpresión 3D para aplicaciones en ingeniería de tejidos

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Sandro Daniel Guáitara Martínez

Tutora: Ph.D. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD.. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

CERTIFICA

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulos y Grados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 30 de Agosto del 2021

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C.I. 1804256905

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Sandro Daniel Guátara Martínez, manifiesto que los resultados obtenidos en el Informe Final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Sandro Daniel Guátara Martínez

C.I. 1805379946

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

Presidente del tribunal

PhD. Mirari Yosune Arancibia Soria
CI: 180214246-1

PhD. William Ricardo Calero Cáceres
CI: 171434885-9

Ambato, 2 de Septiembre del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular 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 de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Informe 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.

A handwritten signature in blue ink, reading "Sandro Daniel Guátara Martínez". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

Sandro Daniel Guátara Martínez

C.I. 1805379946

AUTOR

DEDICATORIA

A todos los que pasamos noches en vela

A los que nos acompañaron en el camino

A los que tuvimos miedo de una calificación y a los que aún lo tiene

A los que nos quedamos dormidos en clases o un examen

Y al niño que un día fuimos

AGRADECIMIENTO

A la PhD. Lorena Núñez por todo el entendimiento, apoyo y conocimiento brindado, no pude haber tenido mejor tutora.

Al PhD. William Calero por sus consejos y ayuda a lo largo de la elaboración de este proyecto.

A la PhD. Mirari Arancibia y al PhD. Orestes López por su ayuda con los polímeros para la realización de este trabajo.

A mis padres Geovanny Guáitara y Janeth Martínez por su apoyo a lo largo de toda mi vida.

A mi hermano Bryan por su gran aporte con la fabricación de la Bioimpresora.

A Pamela Freire por ser una amistad constante en mi vida que está en las buenas y en las malas.

A mis amigos y compañeros Ana, Duda, Gaby, Mela, Miguel, Jenny y Zulay.

A Vivi y Michu por su amistad y apoyo en la carrera.

A Dimitri, Fabian, Alison, Luis, Estefanía, Gabriela, Wladi, Tati, Pato, Bryan, Diego, Ari y Toni por donarme su sangre para la realización de este trabajo. Aclaro que ninguno resulto herido a excepción de Tony. Lo sentimos Tony.

A Alexis Debut por su apoyo con la microscopia electrónica de barrido.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
GLOSARIO	xvi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Ingeniería de tejidos.....	1
1.1.2. Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos.....	2
1.1.3. Características requeridas en los andamios biológicos.....	4
1.1.4. Generalidades de los biopolímeros.....	6
1.1.5. Colágeno como biomaterial en andamios biológicos.....	7
1.1.6. Quitosano como biomaterial en andamios biológicos.....	11
1.1.7. Otros polímeros de interés.....	13
1.1.8. Elaboración de andamios biológicos.....	13
1.2. Objetivos.....	17
1.2.1. Objetivo General.....	17

1.2.2. Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....	18
2.1. Métodos.....	18
2.1.1. Elaboración de andamios biológicos de manera manual empleando diferentes concentraciones del quitosano y colágeno.	18
2.1.2. Elaboración de andamios biológicos mediante bioimpresión 3D empleando diferentes concentraciones de quitosano y colágeno extraídos.	20
2.1.3. Evaluación de los andamios elaborados de manera manual y con bioimpresión 3D en base a sus características morfológicas y biológicas.....	24
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3.1. Análisis de resultados.....	27
3.1.1. Elaboración de andamios biológicos por método manual.	27
3.1.2. Elaboración de andamios biológicos por bioimpresión 3D.	28
3.1.3. Evaluación de los andamios elaborados en base a sus características morfológicas y biológicas.	30
CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
4.1. Conclusiones	52
4.2. Recomendaciones.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del colágeno..	8
Figura 2. Cadenas α de colágeno tipo I y II.	10
Figura 3. Estructura del quitosano	12
Figura 4. ABs elaborados por liofilización.	15
Figura 5. Proceso de bio-impresión.	16
Figura 6. Esquema general de la preparación de los ABs por liofilización.	19
Figura 7. Esquema general de la preparación de la solución para bioimpresión 3D.	20
Figura 8. Modelamiento 3D de la estructura de la bioimpresora.	21
Figura 9. Estructura armada de los ejes XYZ con el extrusor.	22
Figura 10. Estructura de la bioimpresora sin el sistema de refrigeración.	23
Figura 11. Bioimpresora 3D completa.	23
Figura 12. Proceso de bioimpresión 3D.	24
Figura 13. Proceso de biodegradabilidad y biomineralización de los ABs.	25
Figura 14. ABs elaborados por liofilización.	28
Figura 15. ABs elaborados por Bioimpresión 3D.	30
Figura 16. Superficie de los ABs liofilizados.	32
Figura 17. ABs liofilizado cortado.	34
Figura 18. Superficie de los ABs bioimpresos.	35
Figura 19. Resultados evaluación de porosidad de ABs liofilizados.	36
Figura 20. Resultados evaluación de porosidad de ABs bioimpresos.	37
Figura 21. Resultados evaluación de biodegradabilidad ABs liofilizados.	39
Figura 22. Resultados evaluación de biodegradabilidad ABs liofilizados.	41
Figura 23. Resultados evaluación de capacidad absorción de agua.	42
Figura 24. Resultados evaluación de capacidad absorción de agua.	44
Figura 25. Resultados biomineralización de ABs liofilizados plasma sanguineo.	48
Figura 26. Resultados biomineralización de ABs bioimpresos en 3D plasma sanguineo.	49
Figura 27. Resultados biomineralización de ABs liofilizados sumergidos en etanol.	50

Figura 28. Resultados biomineralización de ABs bioimpresos en 3D sumergidos en etanol.....51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familia de proteínas del colágeno.....	9
Tabla 2. ABs Elaborados por liofilización.	27
Tabla 3. ABs Elaborados por bioimpresión 3D	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Pesos obtenidos para el cálculo de porosidad	71
Anexo 2. Resultados porosidad con replicas	71
Anexo 3. Resultados porosidad promedio	71
Anexo 4. Desviación estándar de la porosidad	71
Anexo 5. Pesos obtenidos para el cálculo de capacidad de absorción de agua	72
Anexo 6. Resultados capacidad de absorción de agua con replicas.	73
Anexo 7. Resultados capacidad de absorción de agua promedio.	74
Anexo 8. Desviación estándar de la porosidad capacidad de absorción de agua	74
Anexo 9. Pesos obtenidos para calcular la biodegradabilidad replica 1.	75
Anexo 10. Pesos obtenidos para calcular la biodegradabilidad replica 2	75
Anexo 11. Pesos obtenidos para calcular la biodegradabilidad replica 3	75
Anexo 12. Resultados biodegradabilidad replicas	76
Anexo 13. Resultados biodegradabilidad promedio	76
Anexo 14. Desviación estándar de la biodegradabilidad	76

RESUMEN

Existen miles de pacientes con lesiones que no pueden ser tratadas adecuadamente, por lo que la ingeniería de tejidos como una gran alternativa. Aunque no se limita solo a esto porque también puede resultar idóneo para el desarrollo de fármacos y el estudio de enfermedades. En la presente investigación se tiene la finalidad de elaborar diferentes andamios con potenciales aplicaciones en la ingeniería de tejidos, utilizando polímeros naturales. Para lo que se empleó liofilización como método manual y bioimpresión 3D. Las soluciones para los andamios se elaboraron disolviendo quitosano y/o colágeno en ácido acético y mezclándoles con una solución de agarosa en PBS; estas soluciones se liofilizaron, y así se obtuvieron andamios secos y porosos. Para la bioimpresora 3D, las soluciones se imprimieron en forma de cuadrados de 4 centímetros cuadrados, con una malla en el interior. Se los evaluó mediante SEM con el fin de medir el tamaño de los poros y analizar su superficie. Mediante el método de infiltración de etanol se tuvo un mejor entendimiento de los poros. Se realizó pruebas de capacidad de absorción de agua. Debido a la importancia de la biodegradabilidad, se la evaluó sumergiendo en plasma sanguíneo por 2, 4 y 7 días. Finalmente, también se evaluó la biomineralización de los andamios de la misma manera que la biodegradabilidad, es decir, incubando en plasma sanguíneo. Con la evaluación de las características se analizó para que tejidos pudieran resultar útiles los andamios, que mayormente fue al tejido óseo y dérmico.

Palabras clave: andamios biológicos, liofilización, bioimpresión 3D, colágeno, quitosano, agarosa, ingeniería de tejidos, biopolímeros.

ABSTRACT

There are thousands of patients with injuries that cannot be adequately treated, making tissue engineering a great alternative. Although it is not limited only to this because it can also be suitable for the development of drugs and the study of diseases. The aim of this research is to elaborate different scaffolds with potential applications in tissue engineering, using natural polymers. For this purpose, freeze-drying as a manual method and 3D bioprinting were used. The solutions for the scaffolds were elaborated by dissolving chitosan and collagen in acetic acid and mixing them with an agarose solution in PBS; these solutions were freeze-dried to obtain dry and porous scaffolds. For the 3D bioprinter, the solutions were printed in the form of 4 cm square squares, with a mesh inside. They were evaluated by SEM in order to measure the pore size and analyze their surface area. Using the ethanol infiltration method, a better understanding of the pores was obtained. Water absorption capacity tests were performed. Due to the importance of biodegradability, it was evaluated by immersion in blood plasma for 2, 4 and 7 days. Finally, the biomineralization of the scaffolds was also evaluated in the same way as biodegradability, i.e., incubating in blood plasma. With the evaluation of the characteristics, it was analyzed for which tissues the scaffolds could be useful, which was mainly bone and dermal tissue.

Keywords: biological scaffolds, freeze-drying, 3D bioprinting, collagen, chitosan, agarose, tissue engineering, biopolymers.

GLOSARIO

AB: Andamio biológico

IT: Ingeniería de tejidos

MSCs: Células madre mesenquimales

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas

PEO: Poli (óxido de etileno)

PEG: Poli (etilenglicol)

PVA: Acetato de polivinilo

PGA: Poli (ácido glicólico)

PLA: Ácido poliláctico

PGLA: Poli (ácido láctico-co-glicólico)

SEM: Microscopia electrónica de barrido

HAp: Hidroxiapatita

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos (IT) fue nombrada por primera vez por el Dr. Fung en 1985, pero no fue definida con claridad hasta 1993 como la siembra de células en andamios de biomateriales sólidos y rígidos prefabricados para la formación de tejidos (**Auger et al., 2013; Gao & Cui, 2016**). Se trata de un campo de estudio que emplea conocimiento de ingeniería de procesos, ciencia de los materiales, biología, química, física y medicina, con el fin de elaborar sustitutos miméticos funcionales de tejidos y órganos (**Leal-Marín et al., 2021**).

Para los pacientes que han sufrido algún tipo de lesión muchas veces los tratamientos convencionales no son suficientes, siendo la IT una gran alternativa. Por ejemplo, personas con quemaduras extensas y profundas requieren de sustitutos de piel que pueden ser generados en laboratorio (**Sundar et al., 2020**). En casos más críticos podría llegar a requerirse no solo la regeneración del tejido sino de un trasplante, por ejemplo, en pacientes con enfermedades renales crónicas (**Burton & Callanan, 2018**). También es frecuente que lesiones requieran órganos o tejidos idóneos de manera inmediata para tratarlas, que en muchos casos no llegan a tiempo (**Dzobo et al., 2018**). En este escenario, la IT brinda la oportunidad de desarrollar dichos órganos o tejidos a nivel de laboratorio, lo que ayudaría a solucionar problemas de trasplantes como bajo número de donantes y la incompatibilidad (**Zambon et al., 2020**).

En los últimos 30 años la IT ha realizado varios avances logrando con éxito la formación de tejidos; a pesar de esto es un campo aún en sus inicios, teniendo varias incógnitas como la selección de fuentes de células, desarrollo de materiales idóneos para tejidos, desarrollo de biorreactores y producción de órganos complejos (**Han et al., 2020**). Para la obtención

de tejidos, la IT aplica diferentes técnicas dependiendo el tipo de tejido que se desea, combinando componentes específicos, generalmente células, factores de crecimiento y andamios biológicos (ABs), sin ser necesario que se combinen los tres (**Inci et al., 2020**).

1.1.2. Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos

1.1.2.1. Células

Existen varias opciones de células que pueden usarse en IT dependiendo de su potencial de diferenciación y fuente de obtención. Según el tipo de tejido que se busque desarrollar podrían utilizarse células madre embrionarias pluripotentes tomadas de tejidos embrionarios, líquido amniótico, placenta o médula ósea (**Lee et al., 2018**). Sin embargo, el uso de células madre totipotentes y pluripotentes de tejidos embrionarios genera problemas éticos, para superar esos inconvenientes la IT ha optado por el uso de células madre adultas como las células madre mesenquimales (MSCs) distribuidas en varios tejidos como MSCs derivadas del tejido adiposo, MSCs derivadas de la piel, MSCs de la papila apical, etc (**Y. Tan et al., 2019**). Otras células madre que se suelen utilizar son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos, una excelente alternativa para obtener células capaces de diferenciarse en cualquier tipo de tejido (**Ortuño-Costela et al., 2019**).

Preferentemente en la IT se utilizan células del propio paciente (fuente autóloga); sin embargo, en pacientes con insuficiencia orgánica o en el caso de órganos como el páncreas, tomar las células del paciente no es una buena opción. En este caso se opta por otras fuentes como de un paciente emparentado (fuente alogénica) o incluso de animales (fuente xenogénica) (**Srivastava et al., 2018**).

1.1.2.2. Factores de crecimiento

Se trata de proteínas solubles con funciones desencadenadas por la unión a receptores específicos en la superficie de las células; estas funciones de forma general son la

regulación del crecimiento, proliferación, diferenciación y migración de las células (**M. Qu et al., 2020**). Los factores de crecimiento se suelen derivar de células como macrófagos o fibroblastos, debido a sus capacidades para regular la angiogénesis, respuestas inmunitarias, curación de heridas, tumorigénesis, apoptosis celular y morfogénesis (**Guan et al., 2020**).

En la IT los factores de crecimiento son importantes para la regeneración de tejidos, siendo inyectados para mejorar los procesos de curación *in vivo* o introducidos en una matriz extracelular para promover la formación de tejidos (**Azevedo & Pashkuleva, 2015**). Según la célula de la que deriven los factores de crecimiento ayudaran a la regeneración de tejidos específicos, por ejemplo, los factores de crecimiento de fibroblastos, similares a insulina o derivados de plaquetas, presentan funciones de morfogénesis ósea resultando útiles para el cultivo de tejido óseo (**Oliveira et al., 2021**).

1.1.2.3. Andamios biológicos

En el desarrollo de tejidos sólidos, para que las células crezcan es necesario una superficie adherente; en tejidos propios del cuerpo humano esa superficie adherente es la matriz extracelular (**Kapalczyńska et al., 2016**). Estas están compuestas por colágenos, proteoglicanos (Ej. heparán sulfato y versicano) y glicoproteínas (Ej. Elastina y fibronectina) (**Winkler et al., 2020**).

En la IT se requiere imitar la matriz extracelular mediante una superficie adherente a la que se denomina ABs (**Kapalczyńska et al., 2016**). Los ABs son estructuras artificiales tridimensionales (3D) diseñadas para receptar células y favorecer el desarrollo de estas para la formación de tejidos, además en caso de ser necesario también se encarga de portar y suministrar los factores de crecimiento (**Malladi et al., 2018**). Los AB son elaborados a partir de materiales naturales como el quitosano o sintéticos como el ácido poli-láctico (PLA); del tipo de biomaterial usado de los cuales dependerá mayormente las características que presente el AB (**Cheng & Hsu, 2018**).

1.1.3. Características requeridas en los andamios biológicos

Los ABs son importantes por desempeñar el rol de imitar la estructura de la matriz extracelular de los tejidos, de tal manera que facilite la adhesión de las células, proliferación, migración, difusión de los nutrientes y productos expresados; en otras palabras deben promover la formación de tejidos (**G. Z. Tan & Zhou, 2020**). Para que el andamio desempeñe su rol correctamente se debe considerar que el biopolímero cumpla con las características adecuadas. Las características deseadas en un AB son la biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioactividad, adherencia, buenas propiedades mecánicas y no tóxico (**Laschke & Menger, 2017; H. Qu et al., 2019**).

Los ABs solo son soportes temporales por lo que deben tener la característica de poder biodegradarse dentro del cuerpo permitiendo que las células produzcan su propia matriz extracelular (**S. Zhang et al., 2019**). Idealmente deben durar hasta acabar la cicatrización o en algún punto avanzado de esta; al degradarse evita el trabajo de retirar el andamio y las consecuencias de mantener el andamio en el cuerpo (**F. Zhang & King, 2020**). La siguiente característica que deben tener es la biocompatibilidad, en el IT hace referencia a que los ABs no deben ocasionar respuestas adversas en el huésped, más bien dar una respuesta acorde a la función específica que debe cumplir (**S. Zhang et al., 2019**). La Bioactividad consiste en que deben interactuar con el organismo, preferentemente de manera beneficiosa (**Koons et al., 2020**). La adherencia de los ABs es fundamental para el funcionamiento de estos, en caso de no tener adherencia las células no podrían fijarse en el AB para posteriormente proliferar (**Augustine et al., 2019; Lin et al., 2019**). Las propiedades mecánicas son otro factor a tener en cuenta, siendo que los ABs deben ser lo suficientemente rígidos y estables para soportar a las células y asemejarse los tejidos (**Reddy et al., 2021**). Dado que se desea favorecer la proliferación celular los ABs no deben estar hechos de materiales tóxicos o que se degraden compuestos tóxicos que pueden generar daños en el tejido (**Haugen et al., 2019**).

En cuanto a su estructura debe presentar una geometría porosa que permita la migración de las células y sus propiedades mecánicas deben poder soportar la carga fisiológica (Schipani et al., 2020).

1.1.3.1. Desafíos actuales de los andamios biológicos

Si bien es cierto en las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en el desarrollo de AB, aún existen desafíos a superar para aprovechar por completo sus aplicaciones (H. Liu et al., 2019). La disponibilidad de biomateriales es uno de los desafíos más relevantes, al necesitar que cuenten con propiedades físicas y biológicas adecuadas según su finalidad. En el caso de tejido óseo se suele emplear metales, dado que se prefieren biomateriales que aporten excelentes propiedades físicas para asemejarse a estos tejidos, pero en contraparte no suelen tener una buena bioactividad aumentando la probabilidad de rechazo; haciendo que el desarrollo de un biopolímero que cuente con ambas propiedades sea un desafío que aún se debe resolver (Alonzo et al., 2021; Carluccio et al., 2020).

La vascularización en los AB presenta un inconveniente con la porosidad de estos, los poros de menor tamaño dificultan la vascularización y la inserción celular, pero facilitan la adhesión celular y la absorción de proteínas; y si bien los poros de mayor tamaño son más adecuados para una correcta vascularización, estos siguen sin proporcionar un camino evidente o espacio para los nuevos vasos sanguíneos (Carotenuto et al., 2022; Kang & Chang, 2018; Rnjak-Kovacina et al., 2019). En caso de lograr una correcta vascularización surge otro problema que es el tiempo, siendo un proceso bastante lento que ocurre de afuera hacia adentro, dificultando el enviar nutriente a través de la sangre y haciendo imprescindible un cultivo *in vitro* extenso antes de trasplantarse (Kang & Chang, 2018).

Para superar estos desafíos en IT es necesaria investigación enfocada al estudio de biopolímeros en cuanto a su estructura, composición y comportamiento en sistemas biológicos.

1.1.4. Generalidades de los biopolímeros

En la IT los biopolímeros son aquellos biomateriales formados por la unión de macromoléculas en estructuras poliméricas, por lo que también se les suele llamar biomateriales poliméricos (**Aaliya et al., 2021**). Debido a que los biopolímeros entran en contacto con sistemas biológicos, sus principales aplicaciones se encuentran en la medicina regenerativa, ingeniería de tejidos, administración de moléculas terapéuticas y envasado de alimentos (**Nagarajan et al., 2019**).

La estructura química de estos biopolímeros facilita clasificarlos en 3 grupos: Polisacáridos (Ej.: quitosano y alginato), proteínas (Ej.: colágeno y celulosa) y poliésteres (Ej.: copoliésteres alifáticos aromáticos) (**Hassan et al., 2019**). Sin embargo, la manera más común de clasificarlos es según su origen, dividiéndolos en 2 grupos: biopolímeros naturales y sintéticos (**Aaliya et al., 2021**).

1.1.4.1. Biopolímeros sintéticos

Esta clase de biopolímero se obtienen a partir de sustancias obtenidas mediante procesos de fermentación, producción biotecnológica y petroquímica (**Aaliya et al., 2021**). Gracias al desarrollo que han tenido este tipo de biomateriales en los últimos años, se ha convertido en una opción económica, debido principalmente a su fabricación, la cual es bastante fácil de llevar a una escala industrial (**Ng et al., 2019**). Esto se debe a que su peso molecular, estructura molecular y características físicas y químicas hacen que su síntesis sea bastante sencilla (**Reddy et al., 2021**). Los principales ejemplos de este tipo de biopolímeros son poliésteres como el poli (óxido de etileno) (PEO), el poli (etilenglicol) (PEG) y el acetato de polivinilo (PVA), aunque ya se han desarrollado otros como los poli(α -hidroxiésteres) entre los que cabe mencionar el poli (ácido glicólico) (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y el poli (ácido láctico-co-glicólico) (PGLA) (**Willerth, 2017**).

Algunas de las ventajas que presentan los biopolímeros sintéticos son su estructura ya establecida, buenas propiedades biomecánicas, biodegradables por enzimas estererasas y

control sobre las formas que adopta (**Abbasian et al., 2019; Haugen et al., 2019**). Por otro lado, presentan desventajas bastante importantes principalmente por su baja bioactividad, por lo que requieren de modificaciones químicas o mezclarse con biopolímeros naturales, baja biocompatibilidad, baja adhesión celular, pueden liberar compuestos ácidos al degradarse e incluso en ciertos casos presentan una baja biodegradabilidad (**Haugen et al., 2019; Reddy et al., 2021**).

1.1.4.2. Biopolímeros naturales

El interés por las sustancias naturales ha ido en crecimiento en las últimas 2 décadas, donde las publicaciones referentes al tema han aumentado de manera exponencial, lo que permitió ampliar sus aplicaciones a campos como la IT (**Dintcheva et al., 2020**). En la IT se utilizan estos biopolímeros naturales obtenidos a partir de sustancias extraídas directamente de organismos vivos como plantas, animales y microorganismo (**Aaliya et al., 2021**). Mayormente, las sustancias que se utilizan son polisacáridos y proteínas, aunque también se estudia el uso de polipéptidos (**Reddy et al., 2021**).

La razón del interés por estos biopolímeros es que ofrecen características ventajosas como la biocompatibilidad, bioactividad, baja toxicidad, biodegradabilidad, biorreabsorción y una arquitectura compleja (**Ebhodaghe, 2021; Meng et al., 2019**). Cabe resaltar que su biodegradabilidad a diferencia de los biopolímeros sintéticos no resulta perjudicial para la salud del paciente, al degradarse en productos no tóxicos y de accesibilidad metabólica (**Ebhodaghe, 2021**). Y si bien varios carecen de rigidez, resistencia mecánica y en casos puntuales dar reacciones inmunogénicas, los biopolímeros naturales pueden complementarse entre ellos para obtener andamios con las características ideales (**Dintcheva et al., 2020; Reddy et al., 2021**).

1.1.5. Colágeno como biomaterial en andamios biológicos

El colágeno es la proteína más abundante en el organismo, llegando a ser el 80% de las proteínas que conforman la piel y el principal componente en ligamentos y tendones; En

el caso de los tejidos animales es más del 30 % del total de proteínas (Sundar et al., 2020). Hasta el momento se conoce la estructura de casi 28 tipos de colágeno, como se muestra en la **Tabla 1**, las cuales básicamente consisten en una triple hélice compacta formada de tres cadenas poliméricas que se encuentran constituidas en un 45 % por glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 1) (Perez-Puyana, Felix, et al., 2019). Los colágenos cumplen una función principalmente estructural, razón por la que es el principal componente de las matrices extracelulares, otras funciones que suele desempeñar son transmitir, resistir y disipar las fuerzas mecánicas, almacenar y liberar la energía de la tensión elástica (Fassini et al., 2021).

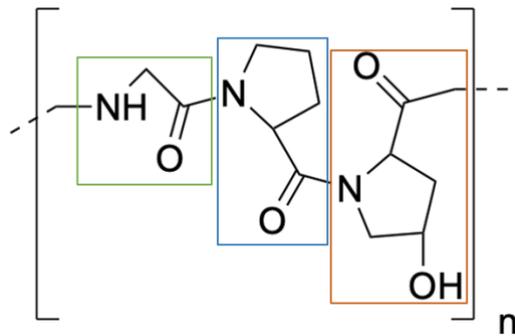


Figura 1. Estructura del colágeno. Se muestra la unión de aminoácidos para formar una cadena de colágeno, los aminoácidos cooresponden a los más comunes en las cadenas de colágeno, siendo la glicina de verde, prolina de azul e hidroxiprolina de naranja. Ilustración propia basada en la presentada por Zou et al., (2018).

Los tipos de colágeno de mayor interés para el cultivo de tejidos son el tipo I y II siendo preferentemente de bajo peso molecular debido a que de esta forma son más absorbentes (Sundar et al., 2020). El colágeno tipo 1 está formado por 2 cadenas alfa ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) con pesos alrededor de los 100 kDa, acompañadas de enlaces entre las cadenas α con el fin de equilibrar la estructura (Shoulders & Raines, 2009). La cadena $\alpha 1$ se presenta 2 veces en la proteína y solo una vez la $\alpha 2$, estos se enrollan en una hélice izquierda y en conjunto con otras estructuras se enrollan en una hélice derecha, dando forma a la proteína (Figura 2A-2B) (Pa'ee et al., 2021). Por otro lado, el colágeno tipo II cuenta con tan solo una cadena alfa ($\alpha 1$) (Figura 2C) la cual se repite 3 veces; de manera similar al colágeno tipo

I estas están enrolladas en una hélice izquierda y en conjunto con otras estructuras hacen una hélice derecha (Offeddu et al., 2016).

Tabla 1. Familia de proteínas del colágeno.

Tipo	Cadenas α	Especies moleculares	Tipo	Cadenas α	Especies moleculares
1	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2, \alpha 2(I),$ $[\alpha 1(I)]_3$	15	$\alpha 1(XV)$	$[\alpha 1(XV)]_3$
2	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	16	$\alpha 1(XVI)$	$[\alpha 1(XVI)]_3$
3	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	17	$\alpha 1(XVII)$	$[\alpha 1(XVI)]_3$
4	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV),$ $\alpha 3(IV), \alpha 4(IV),$ $\alpha 5(IV), \alpha 6(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2, \alpha 2(IV)$ $[\alpha 3(IV), \alpha 4(IV),$ $\alpha 5(IV)]$ $[\alpha 5(IV)]_2 \alpha 6(IV)$	18	$\alpha 1(XVIII)$	$[\alpha 1(XVIII)]_3$
5	$\alpha 1(V), \alpha 2(V),$ $\alpha 3(V), \alpha 4(V)$	$[\alpha 1(V)]_2, \alpha 2(V)$ $[\alpha 1(V)]_3$ $[\alpha 1(V)]_2, \alpha 4(V)$ $\alpha 1(XI)\alpha 1(V)\alpha 3(XI)$	19	$\alpha 1(XIX)$	$[\alpha 1(XIX)]_3$
6	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI),$ $\alpha 3(VI), \alpha 4(VI),$ $\alpha 5(VI), \alpha 6(VI)$	$[\alpha 1(VI) \alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)]$	20	$\alpha 1(XX)$	$[\alpha 1(XX)]_3$
7	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	21	$\alpha 1(XXI)$	$[\alpha 1(XXI)]_3$
8	$\alpha 1(VIII),$ $\alpha 2(VIII)$	$[\alpha 1(VIII)]_2, \alpha 2(VIII)$ $\alpha 1(VIII), [\alpha 2(VIII)]_2$ $[\alpha 1(VIII)]_3$ $[\alpha 2(VIII)]_3$	22	$\alpha 1(XXII)$	$[\alpha 1(XXII)]_3$
9	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX),$ $\alpha 3(IX)$	$[\alpha 1(IX), \alpha 2(IX),$ $\alpha 3(IX)]$	23	$\alpha 1(XXIII)$	$[\alpha 1(XXIII)]_3$
10	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$	24	$\alpha 1(XXIV)$	$[\alpha 1(XXIV)]_3$

11	$\alpha 1(\text{XI}), \alpha 2(\text{XI}),$ $\alpha 3(\text{XI})$	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$ $\alpha 1(\text{XI})\alpha 1(\text{V})\alpha 3(\text{XI})$	25	$\alpha 1(\text{XXV})$	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$
12	$\alpha 1(\text{XII})$	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	26	$\alpha 1(\text{XXVI})$	$[\alpha 1(\text{XXVI})]_3$
13	$\alpha 1(\text{XIII})$	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	27	$\alpha 1(\text{XXVII})$	$[\alpha 1(\text{XXVII})]_3$
14	$\alpha 1(\text{XIV})$	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	28	$\alpha 1(\text{XXVIII})$	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$

Elaborado en base a la tabla presentada por **Ricard-Blum, (2011)** y complementada con la información de **Kielty & Grant, (2002)** y **Cescon et al., (2015)**. Se muestra las cadenas α que forman los diferentes tipos de colágeno y las especies moleculares, es decir, las diversas formas en que se puede formar un mismo tipo de colágeno. En el caso del colágeno tipo VI no se muestra a las cadenas $\alpha 4(\text{VI}), \alpha 5(\text{VI}), \alpha 6(\text{VI})$ siendo parte de alguna especie molecular debido a que son formas alternativas a la cadena $\alpha 3(\text{VI})$ (**Cescon et al., 2015**).

Para la obtención de colágeno las fuentes más comunes son de origen animal, de las que destacan las de origen bovino, porcino, humano y peces; en el caso de estos últimos el colágeno mayormente es tomado de las escamas y la piel (**Naomi et al., 2021**). Otros orígenes menos frecuentes son de pollo, cola de canguro, tendones de cola de rata, patas de pato, tendón de equino, hueso/piel de caimán, patas de ave, piel de oveja y piel de rana (**Avila Rodríguez et al., 2018**).

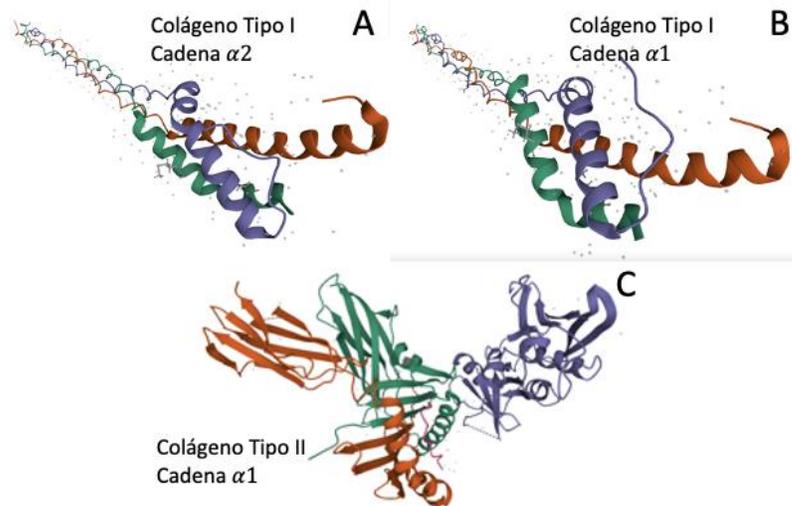


Figura 2. Cadenas α de colágeno tipo I y II. Las imágenes tomadas de UniProtKB, cada cadena alfa se coloreo de un color diferente para diferenciarlas en su estructura. (A) Imagen correspondiente a P08123 CO1A2_HUMAN, uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/P08123>), muestra las helices alfa y residuos que dan forma una estructura alargada correspondiente a la cadena $\alpha 2$ del colágeno tipo I. (B) Imagen correspondiente a P02452 CO1A1_HUMAN, uniprot

(<https://www.uniprot.org/uniprot/P02452>), muestra la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo I formada por las helices alfa y residuos acomodadas de forma alargada similar a la a la la cadena $\alpha 2$. (C) Imagen correspondiente a P02458 CO2A1_HUMAN, uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/P02458>), muestra la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo II, notándose una clara diferencia con las cadenas α del colágeno tipo I.

Para la ingeniería de tejidos, el colágeno presenta ciertas características que resultan atractivas como su biodegradabilidad, excelente biocompatibilidad, baja antigenicidad y en especial por su capacidad antimicrobiana ayudando a combatir las infecciones (**Sundar et al., 2020**). Cabe mencionar que otra ventaja que presenta es el permitir diseñar diferentes estructuras según el método de “crossing linking” que se utilice, por ejemplo, el método de liofilización produce formas esponjosas, el electrospun genera esteras nanofibrosas y la impresión 3D a baja temperatura permite obtener una estructura porosa multicapa (**Kim et al., 2019**). Sin embargo, el colágeno se degrada rápidamente al entrar en contacto con tejidos corporales por la alta presencia de la prolina, dado que esta es propensa a reaccionar al desnaturalizarse por acción del calor corporal; Esto resulta poco favorable para los AB, los cuales pierden su forma y tamaño (**Nurfriana et al., 2019**). Para mejorar su degradabilidad lo ideal es combinarlo con otro tipo de biopolímeros.

1.1.6. Quitosano como biomaterial en andamios biológicos

El quitosano es un polisacárido utilizado mayormente para aplicaciones clínicas, biomedicina e ingeniería de tejidos (**Islam et al., 2020**). Su estructura consiste en un amino-polisacárido lineal y unidades repetitivas acetiladas y desacetiladas distribuidas al azar (Figura 3), similar al glicosaminoglicano que forma parte de la matriz extracelular de la piel (**Jiang et al., 2021**). Contiene grupos amino libres que facilitan su solubilidad, estos se pueden protonar dando un polication con la capacidad de formar complejos iónicos; esto hace que se diluya en soluciones ácidas con pH menor a 6.5 (**Aguilar et al., 2019**). Además, gracias a la presencia de los grupos -OH y -NH₂ es capaz de formar enlaces de hidrógeno con otros biopolímeros como el colágeno, gelatina y agarosa (**Felfel et al., 2019**).

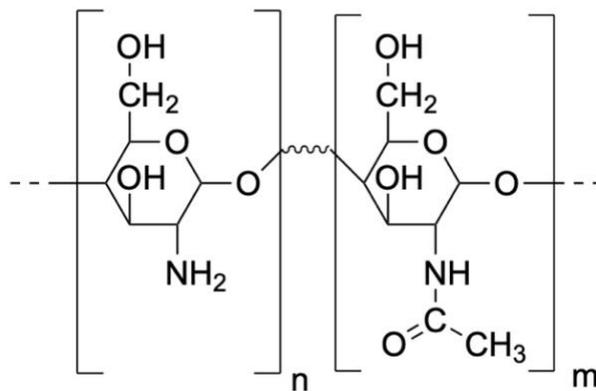


Figura 3. Estructura del quitosano. Como el quitosano se forma por varios polisacáridos se muestran solo 2 para dar una idea de la estructura. Los polisacáridos que forman al quitosano cuentan con un grupo alcohol primario (CH₂OH) y un grupo (OH), y en algunos se cuentan grupos acetilado (NH-CO-CH₃) y en otros con grupos desacetilados (NH₂). Ilustración propia basada en la presentada por **Zou et al., (2018)**.

Para la obtención de quitosano se debe extraer mediante un proceso de desacetilización parcial de quitina; siendo la mayor cantidad de D-glucosamina y menor cantidad de N-acetil-D-glucosamina, lo que diferencia al quitosano (**Kou et al., 2021**). Como fuente de estos biopolímeros se tiene a especies eucariotas como crustáceos, insectos, arácnidos, hongos, moluscos y algas (**Akca et al., 2018**). Fuera de los eucariotas, las fuentes de extracción se limita considerablemente, al ser producido solo por unos cuantos géneros de bacterias como *Bacillus* sp. and *Serratia* sp (**Bastiaens et al., 2019**).

Las características principales del quitosano que le hacen atractivo para la elaboración de AB son su biocompatibilidad, biodegradabilidad y la capacidad antimicrobiana (**Hu et al., 2021**). Adicionalmente a esto su degradación no perjudica en ninguna manera al cuerpo, debido a que por acción de la lisozima se liberan amino azúcares que resultan fácilmente metabolizados (**Y. Liu et al., 2019**). Otras características que lo han llevado a ser uno de los principales biopolímeros a escoger son su abundancia, versatilidad, no toxicidad, hidrofilia y su efecto de cicatrización. Además, mediante reacciones químicas sencillas puede conseguir una excelente elasticidad, flexibilidad y bajar el nivel de inflamación (**Islam et al., 2020**).

Por otra parte, el quitosano también presenta ciertas desventajas, por ejemplo, su degradabilidad puede ser excesivamente rápida, el tiempo de purificación es excesivo, si bien se puede modificar fácilmente con reacciones químicas, esto podría ocasionar un deterioro en sus demás características y el agregar otros componentes puede ocasionar un rápido secado al aire (**Radwan-Pragłowska et al., 2019**). También se debe tomar en cuenta sus propiedades mecánica, es decir, estabilidad; necesitando de fuertes agentes reticulantes o preferentemente de mezclarse con otros biomateriales, como puede ser colágeno y agarosa, para tener una estabilidad aceptable (**Hu et al., 2021**).

1.1.7. Otros polímeros de interés

1.1.7.1. Agarosa

La agarosa es un polisacárido con la capacidad de formar hidrogeles rígidos a concentraciones menores al 1%, a más de presentar biodegradabilidad y biocompatibilidad, haciendo que sea un biopolímero de interés para la ingeniería de tejidos (Garakani et al., 2020). Su uso no se ha extendido en este campo debido a no presentar adhesión celular, haciendo que sea utilizado mayormente junto a otros biopolímeros como agente reticulante (**N. Kumar et al., 2018**). Uno de los polímeros con los que se ha mezclado para mejorar su adhesión celular y aprovechar sus propiedades mecánicas, es el quitosano; siendo una mezcla bastante lógica debido a las semejanzas en la estructura química de la agarosa y el quitosano (**Felfel et al., 2019**). Otra combinación que se suele investigar es con el colágeno, al resultar fácil de modificar y es compatible con la agarosa; de esta forma la rigidez del colágeno ya no sería un problema (**Kniebs et al., 2020**).

1.1.8. Elaboración de andamios biológicos

La formación del entorno 3D se ve fuertemente influenciado por el método de elaboración que se utilice, también llamado crosslinking, por lo que se debe conocer los métodos que existen y cuál resulta más favorable según el biomaterial que se utilizara y la finalidad con

la que se realiza el cultivo (**Ruiz-Alonso et al., 2021**). Actualmente existe una considerable cantidad de métodos que se pueden clasificar de varias formas, una de las principales es clasificarlos en: métodos químicos, que consiste en el uso de agentes reticulantes, sin embargo, estos puede resultar ser tóxicos, afectar a la sustancias e incluso dar reacciones secundarias indeseadas; por otro lado, los métodos físicos, consisten en cadenas enredadas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, pero su estabilidad es considerablemente inferior a la de los métodos químicos (**Nurfriana et al., 2019**).

Otra forma de clasificarlos aceptada más ampliamente es en métodos convencionales o manuales y métodos de prototipado rápido o avanzados. Englobando dentro de los métodos manuales a la liofilización, electrospinning, fundición de solventes y lixiviación de partículas, separación de fases inducida térmicamente y gas foaming; mientras que dentro de los métodos avanzados se engloba a la estereolitografía, modelado de deposición fundida, sinterización selectiva por láser y bioimpresión 3D (**Eltom et al., 2019**).

1.1.8.1. Métodos manuales

El primero de todos los métodos para la elaboración de AB fue la fundición de solventes y lixiviación de partículas, que consiste en la dispersión de porógenos en una solución polimérica, para posteriormente lixiviar las partículas hasta eliminarlas completamente de la mezcla, dando lugar a los AB (**Roshandel & Dorkoosh, 2021**). De esta forma se puede controlar el tamaño de los poros y la porosidad con el tamaño de las partículas y la concentración de las partículas, respectivamente (**Eltom et al., 2019**). La separación de fases inducida térmicamente consiste en formar una fase rica en polímeros y una pobre en polímeros, separadas por diferencia térmica y posteriormente se liofiliza (**Szustakiewicz et al., 2019**). Electrospinning utiliza la electricidad para generar hilados de micro o nanofibrosa similar a la matriz extracelular (**Iron et al., 2019**). Gas foaming es de las más simples empleando solamente un gas inerte o lo más inerte que se pueda emplear, para generar un espumado que forme las porosidades (**Januariyasa & Yusuf, 2020**).

1.1.8.1.1. Liofilización

La liofilización, también llamado secado por frío, se basa en la sublimación para secar el andamio, congelándolo primero para posteriormente exponerlo al calor y sublimar el agua (Koyyada & Orsu, 2021). Las ventajas que presenta este método es la facilidad de fundición con diferentes morfologías de poros, lo que previene el estrés seco y la contracción; sin embargo, también tiene desventajas como alto consumo energético, uso de disolventes citotóxicos y la heterogeneidad en el tamaño de los poros (Kuo et al., 2021).

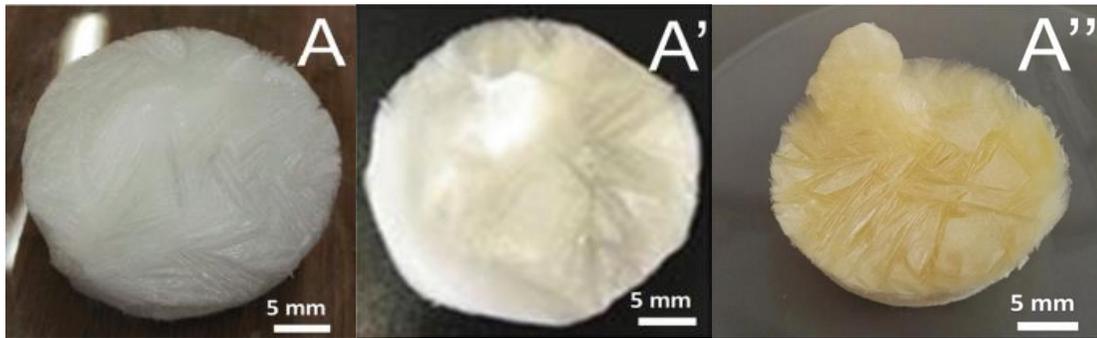


Figura 4. ABs elaborados por liofilización. Imágenes tomadas del estudio realizado por (Perez-Puyana, Jiménez-Rosado, et al., 2019). Se muestran andamios obtenidos mediante el método de liofilizado, elaborados a diferentes concentraciones de quitosano y colágeno, A 100-0 colágeno-quitosano, A' 50-50 colágeno-quitosano y A'' 0-100 colágeno-quitosano.

1.1.8.2. Métodos avanzados

Los métodos avanzados se basan en la impresión 3D, por lo que se emplean modelados tridimensionales hechos a computadora (Eltom et al., 2019). En el método de estereolitografía se trata de impresión capa a capa de materiales curables con luz UV, como la resina líquida que se polimeriza al exponerse a luz UV, facilitando el moldear estructuras pequeñas y complejas (Koyyada & Orsu, 2021). En el modelado de deposición fundida utiliza polímeros termoplásticos que se fundirán y se colocarán en la posición exacta que se desea según un modelo tridimensional (Khodaei et al., 2020). Otro método importante es la sinterización selectiva por láser, consisten en formar una estructura 3D, calentando las partículas mediante un láser, ocasionando que se fusionen y solidifiquen (Charoo et al., 2020).

1.1.8.2.1. Bioimpresión 3D

Este método emplea biomateriales para desarrollar patrones biológicos como las matrices celulares, aunque no se limita a estas (Eltom et al., 2019). La bioimpresión 3D se puede realizar principalmente de 2 maneras por extrusión y por goteo. En el caso de la impresión basada en extrusión se emplea una solución líquida algo viscosa que se empuja por una jeringa y se deposita en la posición deseada; esto brinda un gran control sobre la estructura, pero también conlleva una importante cantidad de tiempo (Hauser et al., 2021). Mientras que en el caso del goteo se coloca una capa del polímero en polvo sobre el que se depositan gotas de aglutinante formando una capa, de manera que se repite el proceso para cada capa; es considerablemente más sencillo que la extrusión, pero también conlleva tiempo (Koyyada & Orsu, 2021).

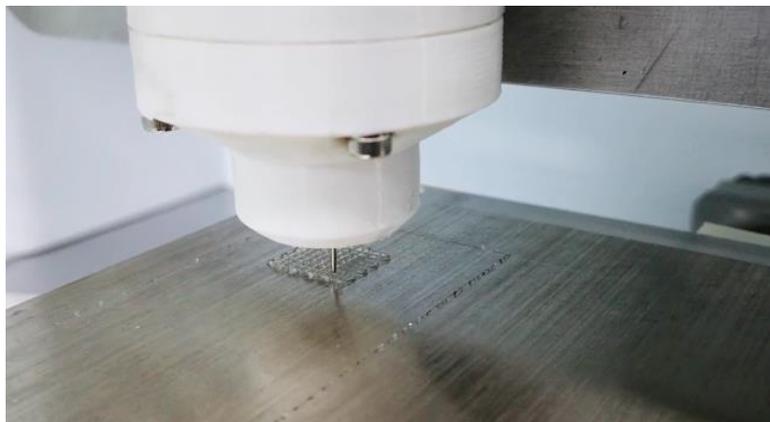


Figura 5. Proceso de bio-impresión. Imagen tomada de B. Liu et al., (2020). Impresión 3D de un ABs compuesto de 10 % gelatina, 1 % alginato y nanosilicato a concentraciones variables entre 0, 1, 2 y 3%, utilizando una bioimpresora de nube de partículas, Xi'an, China.

Considerando todo lo anteriormente explicado, la presente investigación se enfoca en la elaboración de ABs con potenciales aplicaciones en la IT. Los ABs se fabricarán a partir de biopolímeros naturales específicamente de colágeno y quitosano a diferentes concentraciones, y se utilizará 2 métodos de crosslinking liofilización y bioimpresión 3D por extrusión. Adicionalmente, para mejorar las propiedades mecánicas de los ABs se agregará agarosa en todos, de manera que no impida analizar el comportamiento de colágeno y quitosano. De manera que los resultados de este estudio sirvan como referente

para futuros estudios acerca de la fabricación de andamios, ya sea empleando alguno de los polímeros o métodos de crosslinking utilizados.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Elaborar andamios biológicos a partir de biopolímeros naturales mediante métodos manuales y bioimpresión 3D para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Elaborar andamios biológicos de manera manual empleando diferentes concentraciones de quitosano y colágeno.
- Elaborar andamios biológicos mediante bioimpresión 3D empleando diferentes concentraciones de quitosano y colágeno.
- Evaluar los andamios elaborados de manera manual y con bioimpresión 3D en base a sus características morfológicas y biológicas.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Métodos

2.1.1. Elaboración de andamios biológicos de manera manual empleando diferentes concentraciones del quitosano y colágeno.

2.1.1.1. Obtención de quitosano y colágeno.

El colágeno que se utilizó para la elaboración de los andamios fue de tipo 1 y 2 extraído de res, cuyas demás características son confidenciales al ser un producto de la empresa Andes Kinkuna. Este fue gentilmente donado por el PhD. Orestes López Docente – Investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En cuanto al quitosano que se utilizó fue extraído de camarón (*Litopenaeus vannamei*), con un peso molecular de 5600 kDa y un grado de desacetilación de 84%. Este fue gentilmente donado por la PhD. Mirari Arancibia Docente – Investigador de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1.1.2. Preparación de solución de quitosano para el método manual.

Primero se preparó la solución de quitosano siguiendo la metodología descrita por **Martínez et al., (2015)**, con ciertas modificaciones. Para ello el quitosano se disolvió en ácido acético 0.5M, en una concentración del 1% p/v y se centrifugo a 3000 rpm durante 5 minutos, finalmente, se eliminó la parte sólida.

2.1.1.3. Preparación de solución de colágeno para el método manual.

La solución de colágeno se preparó siguiendo una metodología modificada de **Offeddu et al., (2016)**. Se peso colágeno y se disolvió en ácido acético 0.05M, el colágeno se añadió poco a poco iniciando con una concentración del 0.5% p/v e incrementando 0,25 %

p/v cada que se disolvía, hasta llegar a 1 % p/v. Finalmente, para eliminar las burbujas de aire se centrifugo a 2500 rpm durante 5 minutos.

2.1.1.4. Preparación de solución híbrida de quitosano y colágeno para el método manual.

Para la preparación de la solución de colágeno y quitosano se siguió la metodología descrita por **Perez-Puyana, Jiménez-Rosado, et al., (2019)**. Se disolvió el colágeno y el quitosano en ácido acético 0.05M, teniendo en cuenta que las concentraciones utilizadas en los puntos 2.2.3.3 y 2.2.3.4. Una vez disuelto se centrifugo a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C.

2.1.1.5. Formación de andamios biológicos por método manual.

Las mezclas se verterán en moldes y se mantendrán por 24 h a -18 °C. Finalmente se liofilizaran a -100 °C por 6 horas, y se colocaran en un desecador (**Pipattanawarothai et al., 2017**).

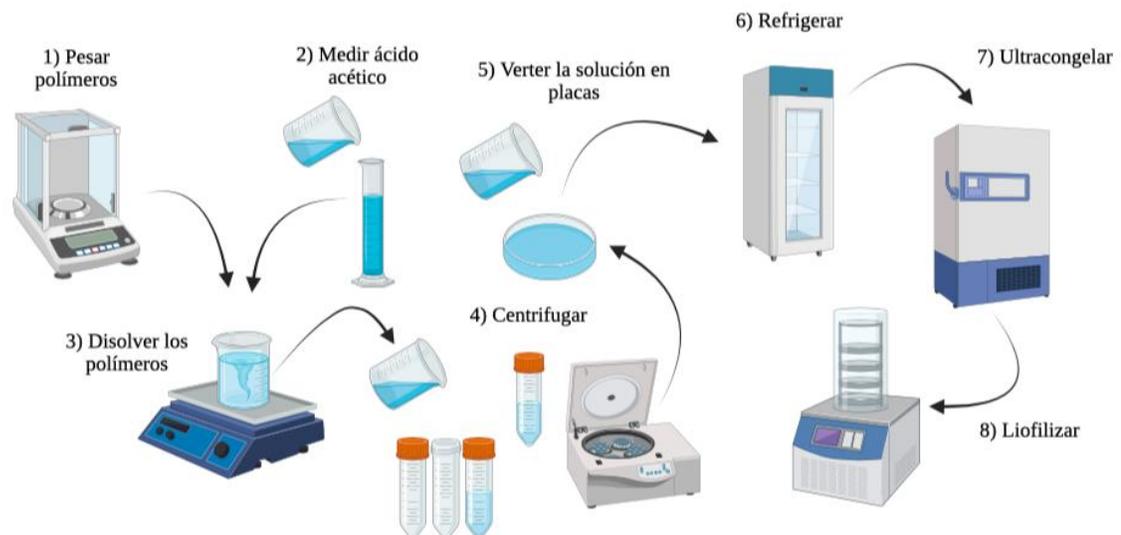


Figura 6. Esquema general de la preparación de los ABs por liofilización. En la imagen se ilustra el paso a paso de la metodología que se siguió, desde el pesado de los polímeros hasta hasta la liofilización de los ABs

2.1.2. Elaboración de andamios biológicos mediante bioimpresión 3D empleando diferentes concentraciones de quitosano y colágeno extraídos.

2.1.2.1. Preparación de gel de quitosano para bioimpresión 3D.

El gel de quitosano se elaborará siguiendo la metodología modificada de **Fischetti et al. (2020)**. Se disolvió quitosano en ácido acético 0.5 M en una concentración de 1.1% p/v y se dejó en agitación magnética por 3 horas a 40°C. También se elaboró una solución gelificante de agarosa y PBS en microondas. Posteriormente se mezcló las soluciones de manera que la concentración del quitosano se 1% p/v y la de la agarosa 2%.

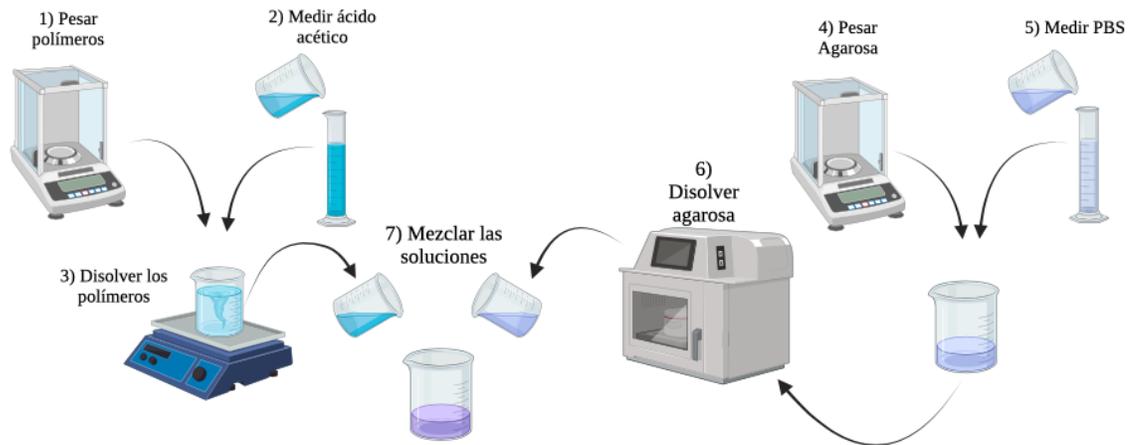


Figura 7. Esquema general de la preparación de la solución para bioimpresión 3D. Se ilustra la preparación de la solución de polímeros (quitosano, colágeno o ambos) y la solución de agarosa, las cuales se mezclan para obtener una solución imprimible.

2.1.2.2. Preparación de gel de colágeno para bioimpresión 3D.

El gel de colágeno se preparó siguiendo una metodología modificada de **Diamantides et al., (2017)**. Se disolvió colágeno en ácido acético 0.1 % y posteriormente se mezcló con la solución reticulante preparada en el punto 2.2.4.1.

2.1.2.3. Preparación de gel híbrido de quitosano y colágeno para bioimpresión 3D.

Se siguió la metodología modificada de **Sun et al. (2019)**. Se tomó colágeno y quitosano, y se disolvió en ácido acético 0.5 M, en las concentraciones establecidas en estudios preliminares. Posteriormente se mezcló con la solución reticulante preparada en el punto 2.2.4.1.

2.1.2.4. Formación de andamios biológicos mediante bioimpresión 3D.

2.1.2.4.1. Fabricación de una bioimpresora 3D.

Como base para la fabricación de la bioimpresora se utilizó las partes de una impresora 3D Afinibot modelo A3 (Gift Series). En primero lugar se realizó un modelamiento de la bioimpresora, el cual se muestra de la Figura 8. Las partes que no se pudieron sacar de la impresora 3D se imprimieron con plástico PLA con otra impresora 3D Creality modelo Ender-3, también se recicló partes de un refrigerador y ciertas piezas pequeñas fueron adquiridas en centros ferreteros.

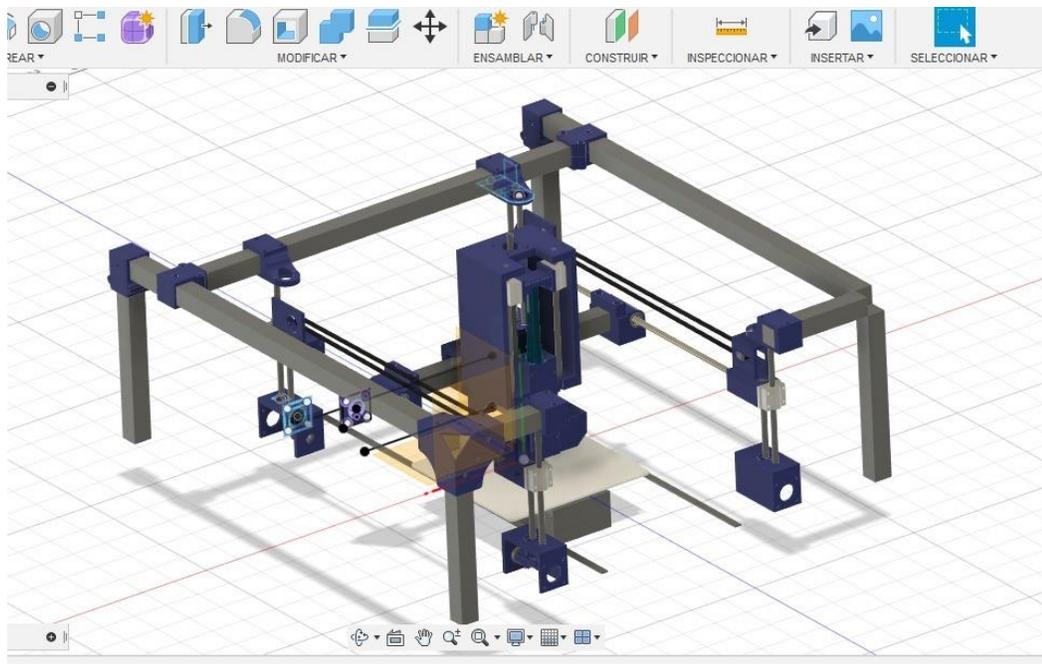


Figura 8. Modelamiento 3D de la estructura de la bioimpresora. El modelamiento se realizo en el programa Fusion360, con el fin de visualizar la distribución de la piezas impresas (azul), piezas metálicas (gris) y bandas (negro).

Con el modelamiento de la impresora listo se procedió a imprimir los ejes X y Y que permitirán moverse al extrusor sobre el área de la placa. Lo siguiente fue imprimir las piezas necesarias para que el extrusor se mueva en el eje z, es decir, en el eje vertical. Con la estructura sobre la que se moverá el extrusor ya armada se procedió a imprimir el extrusor y un soporte para que este se pueda acoplar a la estructura (Figura 9), esto con la intención de poder cambiar el extrusor para realizar otro tipo de impresiones. Para la estructura externa primero se imprimió piezas que permitan unir a los tubos que soportaran toda la estructura interna, y se dejó un espacio en la parte de abajo para posteriormente poder acoplar el sistema de refrigeración (Figura 10).

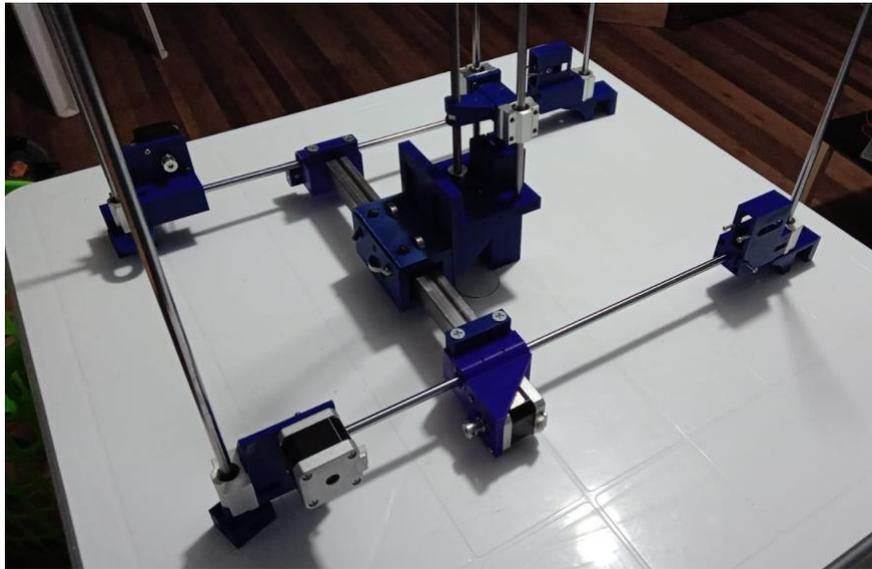


Figura 9. Estructura armada de los ejes XYZ con el extrusor. La fotografía muestra las piezas impresas en plástico PLA (azul) ensambladas con los motores que moverán al extrusor, un tubo cuadrado sobre el cual se posa el extrusor, y varillas que en conjunto con el tubo permitirán el movimiento del extrusor por los ejes XYZ.

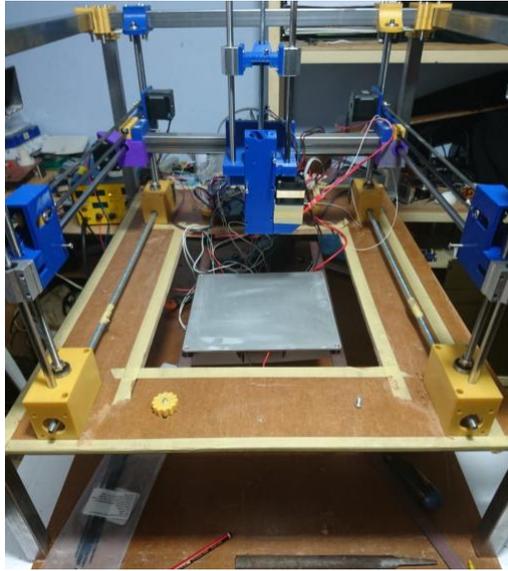


Figura 10. Estructura de la bioimpresora sin el sistema de refrigeración. La fotografía muestra la estructura de la impresora con los ejes XYZ armados por completo y con los circuitos y cableado en la parte trasera ya en funcionamiento.

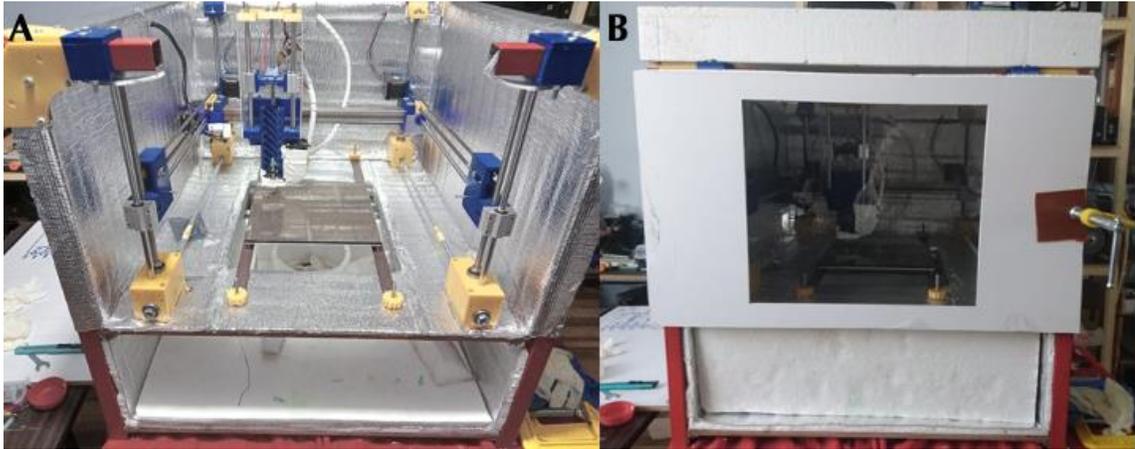


Figura 11. Bioimpresora 3D completa. (A) Fotografía de la estructura completa de la bioimpresora (B) Fotografía de la bioimpresora sellada para aislar térmicamente el ambiente interno.

El sistema de refrigeración se recicló de un congelador y se lo adaptó a la parte inferior de la impresora y se cubrió la impresora con espumaflex y espuma prodex (Figura 11A), con el fin de aislar térmicamente el ambiente interno de la impresora.

2.1.2.4.2. Impresión de andamios biológicos.

Con la bioimpresora ya construida se procedió con el proceso de bioimpresión. Para el diseño de los andamios se empleó AutoCAD y para imprimir se empleó CURA Ultimaker (Horvath & Cameron, 2018).

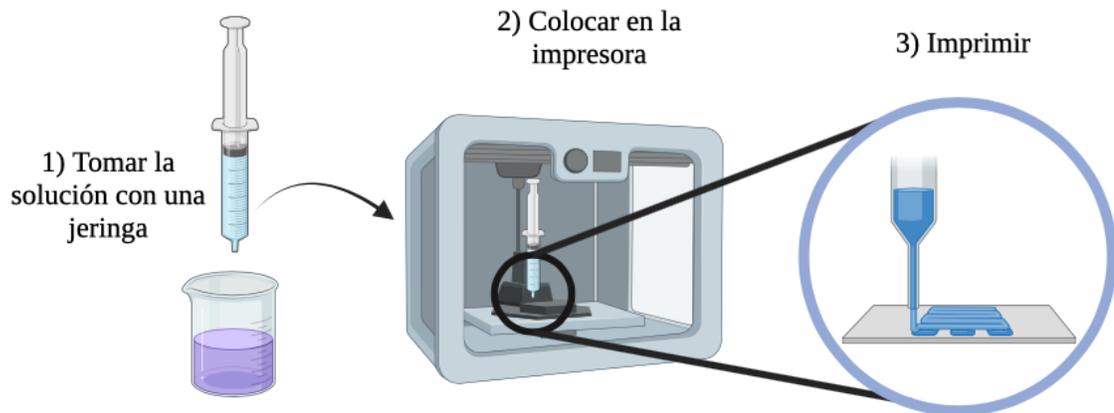


Figura 12. Proceso de bioimpresión 3D. Esquema simplificado del proceso de bioimpresión capa a capa.

2.1.3. Evaluación de los andamios elaborados de manera manual y con bioimpresión 3D en base a sus características morfológicas y biológicas.

2.1.3.1. Evaluación morfológica

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvo imágenes de la superficie de los andamios. Por otro lado, la porosidad se calculó con el método de método de infiltración de etanol, utilizando el W_{seco} de los andamios, la densidad del biomaterial (ρ_1), la densidad del etanol (ρ_2) y el peso final (W_f), el cual se obtuvo de pesar el andamio después de haber estado sumergidos 24 h en etanol. Estos datos se remplazaron en la siguiente fórmula (Nocera et al., 2018):

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

2.1.3.2. Evaluación de biodegradabilidad

La biodegradabilidad se evaluó siguiendo la metodología planteada por **Gholizadeh et al., (2017)**. Primero los andamios se cortaron con un bisturí de un tamaño de 1 cm², seguidamente se pesaron y posteriormente se colocarán en plasma sanguíneo durante un periodo de 7 días, de manera similar al punto 2.2.5.1. Los andamios se enjuagaron en etanol, se dejaron a secar y se volvieron a pesar. Las mediciones se realizaron en los días 2, 5 y 7, cambiando el plasma sanguíneo en cada una. El porcentaje de biodegradabilidad se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\%Biodegradabilidad = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100$$

Donde W_i es el peso inicial del andamio y W_f es el peso final del andamio.

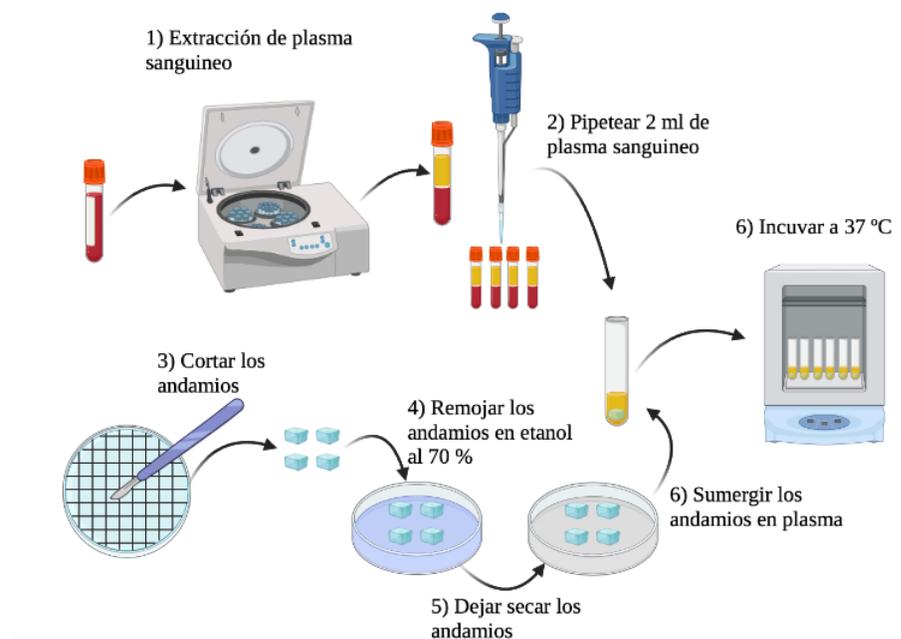


Figura 13. Proceso de biodegradabilidad y biomineralización de los ABs. Esquema de los pasos a seguir para sumergir los ABs en plasma e incubar, para la evaluación de biodegradabilidad y biomineralización

2.1.3.3. Evaluación de capacidad de absorción de agua

Los andamios se pesaron para obtener el W_{seco} y se sumergió en agua destilada por 6 horas. Cada 30 minutos se pesó el andamio para obtener el peso húmedo (W_{humedo}). La capacidad de absorción de agua se obtuvo mediante la fórmula (**Pipattanawarothai et al., 2017**):

$$\textit{Capacidad de absorción} = \frac{W_{humedo} - W_{seco}}{W_{seco}}$$

2.1.3.4. Evaluación de biomineralización

Esta evaluación se realizó en base al método descrito por (**Pipattanawarothai et al., 2017**), empleando plasma sanguíneo. Para ello se colocó el plasma en tubos de ensayo y se sumergió a los andamios a 37 °C por 7 días. Se analizó la formación de hidroxapatita (HAp) mediante microscopio óptico en los días 2, 5 y 7.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados.

3.1.1. Elaboración de andamios biológicos por método manual.

Utilizando la liofilización como método manual se obtuvo 3 tipos de ABs según su composición: ABs de quitosano, ABs de colágeno y ABs de quitosano y colágeno. En la elaboración se utilizaron las concentraciones de polímeros que se muestran en la Tabla 2. Con el fin de mejorar el entrecruzamiento o “crosslinking” del colágeno y el quitosano se los mezcló con agarosa, esto también ayuda a mejorar las propiedades mecánicas de los andamios sin perjudicar las propiedades biológicas. La elección específica de la agarosa se debió a ser un biopolímero natural con buena interacción con el colágeno y el quitosano (Kniebs et al., 2020; N. Kumar et al., 2018).

Tabla 2. ABs Elaborados por liofilización.

Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB de quitosano	Quitosano	1
	Colágeno	0
	Agarosa	0,5
Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB de colágeno	Quitosano	0
	Colágeno	1
	Agarosa	0,5
Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB de quitosano/colágeno	Quitosano	1
	Colágeno	1
	Agarosa	0,5

Las soluciones se vertieron en cajas bipetri y se pasaron por un tratamiento de ultracongelación por 24 h y posteriormente de liofilización de 24 h, dando como resultado los ABs que se muestran en la



Figura 14.. De forma general estos presentaron una coloración blanquecina y los de ABs de quitosano y quitosano/colágeno, mostraron mayor rigidez, mientras que el de colágeno fue mucho más frágil, fragmentándose rápidamente al contacto. A estos se los corto en pequeños cuadrados de 1 cm² con el fin de tener varias muestras, permitiendo realizar múltiples pruebas.



Figura 14. ABs elaborados por liofilización. Se muestran los resultados obtenidos mediante el método de liofilización (A) AB de colágeno. (B) AB de quitosano. (C) AB de quitosano/colágeno.

3.1.2. Elaboración de andamios biológicos por bioimpresión 3D.

Para lograr imprimir se realizó diferentes pruebas con relación a las condiciones de impresión. Se probaron diferentes materiales sobre los cuales imprimir, con el fin de encontrar uno en el que el AB se adhiriera con facilidad y no le absorba. Se probaron materiales como acetato, acetato de impresión, corcho, vidrio, papel encerado y aluminio, permitiendo llegar a determinar al vidrio como el material más idóneo para la impresión. Se probó la temperatura a la que se debe mantener el extrusor para que la solución no gelatinice dentro pero tampoco comprometa la estructura del polímero. Se evaluó temperaturas en un rango de 35 a 50 °C y se determinó que 41 ± 3 °C era la temperatura idónea para mantener liquida a la solución. Por otra parte, la velocidad de impresión fue

otro factor fundamental, en el caso de ser demasiado rápida la solución no tiene tiempo de gelatinizarse y si era muy lenta se acumulaba mucho material en un solo punto. La velocidad de 30 mm/s resultó ser la mejor entre las velocidades de 20 mm/s a 43 mm/s. La temperatura de la aguja debía mantenerse lo suficientemente caliente como para evitar que la solución solidifique dentro de la punta, pero lo suficientemente fría como para poder gelatinizarse al entrar en contacto con la cama de impresión. Para esto se probaron temperaturas en el rango de 40 a 70 °C, llegando a la conclusión de que 50 °C era la temperatura apropiada para la impresión. Más relacionado con la estructura de los AB está el controlar el grosor de las líneas que se imprimen, para lo que se probaron 3 diámetros de boquilla, 0.4, 0.6 y 0.8 mm; siendo 0.4 mm el que mejor funcionó, es decir, el que mejor control ofreció sobre el AB. Finalmente, el índice de compresión se fijó en 1.5 habiendo probado valores de 1.0 a 1.8. El índice de compresión es la cantidad de material que se imprime en cada punto, si este es muy bajo partes del AB no se imprimirán, pero si es muy alto se acumulará demasiado material y el AB perderá la forma.

Utilizando la bioimpresión 3D se elaboraron 3 tipos de AB según su composición: AB de quitosano, AB de colágeno y AB de quitosano y colágeno. Las concentraciones de polímeros utilizadas se muestran en la Tabla 3. La agarosa es capaz de funcionar como biotinta para impresión 3D por sí sola, por lo que se agregó agarosa en mayor concentración que en el caso de los AB liofilizados, con el fin de cubrir las necesidades de altas propiedades mecánicas y una rápida gelificación (Yang et al., 2022). Mediante ensayos preliminares se llegó a la conclusión de que 2 % era la concentración necesaria para que la solución sea imprimible.

Tabla 3. ABs Elaborados por bioimpresión 3D

Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB de quitosano	Quitosano	1
	Colágeno	0
	Agarosa	2
Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)

AB de colágeno	Quitosano	0
	Colágeno	1
	Agarosa	2
Tipo de AB	Polímeros	Concentración (%)
AB de quitosano/colágeno	Quitosano	1
	Colágeno	1
	Agarosa	2

Las soluciones se tomaron con una jeringa y a esta se la coloco en el extrusor de la bioimpresora. Mediante el programa Repetier-Host de la empresa RepRap y el motor de procesamiento de Slic3r, se imprimió los ABs en 15 minutos, dando los ABs o en este caso hidrogeles presentados en la Figura 15, con una coloración ligeramente blanca. A estos se los recortó con cuidado en pequeños cuadrados de 1 cm² de manera similar a los ABs liofilizados, con el mismo propósito de realizar múltiples pruebas.

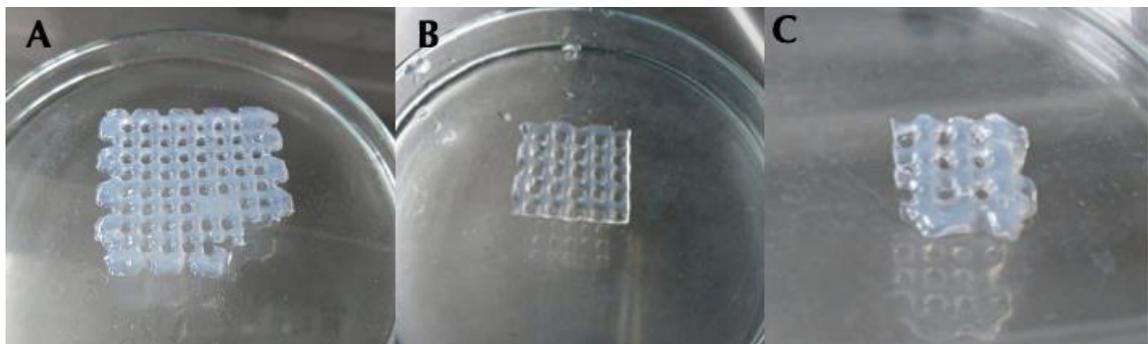


Figura 15. ABs elaborados por Bioimpresión 3D. Se muestran los resultados obtenidos mediante el método de bioimpresión 3D (A) AB de colágeno con un tamaño de 4 cm² y 2 mm de alto (B) AB de quitosano/colágeno con un tamaño de 4 cm² y 3 mm de alto (C) AB de quitosano con un tamaño de 4 cm² y 2 mm de alto.

3.1.3. Evaluación de los andamios elaborados en base a sus características morfológicas y biológicas.

3.1.3.1. Evaluación morfológica.

3.1.3.1.1. Evaluación morfológica de andamios elaborados de manera manual mediante Microscopia electrónica de barrido.

Para determinar la idoneidad de los ABs para el cultivo de tejidos, la primera característica que se debe tomar en cuenta es la morfología, al ser el principal factor en influir sobre, la migración celular, crecimiento celular, adhesión celular y vascularización (**Bartoš et al., 2018; Eltom et al., 2019**). Consecuentemente, la principal evaluación que se realizó a los ABs fue sobre su morfología.

La Figura 16A brinda una imagen detallada del ABs liofilizados de quitosano. La superficie presenta un comportamiento rugoso, irregular y poco poroso. Los escasos poros que se logra visualizar son bastante irregulares como muestra la Figura 16B, C y D. Para tener una observación más clara de la morfología se congeló los ABs con nitrógeno líquido y se cortó en frío con un bisturí, permitiendo ver la estructura interior del andamio (Figura 17). La Figura 17A muestra el interior del andamio de quitosano con una morfología más porosa e irregular que en su superficie, además, se observa una estructura por capas. Esta morfología porosa y en capas o láminas de los ABs también se han observado en andamios elaborados con quitosano de fuentes distintas a las de este estudio (**Reys et al., 2017**). La Figura 17B, C y D permitieron medir el tamaño de los poros y se encontró que varían entre 30 y 340 μm y el tamaño promedio fue de 189,31 μm .

En cuanto al AB de colágeno (Figura 16E, F, G y H), la superficie es más rugosa y porosa. Igualmente, la Figura 17E muestra que el interior del AB de colágeno es porosa. El tamaño de los poros fue de 40 a 360 μm y en promedio fue de 162,85 μm como muestra la Figura 17F, G y H.

A diferencia de los andamios de quitosano y colágeno, la superficie del AB híbrido de quitosano/colágeno (Figura 16I) es relativamente lisa y a excepción de tres orificios no se observó la presencia de poros, la Figura 16J, K y L confirmaron la ausencia de macroporos y microporos al menos en la superficie. Sin embargo, la Figura 17I muestra una morfología bastante porosa en el interior del ABs de quitosano/colágeno. El tamaño de

los poros se encuentra en el rango de los 100 a 690 μm según lo observado en la Figura 17J, K y L. En este caso el promedio del tamaño de los poros es de 360 μm , notablemente superior a los ABs de quitosano y colágeno. Estudios en los cuales se han combinado biopolímeros para la elaboración de andamios indican que es común que se obtengan poros de mayor tamaño (Kaczmarek, Sionkowska, & Osyczka, 2018; Kaczmarek & Sionkowska, 2018; Kaczmarek, Sionkowska, Golyńska, et al., 2018). En resumen, el tipo de andamio que muestra poros de mayor tamaño es el híbrido con un promedio de 360 μm , seguido del andamio de quitosano con un promedio de 189, μm y finalmente el andamio de colágeno con un promedio de poros de 162,8 μm .

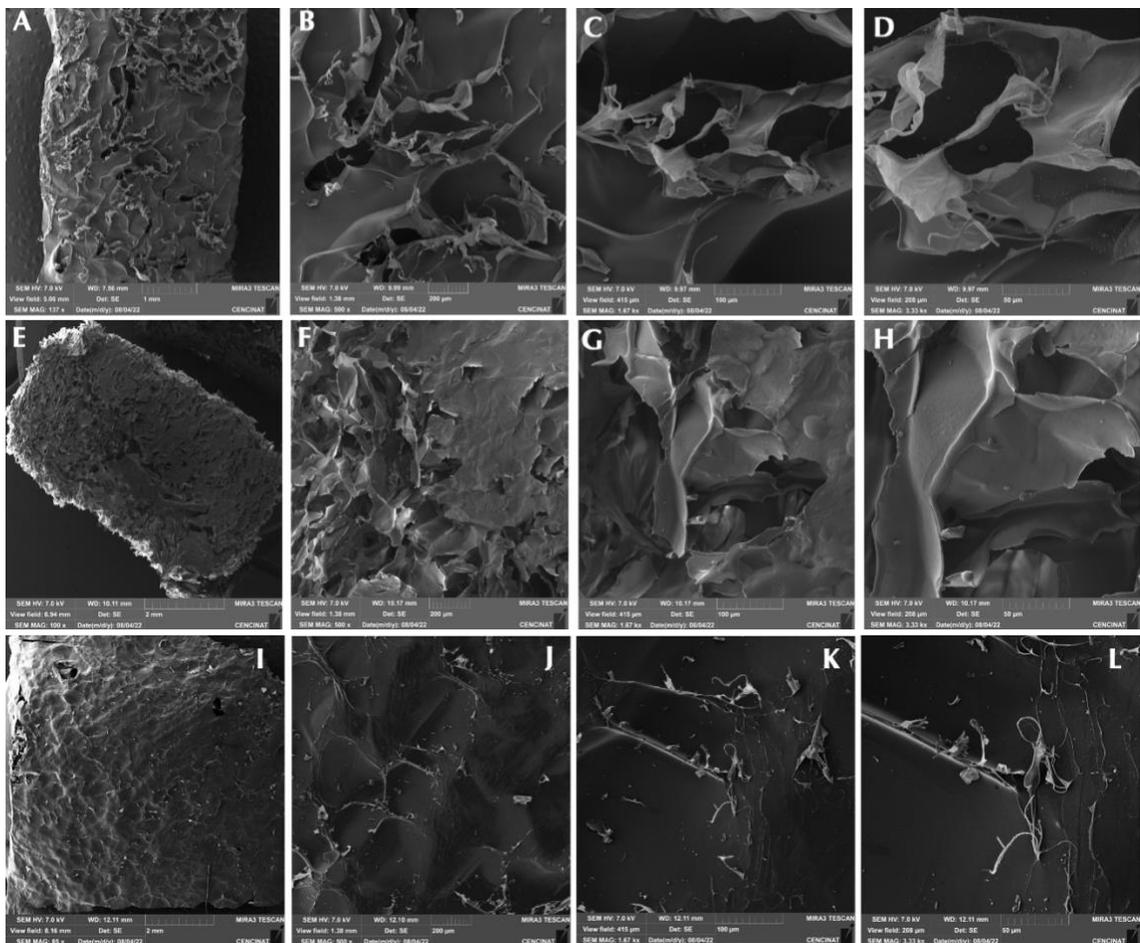


Figura 16. Superficie de los ABs liofilizados. Observaciones morfológicas de la superficie de los ABs por SEM. (A, B, C, D) AB de quitosano a MAG 137X, 500X, 1,67 kX y 3,33 kX (E, F,

G, H) AB de colágeno a MAG 100X, 500X, 1,67 kX y 3,33 kX (I, J, K, L) AB de quitosano/colágeno a MAG 85X, 500X, 1,67 kX y 3,33 kX

La dimensión de los poros es un factor que influye directamente sobre la adhesión celular de un AB; de manera que si los poros son demasiado pequeños, se produce una permeabilidad celular limitada y la formación de una cápsula alrededor de los bordes del andamio, pero si los poros son demasiado grandes, se limita el área específica y se reduce la densidad del ligando disponible para que la célula se adhiera (**Saravanan et al., 2016**). Los ABs idealmente deben contar con una red porosa con macroporos, de 100 a 900 μm y microporos de hasta 2 μm , facilitando la adherencia de las células, nutrientes y metabolitos a la estructura (**Winnett et al., 2022**). Los 3 tipos de ABs cuentan con macroporos dentro del rango anteriormente nombrado e inclusive más pequeños en los casos de los ABs de colágeno y quitosano, por lo que se puede decir que en este aspecto son aptos para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Otro factor que favorece la adhesión celular según **Khan et al., (2020)** es la rugosidad de la superficie, en este aspecto destacan los ABs de colágeno al presentar la superficie más rugosa, seguida de la superficie de los ABs de quitosano y la de quitosano/colágeno, los cuales presentaron la menor rugosidad.

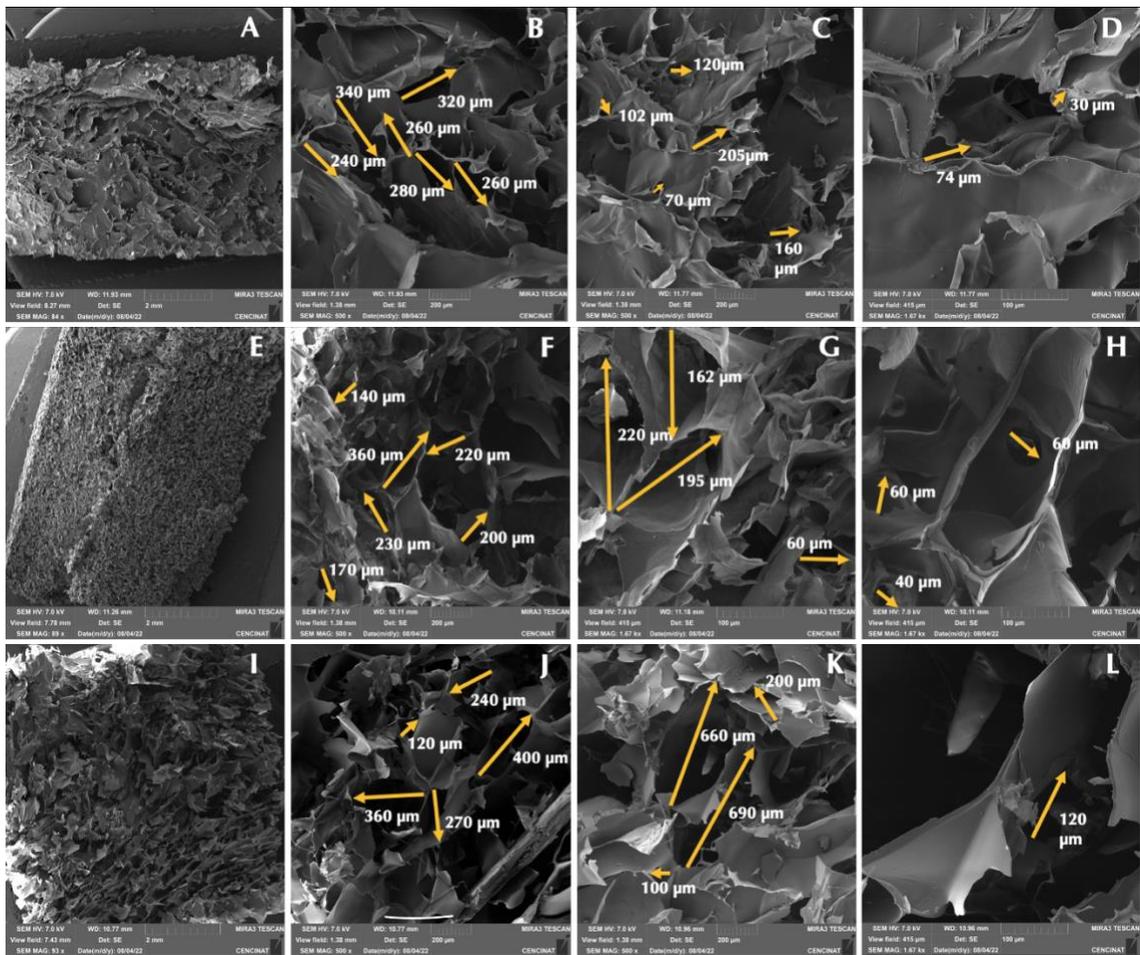


Figura 17. ABs liofilizado cortado. Observaciones morfológicas de los poros de los ABs por SEM y mediciones del tamaño de sus poros. AB de quitosano a MAG 84X (A). Tamaño de los poros del AB de quitosano a MAG 500X (B - C) y 1,67 kX (D). AB de colágeno a MAG 89X (E). Tamaño de los poros del AB de colágeno a MAG 500X (F) y 1,67 kX (G - H). AB de quitosano/colágeno a MAG 93X (I). Tamaño de los poros del AB de quitosano/colágeno a MAG 500X (J - K) y 1,67 kX (L).

De acuerdo al tamaño de los poros de los ABs elaborados los ABs de quitosano/colágeno cuentan con poros del tamaño adecuado para la regeneración de tejido óseo debido a que para la obtención de este tejido se requiere la presencia de poros de entre 300 y 500 μm . Esta característica no solo favorece la regeneración de este tipo de tejido sino también la vascularización (Nguyen et al., 2021). Los ABs de quitosano y colágeno, también podrían resultar útiles en la regeneración de este tipo de tejido porque los poros se encuentran en el rango de 40 a 100 μm sin embargo, al no poseer poros de mayor tamaño, preferentemente $>500 \mu\text{m}$, se obtendría una baja vascularización (Khoramgah et al.,

2020). Cabe mencionar que los ABs de colágeno también podrían resultar útiles en la regeneración de tejido de piel, siendo que el rango de tamaño de poros para ese tipo de tejido es de 100 a 200 μm , además, este biomaterial está presente en alta cantidad en la matriz extracelular de la piel (Ullah et al., 2018).

3.1.3.1.2. Evaluación morfológica de andamios elaborados de por bioimpresión 3D mediante microscopía óptica.

La Figura 18 ofrece fotografías de la morfología superficie de los hidrogeles. El hidrogel de quitosano mostró una superficie mayormente lisa. El hidrogel de colágeno de la misma forma mostró más irregularidades, en este caso observa una estructura más definida notándose la forma dada por la impresión. El hidrogel de quitosano/colágeno ofreció una superficie con ciertas irregularidades, pero en la que se notaba más claramente el efecto de la impresión, llegando a notarse la capas con las que se formó al hidrogel.

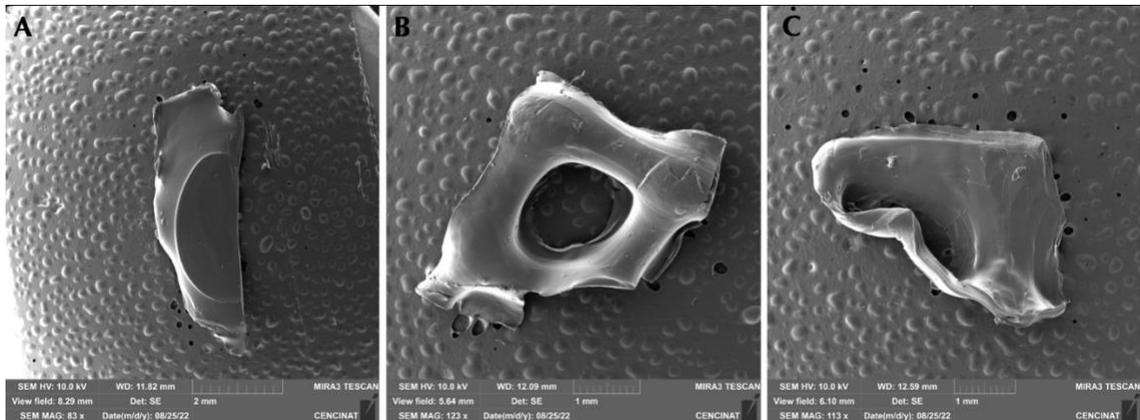


Figura 18. Superficie de los ABs bioimpresos. Fotografías tomadas mediante SEM. Hidrogel de quitosano a 83X (A). Hidrogel de colágeno a 123X (B). Hidrogel de quitosano/colágeno a 113X (C).

En otros estudios acerca de la bioimpresión 3D de hidrogeles se muestra morfologías similares a las obtenidas. Por ejemplo en el estudio de Nadernezhad et al., (2019) se obtiene una morfología bastante similar empleando agarosa, el estudio de Heidenreich

et al., (2020) emplea mezclas de quitosano/colágeno y obtiene una superficie similar pero con una estructura más irregular en comparación con lo obtenido en la Figura 15. **Osidak et al., (2019)** expone un resultado parecido empleando colágeno y menciona que en el caso de los hidrogeles bioimpresos no es necesario que se observen los poros en los que se colocaran las células, más bien pueden colocarse directamente en la solución a imprimir, para tenerlas en suspensión. Por lo tanto, los hidrogeles impresos podrían emplearse para varias aplicaciones con este tipo de cultivo celular preferiblemente, debido a la carencia de poros en su superficie que permitan la entrada de células.

3.1.3.2. Evaluación de porosidad

A más del tamaño de los poros y la rugosidad de la superficie otro aspecto de la morfología de los ABs a tener en cuenta es el número de poros. Un mayor número de poros brindará una mayor superficie para la adhesión celular y también incrementará el número de células que se puede cargar el ABs (**Saravanan et al., 2016; Zaharin et al., 2018**).

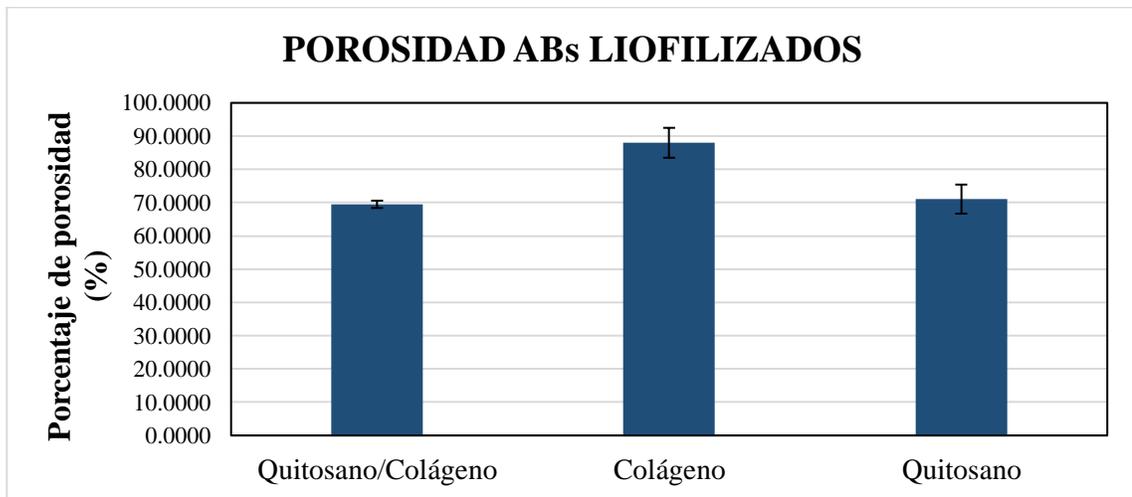


Figura 19. Resultados evaluación de porosidad de ABs liofilizados. Los ABs de quitosano tienen una porosidad de 71,07 % con una desviación estándar de 4,36, y los de colágeno tienen una porosidad de 88,00 % con una desviación estándar de 4,50, los de quitosano/colágeno tienen una porosidad de 69,50 % con una desviación estándar de 1,09.

Una medida indirecta para determinar la porosidad de andamios es mediante el método de infiltración de etanol y los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 19 para los

lío-filizados y Figura 20 para los bioimpresos. En los ABs lío-filizados el colágeno presentó la mayor porosidad con 88,00%, seguido del quitosano con 71,07 % ligeramente superior al quitosano/colágeno con 69,50 %. En los bioimpresos los ABs de colágeno y quitosano/colágeno mostraron resultados cercanos, siendo de 25,17 % y 25,81 %, respectivamente; valores ampliamente superiores al mostrado por quitosano de apenas 3,70 %.

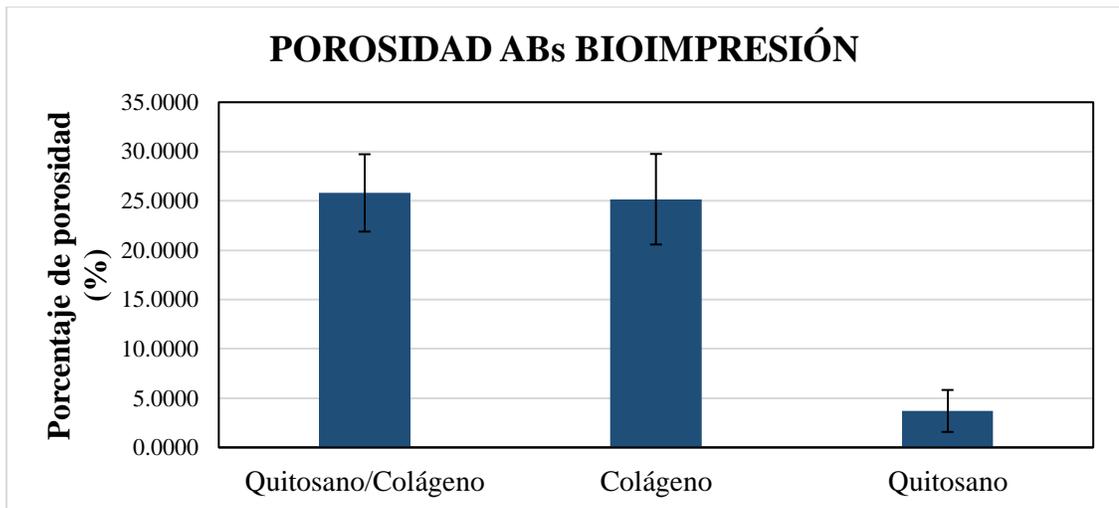


Figura 20. Resultados evaluación de porosidad de ABs bioimpresos. La gráfica expone la porosidad de los ABs bioimpresos, los de quitosano tienen una porosidad de 3,70 % con una desviación estándar de 2,13, los de colágeno tienen una porosidad de 25,17 % con una desviación estándar de 3,92, y los de quitosano/colágeno tienen una porosidad de 25,81 % con una desviación estándar de 3,92.

Se debe tomar en cuenta que una porosidad demasiado alta puede resultar desfavorable, al perjudicar las propiedades mecánicas, en especial la rigidez (**Ravaglioli et al., 2008**). El porcentaje de porosidad más adecuada dependerá del tipo de tejido; Por ejemplo, en el caso del tejido dérmico la porosidad debe ser igual o ligeramente superior al 70 %, permitiendo un adecuado suministro de nutrientes e intercambio de gases (**Radhika Rajasree et al., 2020**). En el caso del tejido óseo se prefiere una porosidad entre el 80% y el 90%, al favorecer propiedades como la osteoinductividad y crecimiento de osteoblastos (**Maji et al., 2016**). De manera que, según los resultados obtenidos, únicamente los ABs de colágeno mostraron un valor idóneo para la regeneración de tejido

óseo. Sin embargo, los valores de los ABs de quitosano y quitosano/colágeno indican que podrían tener aplicaciones en los tejidos dérmicos y probablemente en tejidos pulmonares, dado que estos tiene una porosidad de $68.88 \pm 3.63\%$ según lo mencionado por **Wang et al., (2020)**.

Las porosidades de los hidrogeles obtenido por bioimpresión 3D se mostraron considerablemente bajas, debido al alto contenido de agua, para obtener información más esclarecedora se debería someter al hidrogel a procesos como la liofilización con el fin de secarlo (**Garakani et al., 2020; Qi et al., 2020; Zhou et al., 2020**). Sin embargo, como se mencionó anteriormente en la fabricación de este tipo de andamios se puede cargar las células a los biopolímeros o tintas de manera directa, logrando que las células queden impregnadas en el hidrogel y regenerar el tejido dentro del organismo al contar con las condiciones adecuadas. De esta manera el número de poros presentes en andamios bioimpresos no sería tan fundamental como en el caso de los andamios liofilizados.

3.1.1. Evaluación de biodegradabilidad

Para la evaluación de biodegradabilidad se decidió emplear plasma sanguíneo con el fin de simular las condiciones internas del cuerpo humano, es decir, exponer los andamios elaborados a fluidos biológicos para analizar su comportamiento y evaluar si los mismos tienden a degradarse. El plasma sanguíneo tiene en su composición varias proteínas como la lisozima, una enzima de interés para esta investigación por sus capacidades para degradar el quitosano (**Wrobel et al., 2017**); esto debido a su capacidad para romper los enlaces glucosamina-glucosamina que producen oligosacáridos que se incorporan a las vías metabólicas o se excretan (**Yan et al., 2019**). También contienen carboxipeptidasas, una familia de enzimas que remueven los enlaces C-terminal de las proteínas las cuales podrían degradar colágeno. En el plasma sanguíneo también se encuentran la carboxipeptidasa N y la procarboxipeptidasa B2 (**Leung & Morser, 2018**).

Con el método de liofilizado los resultados obtenidos fueron bastante irregulares, como se evidencia en la Figura 21, valores negativos indican que la masa del andamio aumentó, y

valores positivos indican que la masa del andamio disminuyó. El colágeno en el día 2 no mostró biodegradabilidad, pero si en los días 4 y 7 (valores mayores a 0), siendo en el día 4 que más se pudo notar. El colágeno tubo la mayor biodegradabilidad en comparación con los otros polímeros debido a que este es mucho más susceptible a la degradación enzimática que el quitosano y consecuentemente también que quitosano/colágeno (Irawan et al., 2018). Los ABs de quitosano y quitasano/colágeno no llegaron a mostrar biodegradabilidad lo que indica que se debería extender el tiempo de incubación para obtener resultados que ayuden a tener un mejor entendimiento de esta característica. Adicionalmente, la razón por la que los andamios aumentaron su masa se debe a que se encuentran liofilizados y como se analizó en el punto 3.1.3.1.1. su estructura es bastante porosa por lo que pueden absorber y almacenar fluidos fácilmente. Por lo pronto según los resultados obtenidos se puede decir que los ABs de quitosano y quitosano/colágeno por su baja biodegradabilidad son favorables para el cultivo de tejidos óseo (Zhu et al., 2021); mientras que los ABs de colágeno podrían funcionar tanto para tejido óseo y dérmico, si bien tiene una mayor degradación aún sigue siendo baja y su degradación del 34,08% en el día 4 es un comportamiento similar a los ABs de piel (Sheikholeslam et al., 2020).

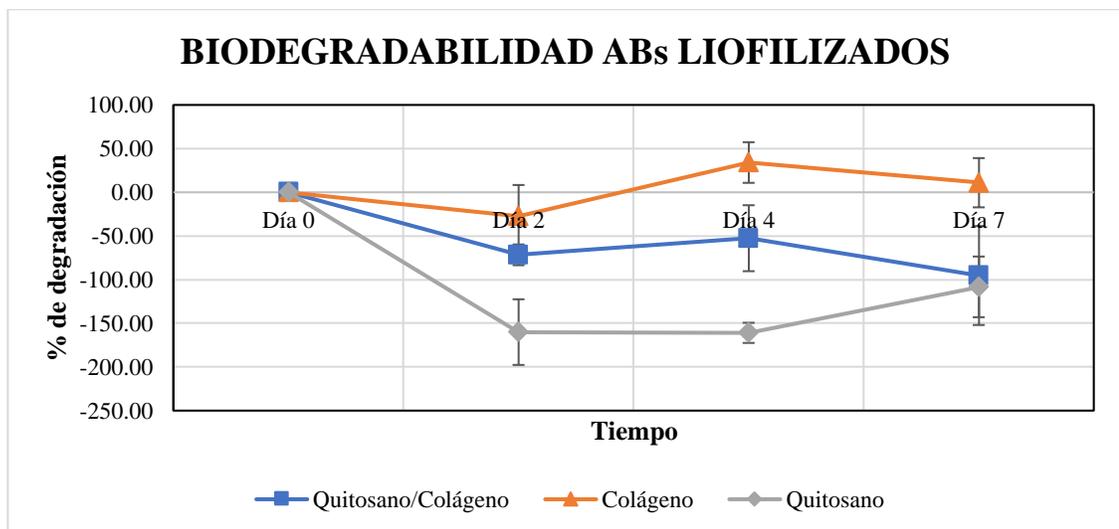


Figura 21. Resultados evaluación de biodegradabilidad ABs liofilizados. Se muestra la variación de la biodegradabilidad en función del tiempo. El quitosano en el día 2 mostró -160,09%, -160,96% en el día 4 y 108,29% en el día 7. El colágeno en el día 2 mostró -27,41%, 34,08% en

el día 4 y 10,95% en el día 7. El quitosano/colágeno en el día 2 mostró -71,63%, -52,57% en el día 4 y -95,31% en el día 7.

Los ABs obtenidos por bioimpresión aportaron resultados más coherentes que se muestran en la Figura 22. El colágeno en el día 2 y 4 presentaron valores cercanos de 3,77 % y 5,33 %, respectivamente; el día 7 presentó una diferencia notable con los valores anteriores de degradación, llegando a ser hasta el 27,57 %, 5 veces más que el valor del día 4. La disminución en la masa no es lineal, lo que indica que el plasma sanguíneo tuvo un retardo considerable en penetrar hasta el interior del AB, por lo que la absorción y consecuentemente la degradación no se ocurrió uniformemente (**Mehboob et al., 2020**). La Figura 24 indica que estos hidrogeles tienen una baja capacidad de absorción de agua por lo que tiene sentido el retraso del plasma sanguíneo en entrar con profundidad en el hidrogel. Una vez ocurrido esto el hidrogel empezó a degradarse rápidamente por el ratio alto de degradación del colágeno, a pesar de no encontrarse una enzima específica como la colagenasa (**Irawan et al., 2018**).

El quitosano en el día 2 tuvo una degradación del 11,81 %, para el día 4 este valor creció hasta 19,51 % y para el día 7 la degradación creció notablemente, llegando a ser poco más del doble que en el día 4. Al presentar una baja capacidad de absorción de agua, apenas mayor a la del colágeno, el plasma sanguíneo demoró en penetrar hasta el interior del hidrogel, sin embargo, debido a la presencia de la lisozima se pudo degradar con mayor facilidad (**Wrobel et al., 2017; Yan et al., 2019**).

Finalmente, en el caso de los ABs de quitosano/colágeno los días 2 y 4 fueron ligeramente inferiores a los de quitosano siendo de 10,44 % y 18,56 %, sin embargo, en el día 7 apenas hubo diferencia con el día 4 siendo de 19,08 %. Al tener la mayor capacidad de absorción de agua pudo tener una degradación más rápida en un inicio similar a los hidrogeles de quitosano, para el día 7 la degradación disminuyó drásticamente debido a la fusión de estos polímeros lleva a una disminución en su ratio de degradación (**Satish Kumar et al., 2019**) también se debe tener en cuenta que la formación de HAp en la superficie retrasa la degradación, dado que estos hidrogeles presentaron la mayor formación de HAp, como

se muestran en la Figura 26, su efecto se notó con mayor fuerza (Kaczmarek, Sionkowska, Golyńska, et al., 2018).

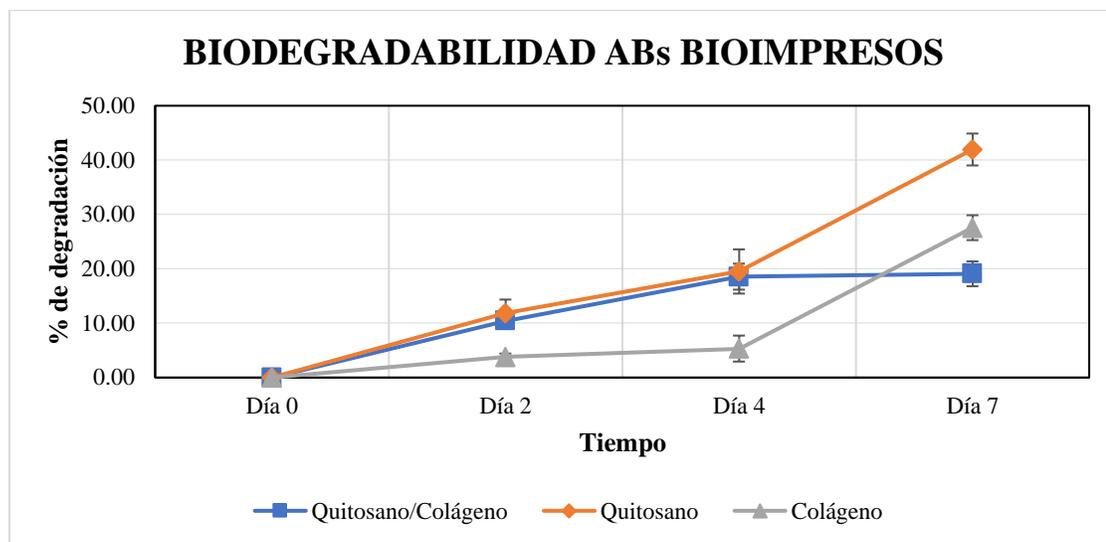


Figura 22. Resultados evaluación de biodegradabilidad ABs liofilizados. Se muestra la variación de la biodegradabilidad en función del tiempo. El quitosano en el día 2 mostro 11,81%, 19,51% en el día 4 y 41,95% en el día 7. El colágeno en el día 2 mostro 3,7722%, 5,33% en el día 4 y 27,57% en el día 7. El quitosano/colágeno en el día 2 mostro 10,44 %, 18,56 % en el día 4 y 19,08 % en el día 7.

Los hidrogeles de quitosano tiene una degradabilidad semejante a los resultados obtenidos por Irawan et al., (2018), por lo que podría tener aplicaciones en el cultivo de tejido dérmico. Los hidrogeles de colágeno podrían emplearse en el cultivo de tejido dérmico e inclusive en tejidos cerebrales, para lo que se debe mantener entre el 20 y 30% para el correcto desarrollo de las células, y en el presente estudio se obtuvo 27,57% (H. N. Kim & Choi, 2019). Por lo visto en la Figura 22 se puede suponer que la degradación de los hidrogeles de quitosano/colágeno se prolongará por mucho más tiempo lo que resulta idóneo para el tejido óseo (Zhu et al., 2021). Para comprobar lo antes dicho se debería realizar un ensayo con un tiempo más prolongado de incubación.

3.1.1. Evaluación de capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua del andamio y consecuentemente su hinchamiento refleja la estabilidad estructural e influye en las propiedades mecánicas de los andamios de colágeno cuando se implantan *in vivo* (Li et al., 2017). En caso de que la capacidad de absorción de agua sea demasiado alta sus propiedades mecánicas se verán afectadas, pero si por el contrario son demasiado bajas la interacción celular se vería afectada. Este parámetro permite analizar la absorción de fluidos corporales y la transferencia de nutrientes y metabolitos celulares dentro del andamio; además al absorber fluidos también aumenta el tamaño de los poros y la porosidad total, y consecuentemente el área de la superficie de los andamios aumenta permitiendo una mejor infusión y unión celular (Maji et al., 2016).

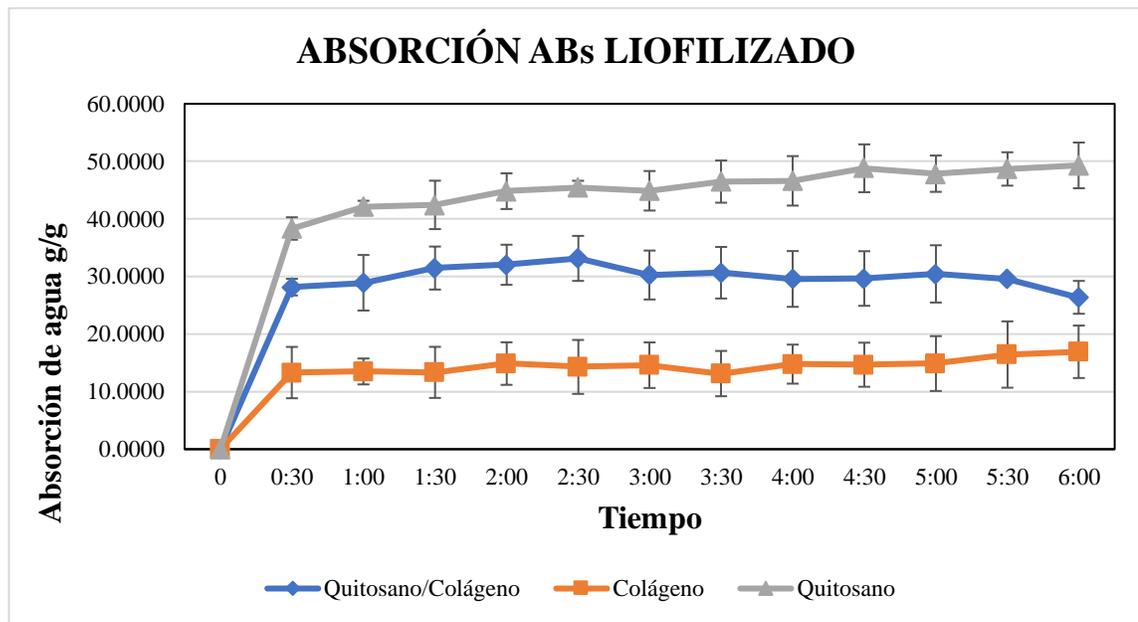


Figura 23. Resultados evaluación de capacidad absorción de agua. Los ABs de quitosano empezaron con 38,34 g/g de absorción de agua y terminaron 49,30 g/g. Los ABs de colágeno empezaron con 13,31 g/g de absorción de agua y terminaron 16,92 g/g. Los ABs de quitosano/colágeno empezaron con 28,15 g/g de absorción de agua y terminaron 26,38 g/g.

La evaluación de esta característica mostró los resultados que se muestran en la Figura 23, para los ABs liofilizados, y en la Figura 24 para los ABs bioimpresos. Al analizar el comportamiento de los ABs liofilizados lo primero a notarse es que la absorción del quitosano es la más alta, teniendo su punto máximo a las 6 horas con un valor de 49,30

g/g y su punto mínimo a los 30 minutos con 38,33 g/g; la absorción fue de una manera bastante predecible siendo el primer valor el punto más bajo y subiendo de poco a poco con ligeras variaciones. Según **Saravanan et al., (2016)** la absorción de agua del quitosano es bastante alta en especial en sus primeras 6 horas. Al analizar estos resultados se debería en futuros análisis incrementar el tiempo para la evaluación de este parámetro hasta obtener valores constantes.

El siguiente ABs con mayor capacidad de absorción de agua fue el de quitosano/colágeno, mostrando un ligero crecimiento en un inicio y seguido de un decrecimiento mantenido. Su punto máximo de absorción de agua fue a las 2:30 horas con 33,14 g/g y mínimo a las 6 horas con 26,38 g/g. Los ABs híbridos tienden a presentar una menor capacidad de absorción de agua que los ABs de un solo biopolímero como por ejemplo quitosano, según lo mencionado por **P. Kumar et al., (2017)**.

Los ABs de colágeno presentaron la menor capacidad de absorción de agua a las 3:30 horas con 13,13 g/g y mayor a las 6 horas con 16,91 g/g. La baja capacidad de absorción de agua del colágeno es consecuencia de emplear colágeno hidrolizado, según (**Irawan et al., 2018**), al pasar por este proceso pierde su estructura helicoidal nativa haciendo que en cierta medida también pierda varias de sus características mecánicas y biológicas. Otro factor que influye es el procedimiento de reticulación, en este caso la liofilización, este proceso disminuye la proporción de capacidad de absorción de agua de los andamios de colágeno porque algunos de los grupos hidrofílicos se consumen (**Li et al., 2017**).

Las capacidades de absorción de agua obtenidas en los 3 ABs indican que estos son aptos para aplicaciones en ingeniería de tejidos (**Cao et al., 2020; He et al., 2020; Xu et al., 2021**). La alta capacidad de absorción de agua por parte de los ABs de quitosano/colágeno se asemeja a la obtenida por **He et al., (2020)** y los ABs de quitosano incluso superan este resultado. Mientras que los ABs de colágeno mostraron resultados semejantes a los de **Cao et al., (2020)** y **Xu et al., (2021)** los cuales son ABs específicos para regeneración de piel.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 24 los hidrogeles obtenidos por bioimpresión 3D presentaron una capacidad de absorción realmente baja, teniendo 0,75 g/g como valor más alto obtenido con los hidrogeles de quitosano/colágeno a las 4:30 horas; el cual también fue el hidrogel que mostró la mayor capacidad de absorción, con un punto mínimo de 0,58 g/g. El comportamiento de este hidrogel fue bastante irregular al inicio y adoptó un comportamiento más estable con el tiempo. El quitosano presentó menor capacidad de absorción que el andamio híbrido pero una absorción ligeramente superior al colágeno con un punto mínimo de 0,31 a los 30 minutos y un punto máximo de 0,57 g/g a las 6 horas y punto mínimo de 0,31 a los 30 minutos. Finalmente, el colágeno tuvo un desempeño ligeramente por debajo del quitosano teniendo su punto máximo a las 6:00 horas con 0,38 g/g y mínimo a la 1:00 hora con 0,17 g/g; su comportamiento mostró un crecimiento lento a partir de 1 hora sumergidos con variaciones en varios puntos.

La composición de los hidrogeles en su mayoría es agua por lo que era de esperarse que mostraran una capacidad de absorción de agua notablemente baja, llegando incluso a tener valores muy bajos en comparación con los ABs liofilizados **Qi et al., (2020)**. Para llegar a una mayor apreciación de la porosidad de los hidrogeles se los debería someter a algún proceso de secado como liofilización (**Garakani et al., 2020; Zhou et al., 2020**).

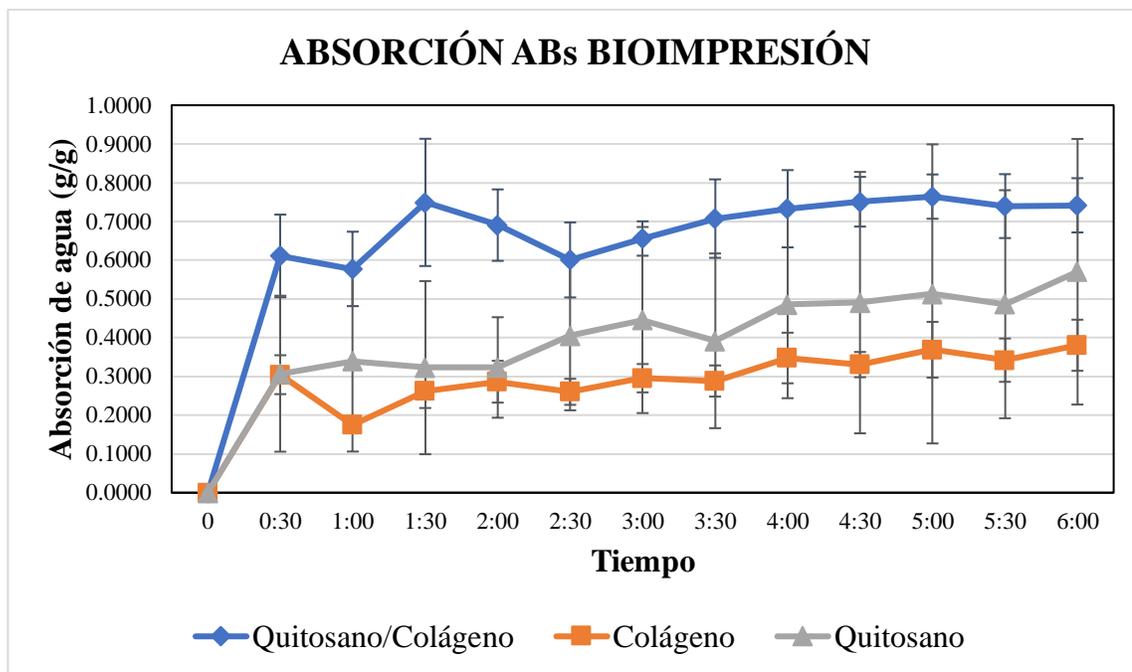


Figura 24. Resultados evaluación de capacidad absorción de agua. Los ABs de quitosano empezaron con 0,30 g/g de absorción de agua y terminaron 0,57 g/g. Los ABs de colágeno empezaron con 0,30 g/g de absorción de agua y terminaron 0,38 g/g. Los ABs de quitosano/colágeno empezaron con 0,58 g/g de absorción de agua y terminaron 0,75 g/g.

3.1.2. Evaluación de biomineralización

La biomineralización se refiere a la deposición de iones y minerales en las superficies de los biomateriales al exponerlos a los fluidos corporales, en este caso la deposición de HAp al exponerse a plasma sanguíneo (Saravanan et al., 2016). Debido a la similitud de la HAp y los huesos esto resulta útil para determinar si el AB es apto para cultivo de tejido óseo o para implantarse, además aporta una idea acerca de su bioactividad (Nga et al., 2020; Pipattanawarothai et al., 2017).

Para analizar la presencia de esta se realizarán observación al microscopio del plasma sanguíneo (Figura 25 y Figura 26) y también se removió la capa de HAp de la superficie de los ABs mediante etanol, para analizar la cantidad obtenida (Figura 27 y Figura 28). Esta reacción ocurre debido a por las propiedades negativas del etanol sobre la osteointegración de los biomateriales (Lima et al., 2011).

La Figura 25 **Error! Reference source not found.** muestra que en el periodo de 2 días solo se observan partículas de HAp en el plasma de los andamios de colágeno, en el día 4 igualmente se obtuvo partículas que se presume podrían tratarse de la HAp, en el día 7 la cantidad de HAp fue mucho mayor. Figura 27 la presencia de un sedimento blanco se nota con claridad desde el día 2 y su presencia incremento en el día 4 y 7. Debido a la coloración blanca de este sedimento se supone que trata de HAp, la cual imita química y cristalográficamente al hueso (**Ferraris et al., 2020**). Entre los principales componentes de los huesos están el colágeno y la HAp, su interacción se da por la estructura del colágeno compuesta de huecos aniónicos sobre los cuales se posa la HAp formando cristales (**Sofi et al., 2018**). Dado la relación natural de estos es comprensible los resultados obtenidos en los ABs de colágeno en comparación con los otros ABs.

El plasma de los ABs de quitosano no mostró ningún indicio de HAp hasta el día 7 (Figura 25). La Figura 27 muestra que en el día 2 el etanol mostraba una ligera transparencia, acompañada de la presencia de partículas blancas; en el día 4 no se notó un aumento en el precipitado y en el día 7 solo hubo un ligero aumento. Si bien el quitosano por sus grupos funcionales $-NH_2$ y $-C=O$ también pueden presentar biomineralización, este por sí solo no presenta una actividad tan elevada como si se le acompañara con otros polímeros (**Saravanan et al., 2016**). Razón por la cual los ABs de quitosano presentaron la biomineralización más baja y fue superado por los ABs de quitosano/colágeno. Si bien las imágenes de la Figura 25 muestran que tuvieron el mismo comportamiento de biomineralización, la Figura 27 muestra una ligera superioridad de los ABs de quitosano/colágeno en especial en los días 4 y 7.

Los ABs bioimpresos tuvieron un comportamiento bastante diferente. La muestran que para el día 2 solo se apreció una ligera formación de HAp en el plasma del colágeno y la Figura 28 muestra que el AB tuvo una ligera biomineralización. En el día 4 y 7 los ABs de colágeno ofrecieron un resultado similar a los del día 2. La Figura 26 indica que los hidrogeles de quitosano no presentaron ninguna formación que se pueda tratar de HAp en ninguno de los días. Se removió poco precipitado de estos ABs en el día 2 y se mantuvo este resultado en los días 4 y 7. Los ABs de quitosano/colágeno en el día 2 no se ofrecieron

nada que se asemejara a HAp, pero la Figura 28 mostró que si hubo cierta presencia de HAp. Para el día 4 solo se pudo divisar pequeñas formaciones en el plasma de colágeno y quitosano/colágeno y en el día 7 los sedimentos ya se pudieron observar claramente. La Figura 28 muestra que estos ABs tuvieron una sedimentación casi constante a lo largo del tiempo, solamente en el día 7 se notó cierto aumento en la presencia del sedimento. En el plasma de los hidrogeles de quitosano y quitosano/colágeno de los días 2, 4 y 7, y ligeramente en los de colágeno del día 7, se presentó ciertas formaciones que por su forma se sospecha que es degradación del hidrogel.

El bajo desempeño por parte de los hidrogeles se debió a la baja actividad de biomineralización que presentan en general los hidrogeles, razón por la que su uso para la regeneración ósea quedaría limitado (**Chen et al., 2021**). Para mejorar esta característica de los hidrogeles se ha realizado estudios en los que se indica que los elaborados con más de un polímero presentan mejores características, además, las mezclas con colágeno muestran mejores resultados en especial para la regeneración de tejido óseo (**Grabska-Zielińska et al., 2021**). De esta manera se explica que el hidrogel de quitosano/colágeno muestre mejores resultados que los demás hidrogeles.

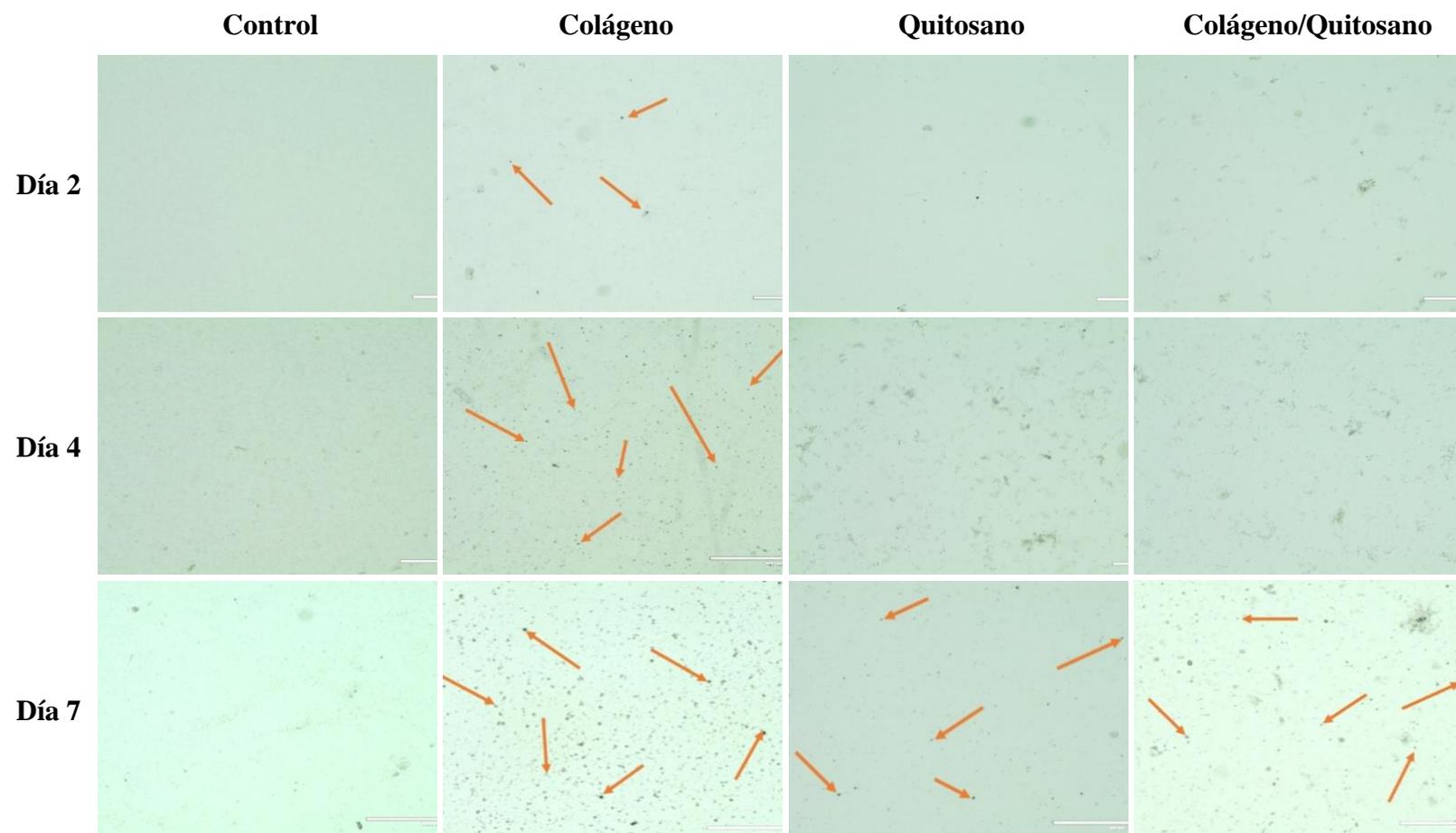


Figura 25. Resultados biomineralización de ABs liofilizados plasma sanguíneo. Imágenes tomadas con microscopio EVOS con una magnitud de 10 X. La presencia de partículas que corresponden a HAp se encuentran marcadas con flechas de color naranja.

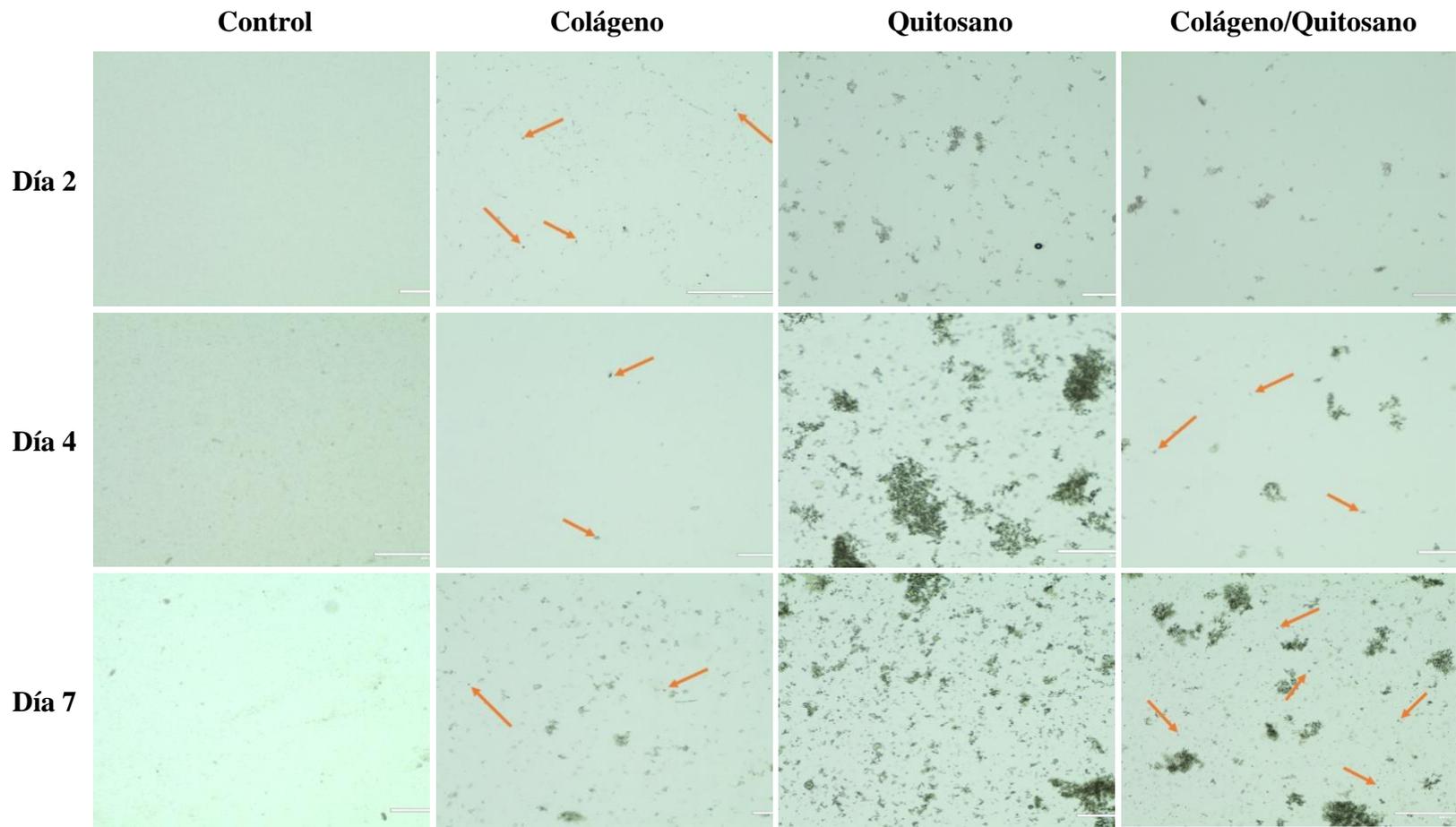


Figura 26. Resultados biomineralización de ABs bioimpresos en 3D plasma sanguíneo. Imágenes tomadas con microscopio EVOS con una magnitud de 10 X. La presencia de partículas que corresponden a HAp se encuentran marcadas con flechas de color naranja..

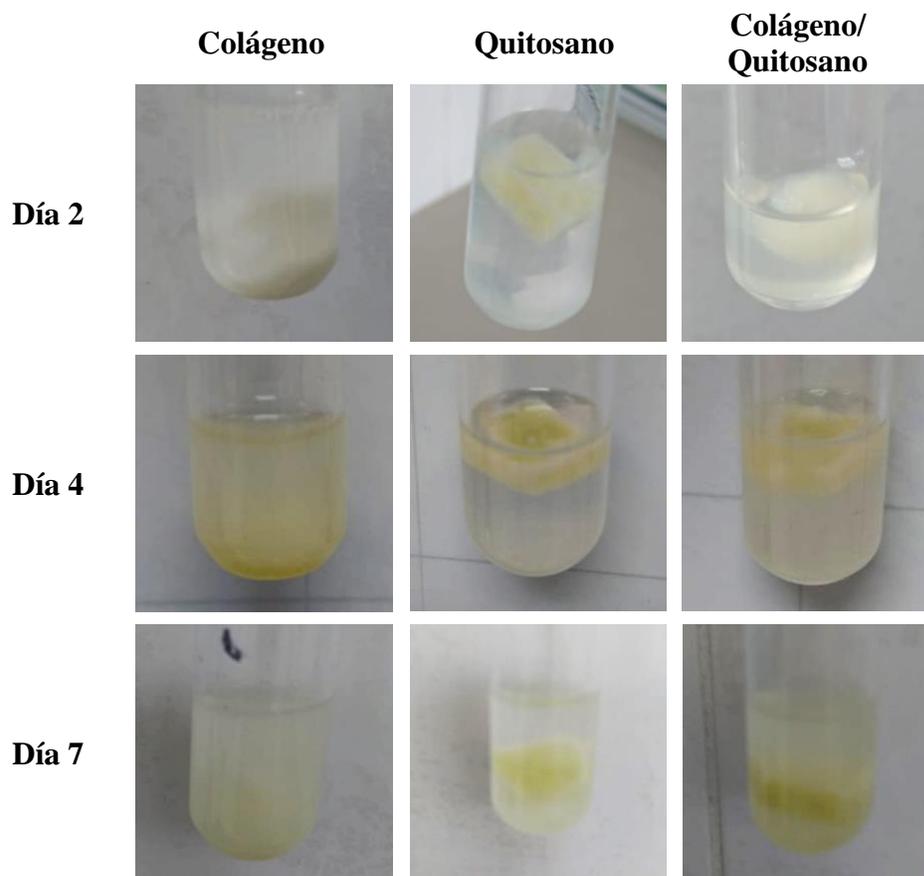
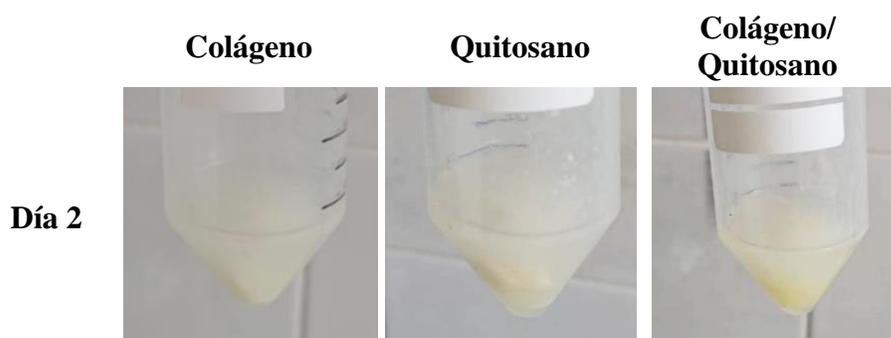


Figura 27. Resultados biomineralización de ABs liofilizados sumergidos en etanol. Imágenes de la reacción de los ABs elaborados median liofilización removidos del plasma sanguíneo y sumergidos en etanol. El etanol se llena un precipitado blanco que se sospecha es Hap removida de la superficie de los ABs.



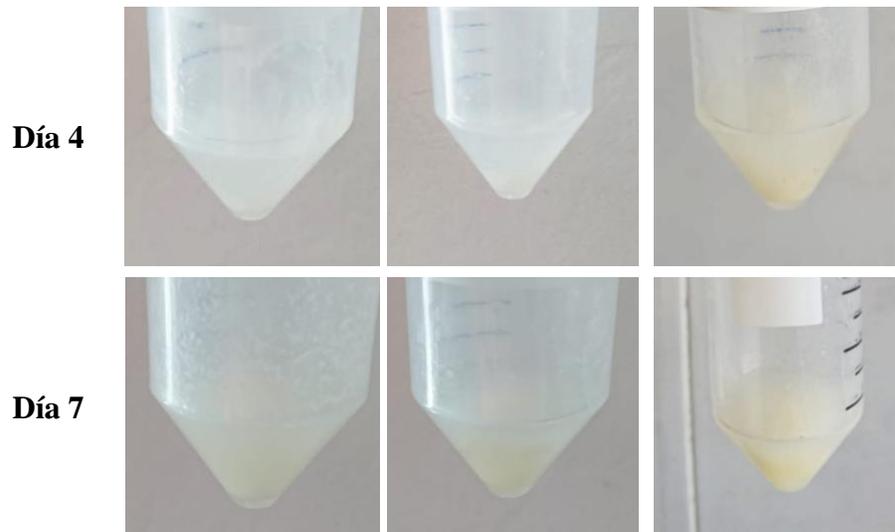


Figura 28. Resultados biomineralización de ABs bioimpresos en 3D sumergidos en etanol. Imágenes de la reacción de los ABs mediante bioimpresión 3D removidos del plasma sanguíneo y sumergidos en etanol. El etanol se llena un precipitado blanco que se sospecha es Hap removida de la superficie de los ABs.

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- En la actualidad la Ingeniería de tejidos es un área fundamental de la biomedicina, especialmente para investigaciones de medicina regenerativa. Investigaciones en este campo están permitiendo superar problemas relacionados a compatibilidad, falta de donantes de órganos, entre otros. Por lo tanto, con el fin de aportar andamios que resulte útiles en la ingeniería de tejidos y conocimiento a esta área de estudio, se elaboraron andamios a partir biopolímeros naturales mediante liofilización como método manual (Figura 14) y bioimpresión 3D (Figura 15).
- Siguiendo la metodología esquematizada en la Figura 6 se elaboró los ABs liofilizadas a las concentraciones indicadas en la Tabla 2. El resultado obtenido fue 3 ABs completamente secos de coloración blanquecina que se muestran en la Figura 14, a los que posteriormente se les caracterizó según su morfología, biodegradabilidad, capacidad de absorción de agua y biomineralización.
- Siguiendo la metodología esquematizada en la Figura 7 y Figura 12 se elaboró los ABs bioimpresos en 3D a las concentraciones indicadas en la Tabla 3. El resultado obtenido fue 3 ABs en forma de higrogel con coloración ligeramente blanca que se muestra en la Figura 15, a los que posteriormente se les caracterizó según su morfología, biodegradabilidad, capacidad de absorción de agua y biomineralización.
- Finalmente, según los resultados obtenidos en las evaluaciones morfológicas y biológicas los andamios fabricados en el presente estudio pueden servir para aplicaciones en IT, en especial en la regeneración de tejido óseo y de piel. Por el tamaño de sus poros los ABs de colágeno pueden ser útiles en la regeneración de piel, aunque por su porosidad también podrían utilizarse los ABs de quitosano y

quitosano/colágeno. La evaluación de biodegradabilidad mostro posibles aplicaciones en el tejido óseo, dérmico y cerebral. Según la capacidad de absorción de agua los ABs liofilizados tenían un comportamiento favorable para la IT. La prueba de biomineralización demostró que todos tenían potencial para el cultivo de tejidos óseo, en mayor o menor medida.

4.2. Recomendaciones

- Realizar pruebas de biodegradabilidad basadas en la variación de pH para complementar los resultados obtenidos mediante la medición de la variación de pesos.
- Combinar la bioimpresión 3D con otros métodos de reticulación, de preferencia físicos, como la liofilización o explorar otros métodos de bioimpresión como la estereolitografía o micro-goteo.
- Determinar las características reológicas a las soluciones de las soluciones para facilitar la calibración de la impresora, al conocer a que temperatura gelatiniza, que presión se debe ejercer según su viscosidad y a que temperatura se debe mantener en el extrusor para que permanezca líquido y no tape la aguja de impresión.
- Realizar pruebas antimicrobianas a los ABs para tener un mejor entendimiento de sus características biológicas y determinar su utilidad al momento de tratar a pacientes con heridas que están o podrían estar infectad

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aaliya, B., Sunooj, K. V., & Lackner, M. (2021). Biopolymer composites: A review. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 40-84. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1881214>
- 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>
- Aguilar, A., Zein, N., Harmouch, E., Hafdi, B., Bornert, F., Offner, D., Clauss, F., Fioretti, F., Huck, O., Benkirane-Jessel, N., & Hua, G. (2019). Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. *Molecules*, 24(16), 3009. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
- Akca, G., Özdemir, A., Öner, Z. G., & Şenel, S. (2018). Comparison of different types and sources of chitosan for the treatment of infections in the oral cavity. *Research on Chemical Intermediates*, 44(8), 4811-4825. <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3338-8>
- Alonzo, M., Alvarez Primo, F., Anil Kumar, S., Mudloff, J. A., Dominguez, E., Fregoso, G., Ortiz, N., Weiss, W. M., & Joddar, B. (2021). Bone tissue engineering techniques, advances, and scaffolds for treatment of bone defects. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 17, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2020.100248>
- Auger, F. A., Gibot, L., & Lacroix, D. (2013). The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15(1), 177-200. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152428>
- Augustine, R., Dalvi, Y. B., Yadu Nath, V. K., Varghese, R., Raghuv eeran, V., Hasan, A., Thomas, S., & Sandhyarani, N. (2019). Yttrium oxide nanoparticle loaded scaffolds with enhanced cell adhesion and vascularization for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109801.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109801>

- Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *17*(1), 20-26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>
- Azevedo, H. S., & Pashkuleva, I. (2015). Biomimetic supramolecular designs for the controlled release of growth factors in bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *94*, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.08.003>
- Bartoš, M., Suchý, T., & Foltán, R. (2018). Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: What do we measure? *BioMedical Engineering OnLine*, *17*(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12938-018-0543-z>
- Bastiaens, L., Soetemans, L., D'Hondt, E., & Elst, K. (2019). Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation. En L. A. M. Broek & C. G. Boeriu (Eds.), *Chitin and Chitosan* (1.^a ed., pp. 1-34). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119450467.ch1>
- Burton, T. P., & Callanan, A. (2018). A Non-woven Path: Electrospun Poly(lactic acid) Scaffolds for Kidney Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *15*(3), 301-310. <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0107-5>
- Cao, J., Wang, P., Liu, Y., Zhu, C., & Fan, D. (2020). Double crosslinked HLC-CCS hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *155*, 625-635. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.236>
- Carluccio, D., Demir, A. G., Bermingham, M. J., & Dargusch, M. S. (2020). Challenges and Opportunities in the Selective Laser Melting of Biodegradable Metals for Load-Bearing Bone Scaffold Applications. *Metallurgical and Materials Transactions A*, *51*(7), 3311-3334. <https://doi.org/10.1007/s11661-020-05796-z>
- Carotenuto, F., Politi, S., Ul Haq, A., De Matteis, F., Tamburri, E., Terranova, M. L., Teodori, L., Pasquo, A., & Di Nardo, P. (2022). From Soft to Hard Biomimetic Materials: Tuning Micro/Nano-Architecture of Scaffolds for Tissue Regeneration. *Micromachines*, *13*(5), 780. <https://doi.org/10.3390/mi13050780>
- Cescon, M., Gattazzo, F., Chen, P., & Bonaldo, P. (2015). Collagen VI at a glance. *Journal of Cell Science*, jcs.169748. <https://doi.org/10.1242/jcs.169748>

- Charoo, N. A., Barakh Ali, S. F., Mohamed, E. M., Kuttolamadom, M. A., Ozkan, T., Khan, M. A., & Rahman, Z. (2020). Selective laser sintering 3D printing – an overview of the technology and pharmaceutical applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *46*(6), 869-877. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1764027>
- Chen, Y., Udduttula, A., Xie, X., Zhou, M., Sheng, W., Yu, F., Weng, J., Wang, D., Teng, B., Manivasagam, G., Zhang, J. V., Ren, P.-G., Kang, B., & Zeng, H. (2021). A novel photocrosslinked phosphate functionalized Chitosan-Sr5(PO4)2SiO4 composite hydrogels and in vitro biomineralization, osteogenesis, angiogenesis for bone regeneration application. *Composites Part B: Engineering*, *222*, 109057. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2021.109057>
- Cheng, Y.-L., & Hsu, Y.-J. (2018). Synthesis and characterization of photopolymerizable triblocks for 3D printing tissue engineering scaffolds. *Journal of the Chinese Institute of Engineers*, *41*(3), 259-267. <https://doi.org/10.1080/02533839.2018.1454856>
- Diamantides, N., Wang, L., Pruiksma, T., Siemiatkoski, J., Dugopolski, C., Shortkroff, S., Kennedy, S., & Bonassar, L. J. (2017). Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication*, *9*(3), 034102. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa780f>
- Dintcheva, N. T., Infurna, G., Baiamonte, M., & D'Anna, F. (2020). Natural Compounds as Sustainable Additives for Biopolymers. *Polymers*, *12*(4), 732. <https://doi.org/10.3390/polym12040732>
- Dzobo, K., Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Shipanga, H., Rowe, A., Dandara, C., Pillay, M., & Motaung, K. S. C. M. (2018). Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells International*, *2018*, e2495848. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>
- Ebhodaghe, S. O. (2021). Natural Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *32*(16), 2144-2194. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1958185>
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials*

- Science and Engineering*, 2019, e3429527. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Fassini, D., Wilkie, I. C., Pozzolini, M., Ferrario, C., Sugni, M., Rocha, M. S., Giovine, M., Bonasoro, F., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2021). Diverse and Productive Source of Biopolymer Inspiration: Marine Collagens. *Biomacromolecules*, 22(5), 1815-1834. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00013>
- Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Zakir Hossain, K. M., Roberts, G. A. F., & Grant, D. M. (2019). Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, 204, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.002>
- Ferraris, S., Yamaguchi, S., Barbani, N., Cazzola, M., Cristallini, C., Miola, M., Vernè, E., & Spriano, S. (2020). Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation. *Acta Biomaterialia*, 102, 468-480. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.024>
- Fischetti, T., Celikkin, N., Contessi Negrini, N., Farè, S., & Swieszkowski, W. (2020). Tripolyphosphate-Crosslinked Chitosan/Gelatin Biocomposite Ink for 3D Printing of Uniaxial Scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00400>
- Gao, G., & Cui, X. (2016). Three-dimensional bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine. *Biotechnology Letters*, 38(2), 203-211. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1975-1>
- Garakani, S. S., Khanmohammadi, M., Atoufi, Z., Kamrava, S. K., Setayeshmehr, M., Alizadeh, R., Faghihi, F., Bagher, Z., Davachi, S. M., & Abbaspourrad, A. (2020). Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 533-545. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.040>
- Gholizadeh, S., Moztarzadeh, F., Haghhighipour, N., Ghazizadeh, L., Baghbani, F., Shokrgozar, M. A., & Allahyari, Z. (2017). Preparation and characterization of novel functionalized multiwalled carbon nanotubes/chitosan/ β -Glycerophosphate scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.086>
- Grabska-Zielińska, S., Sionkowska, A., Carvalho, Â., & Monteiro, F. J. (2021).

- Biomaterials with Potential Use in Bone Tissue Regeneration—Collagen/Chitosan/Silk Fibroin Scaffolds Cross-Linked by EDC/NHS. *Materials*, 14(5), 1105. <https://doi.org/10.3390/ma14051105>
- Guan, N., Liu, Z., Zhao, Y., Li, Q., & Wang, Y. (2020). Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Delivery*, 27(1), 1438-1451. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1831104>
- Han, F., Wang, J., Ding, L., Hu, Y., Li, W., Yuan, Z., Guo, Q., Zhu, C., Yu, L., Wang, H., Zhao, Z., Jia, L., Li, J., Yu, Y., Zhang, W., Chu, G., Chen, S., & Li, B. (2020). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.00083>
- Hassan, M. E., Bai, J., & Dou, D.-Q. (2019). Biopolymers; Definition, Classification and Applications. *Egyptian Journal of Chemistry*, 62(9), 1725-1737. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.6967.1580>
- Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F., & Perale, G. (2019). Bone grafts: Which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*, 46(S21), 92-102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>
- Hauser, P. V., Chang, H.-M., Nishikawa, M., Kimura, H., Yanagawa, N., & Hamon, M. (2021). Bioprinting Scaffolds for Vascular Tissues and Tissue Vascularization. *Bioengineering*, 8(11), 178. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110178>
- He, Y., Hou, Z., Wang, J., Wang, Z., Li, X., Liu, J., XiaolinYang, Liang, Q., & Zhao, J. (2020). Assessment of biological properties of recombinant collagen-hyaluronic acid composite scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 1275-1284. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.023>
- Heidenreich, A. C., Pérez-Recalde, M., González Wusener, A., & Hermida, É. B. (2020). Collagen and chitosan blends for 3D bioprinting: A rheological and printability approach. *Polymer Testing*, 82, 106297. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106297>
- Horvath, J., & Cameron, R. (2018). *Mastering 3D Printing in the Classroom, Library, and Lab*. Apress.
- Hu, J., Wang, Z., Miszuk, J. M., Zhu, M., Lansakara, T. I., Tivanski, A. V., Banas, J. A.,

- & Sun, H. (2021). Vanillin-bioglass cross-linked 3D porous chitosan scaffolds with strong osteopromotive and antibacterial abilities for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 271, 118440. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118440>
- Inci, I., Norouz Dizaji, A., Ozel, C., Morali, U., Dogan Guzel, F., & Avci, H. (2020). Decellularized inner body membranes for tissue engineering: A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31(10), 1287-1368. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1751523>
- Irawan, V., Sung, T.-C., Higuchi, A., & Ikoma, T. (2018). Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(6), 673-697. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0135-9>
- Iron, R., Mehdikhani, M., Naghashzargar, E., Karbasi, S., & Semnani, D. (2019). Effects of nano-bioactive glass on structural, mechanical and bioactivity properties of Poly (3-hydroxybutyrate) electrospun scaffold for bone tissue engineering applications. *Materials Technology*, 34(9), 540-548. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1591728>
- Islam, Md. M., Shahruzzaman, Md., Biswas, S., Nurus Sakib, Md., & Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*, 5(1), 164-183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
- Januariyasa, I. K., & Yusuf, Y. (2020). Porous carbonated hydroxyapatite-based scaffold using simple gas foaming method. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 8(3), 634-641. <https://doi.org/10.1080/21870764.2020.1770938>
- Jiang, Z., Zhang, K., Du, L., Cheng, Z., Zhang, T., Ding, J., Li, W., Xu, B., & Zhu, M. (2021). Construction of chitosan scaffolds with controllable microchannel for tissue engineering and regenerative medicine. *Materials Science and Engineering: C*, 126, 112178. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112178>
- Kaczmarek, B., & Sionkowska, A. (2018). Chitosan/collagen blends with inorganic and organic additive-A review. *Advances in Polymer Technology*, 37(6), 2367-2376. <https://doi.org/10.1002/adv.21912>

- Kaczmarek, B., Sionkowska, A., Gołyńska, M., Polkowska, I., Szponder, T., Nehrbass, D., & Osyczka, A. M. (2018). In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 938-944. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.175>
- Kaczmarek, B., Sionkowska, A., & Osyczka, A. M. (2018). Scaffolds based on chitosan and collagen with glycosaminoglycans cross-linked by tannic acid. *Polymer Testing*, *65*, 163-168. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.11.026>
- Kang, Y., & Chang, J. (2018). Channels in a porous scaffold: A new player for vascularization. *Regenerative Medicine*, *13*(6), 705-715. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0022>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Khan, M. U. A., Al-Thebaiti, M. A., Hashmi, M. U., Aftab, S., Abd Razak, S. I., Abu Hassan, S., Abdul Kadir, M. R., & Amin, R. (2020). Synthesis of Silver-Coated Bioactive Nanocomposite Scaffolds Based on Grafted Beta-Glucan/Hydroxyapatite via Freeze-Drying Method: Anti-Microbial and Biocompatibility Evaluation for Bone Tissue Engineering. *Materials*, *13*(4), 971. <https://doi.org/10.3390/ma13040971>
- Khodaei, M., Amini, K., & Valanezhad, A. (2020). Fabrication and Characterization of Poly Lactic Acid Scaffolds by Fused Deposition Modeling for Bone Tissue Engineering. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, *35*(1), 248-251. <https://doi.org/10.1007/s11595-020-2250-4>
- Khoramgah, M. S., Ranjbari, J., Abbaszadeh, H.-A., Tabatabaei Mirakabad, F. S., Hatami, S., Hosseinzadeh, S., & Ghanbarian, H. (2020). Freeze-dried multiscale porous nanofibrous three dimensional scaffolds for bone regenerations. *BioImpacts : BI*, *10*(2), 73-85. <https://doi.org/10.34172/bi.2020.10>
- Kielty, C. M., & Grant, M. E. (2002). The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. En P. M. Royce & B. Steinmann (Eds.), *Connective Tissue and Its Heritable Disorders* (pp. 159-221). John Wiley & Sons,

- Inc. <https://doi.org/10.1002/0471221929.ch2>
- Kim, H. N., & Choi, N. (2019). Consideration of the Mechanical Properties of Hydrogels for Brain Tissue Engineering and Brain-on-a-chip. *BioChip Journal*, 13(1), 8-19. <https://doi.org/10.1007/s13206-018-3101-7>
- Kim, M., Choe, Y., & Kim, G. (2019). Injectable hierarchical micro/nanofibrous collagen-based scaffolds. *Chemical Engineering Journal*, 365, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.044>
- Kniebs, C., Kreimendahl, F., Köpf, M., Fischer, H., Jockenhoevel, S., & Thiebes, A. L. (2020). Influence of Different Cell Types and Sources on Pre-Vascularisation in Fibrin and Agarose–Collagen Gels. *Organogenesis*, 16(1), 14-26. <https://doi.org/10.1080/15476278.2019.1697597>
- Koons, G. L., Diba, M., & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(8), 584-603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
- 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>
- Kumar, N., Desagani, D., Chandran, G., Ghosh, N. N., Karthikeyan, G., Waigaonkar, S., & Ganguly, A. (2018). Biocompatible agarose-chitosan coated silver nanoparticle composite for soft tissue engineering applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(3), 637-649. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1337021>
- Kumar, P., Dehiya, B. S., & Sindhu, A. (2017). Comparative study of chitosan and chitosan–gelatin scaffold for tissue engineering. *International Nano Letters*, 7(4), 285-290. <https://doi.org/10.1007/s40089-017-0222-2>
- 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*, 9(3), 1173-1182. <https://doi.org/10.1080/21870764.2021.1946269>
- Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2017). Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*, 35(2), 133-144. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.004>
- Leal-Marín, S., Kern, T., Hofmann, N., Pogozhykh, O., Framme, C., Börgel, M., Figueiredo, C., Glasmacher, B., & Gryshkov, O. (2021). Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(8), 1198-1215. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34782>
- Lee, S. J., Yoo, J. J., & Atala, A. (2018). Biomaterials and Tissue Engineering. En B. W. Kim (Ed.), *Clinical Regenerative Medicine in Urology* (pp. 17-51). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2723-9_2
- Leung, L. L. K., & Morser, J. (2018). Carboxypeptidase B2 and carboxypeptidase N in the crosstalk between coagulation, thrombosis, inflammation, and innate immunity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(8), 1474-1486. <https://doi.org/10.1111/jth.14199>
- Li, Y., He, Q., Hu, X., Liu, Y., Cheng, X., Li, X., & Deng, F. (2017). Improved performance of collagen scaffolds crosslinked by Traut's reagent and Sulfo-SMCC. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(7), 629-647. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1291296>
- Lima, C. C., Silva, T. D., Santos, L., Nakagaki, W. R., Loyola, Y. C. S., Resck, M. C. C., Camilli, J. A., Soares, E. A., & Garcia, J. a. D. (2011). Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Brazilian Journal of Biology*, 71, 115-119. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000100017>
- Lin, Z., Wu, M., He, H., Liang, Q., Hu, C., Zeng, Z., Cheng, D., Wang, G., Chen, D., Pan, H., & Ruan, C. (2019). 3D Printing of Mechanically Stable Calcium-Free Alginate-Based Scaffolds with Tunable Surface Charge to Enable Cell Adhesion and Facile Biofunctionalization. *Advanced Functional Materials*, 29(9), 1808439. <https://doi.org/10.1002/adfm.201808439>
- Liu, B., Li, J., Lei, X., Cheng, P., Song, Y., Gao, Y., Hu, J., Wang, C., Zhang, S., Li, D.,

- Wu, H., Sang, H., Bi, L., & Pei, G. (2020). 3D-bioprinted functional and biomimetic hydrogel scaffolds incorporated with nanosilicates to promote bone healing in rat calvarial defect model. *Materials Science and Engineering: C*, *112*, 110905. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110905>
- Liu, H., Wang, Y., Cui, K., Guo, Y., Zhang, X., & Qin, J. (2019). Advances in Hydrogels in Organoids and Organs-on-a-Chip. *Advanced Materials*, *31*(50), 1902042. <https://doi.org/10.1002/adma.201902042>
- Liu, Y., Lv, Y., An, M., Li, F., Lu, Y., & Song, J. (2019). Characterization of Chitosan-Gelatin Blend Scaffolds. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, *58*(7), 634-644. <https://doi.org/10.1080/00222348.2019.1615688>
- Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2016). Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials*, *2016*, e9825659. <https://doi.org/10.1155/2016/9825659>
- Malladi, L., Mahapatro, A., & Gomes, A. S. (2018). Fabrication of magnesium-based metallic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Technology*, *33*(2), 173-182. <https://doi.org/10.1080/10667857.2017.1404278>
- Martínez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N., & Cameron, R. E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate Polymers*, *132*, 606-619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.084>
- Mehboob, A., Mehboob, H., & Chang, S.-H. (2020). Evaluation of unidirectional BGF/PLA and Mg/PLA biodegradable composites bone plates-scaffolds assembly for critical segmental fractures healing. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *135*, 105929. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2020.105929>
- Meng, L., Xie, F., Zhang, B., Wang, D. K., & Yu, L. (2019). Natural Biopolymer Alloys with Superior Mechanical Properties. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *7*(2), 2792-2802. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06009>
- Nadernezhad, A., Caliskan, O. S., Topuz, F., Afghah, F., Erman, B., & Koc, B. (2019). Nanocomposite Bioinks Based on Agarose and 2D Nanosilicates with Tunable Flow Properties and Bioactivity for 3D Bioprinting. *ACS Applied Bio Materials*, *2*(2),

796-806. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00665>

- Nagarajan, S., Radhakrishnan, S., Kalkura, S. N., Balme, S., Miele, P., & Bechelany, M. (2019). Overview of Protein-Based Biopolymers for Biomedical Application. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220(14), 1900126. <https://doi.org/10.1002/macp.201900126>
- Naomi, R., Ridzuan, P. M., & Bahari, H. (2021). Current Insights into Collagen Type I. *Polymers*, 13(16), 2642. <https://doi.org/10.3390/polym13162642>
- Ng, H.-M., Bee, S.-T., Tin Sin, L., Ratnam, C. T., & Rahmat, A. R. (2019). Hydroxyapatite For Poly(α -Hydroxy Esters) Biocomposites Applications. *Polymer Reviews*, 59(2), 187-239. <https://doi.org/10.1080/15583724.2018.1488729>
- Nga, N. K., Thanh Tam, L. T., Ha, N. T., Hung Viet, P., & Huy, T. Q. (2020). Enhanced biomineralization and protein adsorption capacity of 3D chitosan/hydroxyapatite biomimetic scaffolds applied for bone-tissue engineering. *RSC Advances*, 10(70), 43045-43057. <https://doi.org/10.1039/D0RA09432C>
- Nguyen, V.-T., Oh, G.-W., Heo, S.-Y., Ko, S.-C., Kim, C. S., Park, W. S., Choi, I.-W., & Jung, W.-K. (2021). 3D PCL/fish collagen composite scaffolds incorporating osteogenic abalone protein hydrolysates for bone regeneration application: *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32(3), 355-371. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1834908>
- Nocera, A. D., Comín, R., Salvatierra, N. A., & Cid, M. P. (2018). Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical Microdevices*, 20(2), 26. <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0270-z>
- Nurfriana, P., Widiyanti, P., & Rudyardjo, D. I. (2019). Effect of Collagen-Chitosan-Glycerol Composition in Scaffold for Gingival Recession Therapy. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, 40, 101-108. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBBE.40.101>
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., & Oyen, M. L. (2016). Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 41, 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.05.024>
- Oliveira, É. R., Nie, L., Podstawczyk, D., Allahbakhsh, A., Ratnayake, J., Brasil, D. L., &

- Shavandi, A. (2021). Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 903. <https://doi.org/10.3390/ijms22020903>
- Ortuño-Costela, M. del C., García-López, M., Cerrada, V., & Gallardo, M. E. (2019). iPSCs: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(6), 3784-3794. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14292>
- Osidak, E. O., Karalkin, P. A., Osidak, M. S., Parfenov, V. A., Sivogrivov, D. E., Pereira, F. D. A. S., Gryadunova, A. A., Koudan, E. V., Khesuani, Y. D., Kasyanov, V. A., Belousov, S. I., Krashennnikov, S. V., Grigoriev, T. E., Chvalun, S. N., Bulanova, E. A., Mironov, V. A., & Domogatsky, S. P. (2019). Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(3), 31. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6233-y>
- Pa'ee, K. F., Razali, N., Sarbini, S. R., Ramonaran Nair, S. N., Yong Tau Len, K., & Abd-Talib, N. (2021). The production of collagen type I hydrolyzate derived from tilapia (*Oreochromis sp.*) skin using thermoase PC10F and its in silico analysis. *Food Biotechnology*, 35(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/08905436.2020.1869040>
- Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019). Chapter 8—Collagen as a potential biopolymer for the production of porous matrices (scaffolds) with application in tissue engineering. En V. Grumezescu & A. M. Grumezescu (Eds.), *Materials for Biomedical Engineering* (pp. 217-244). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818415-8.00008-5>
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019). Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 262-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.198>
- 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>
- Qi, X., Su, T., Zhang, M., Tong, X., Pan, W., Zeng, Q., Zhou, Z., Shen, L., He, X., & Shen, J. (2020). Macroporous Hydrogel Scaffolds with Tunable Physicochemical

- Properties for Tissue Engineering Constructed Using Renewable Polysaccharides. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(11), 13256-13264. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b20794>
- Qu, H., Fu, H., Han, Z., & Sun, Y. (2019). Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances*, 9(45), 26252-26262. <https://doi.org/10.1039/C9RA05214C>
- Qu, M., Jiang, X., Zhou, X., Wang, C., Wu, Q., Ren, L., Zhu, J., Zhu, S., Tebon, P., Sun, W., & Khademhosseini, A. (2020). Stimuli-Responsive Delivery of Growth Factors for Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 9(7), 1901714. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901714>
- Radhika Rajasree, S. R., Gobalakrishnan, M., Aranganathan, L., & Karthih, M. G. (2020). Fabrication and characterization of chitosan based collagen/ gelatin composite scaffolds from big eye snapper *Priacanthus hamrur* skin for antimicrobial and anti oxidant applications. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110270. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110270>
- Radwan-Pragłowska, J., Piątkowski, M., Kitala, D., Janus, Ł., Klama-Baryła, A., Łabuś, W., Tomanek, E., Glik, J., Matysek, D., Bogdał, D., & Kawecki, M. (2019). Microwave-assisted synthesis and characterization of bioactive chitosan scaffolds doped with Au nanoparticles for mesenchymal stem cells culture. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68(7), 351-359. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1445632>
- Ravaglioli, A., Krajewski, A., Baldi, G., Tateo, F., Peruzzo, L., & Piancastelli, A. (2008). Glass–ceramic scaffolds for tissue engineering. *Advances in Applied Ceramics*, 107(5), 268-273. <https://doi.org/10.1179/174367608X341488>
- Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*, 13(7), 1105. <https://doi.org/10.3390/polym13071105>
- Reys, L. L., Silva, S. S., Pirraco, R. P., Marques, A. P., Mano, J. F., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2017). Influence of freezing temperature and deacetylation degree on the performance of freeze-dried chitosan scaffolds towards cartilage tissue engineering. *European Polymer Journal*, 95, 232-240.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.08.017>

- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978-a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rnjak-Kovacina, J., Gerrand, Y., Wray, L. S., Tan, B., Joukhdar, H., Kaplan, D. L., Morrison, W. A., & Mitchell, G. M. (2019). Vascular Pedicle and Microchannels: Simple Methods Toward Effective In Vivo Vascularization of 3D Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, 8(24), 1901106. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901106>
- Roshandel, M., & Dorkoosh, F. (2021). Cardiac tissue engineering, biomaterial scaffolds, and their fabrication techniques. *Polymers for Advanced Technologies*, 32(6), 2290-2305. <https://doi.org/10.1002/pat.5273>
- Ruiz-Alonso, S., Lafuente-Merchan, M., Ciriza, J., Saenz-del-Burgo, L., & Pedraz, J. L. (2021). Tendon tissue engineering: Cells, growth factors, scaffolds and production techniques. *Journal of Controlled Release*, 333, 448-486. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.040>
- Saravanan, S., Leena, R. S., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1354-1365. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>
- Satish Kumar, T., Vijaya Ramu, D., & Sampath Kumar, N. S. (2019). Preparation and characterization of biodegradable collagen – Chitosan scaffolds. *Materials Today: Proceedings*, 19, 2587-2590. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.10.091>
- Schipani, R., Nolan, D. R., Lally, C., & Kelly, D. J. (2020). Integrating finite element modelling and 3D printing to engineer biomimetic polymeric scaffolds for tissue engineering. *Connective Tissue Research*, 61(2), 174-189. <https://doi.org/10.1080/03008207.2019.1656720>
- Sheikholeslam, M., Wright, M. E. E., Cheng, N., Oh, H. H., Wang, Y., Datu, A. K., Santerre, J. P., Amini-Nik, S., & Jeschke, M. G. (2020). Electrospun Polyurethane–Gelatin Composite: A New Tissue-Engineered Scaffold for Application in Skin Regeneration and Repair of Complex Wounds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(1), 505-516. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00861>
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review*

of *biochemistry*, 78, 929-958.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

- Sofi, H. S., Ashraf, R., Beigh, M. A., & Sheikh, F. A. (2018). Scaffolds Fabricated from Natural Polymers/Composites by Electrospinning for Bone Tissue Regeneration. En H. J. Chun, C. H. Park, I. K. Kwon, & G. Khang (Eds.), *Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine* (Vol. 1078, pp. 49-78). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0950-2_4
- Srivastava, M., Ahlawat, N., & Srivastava, A. (2018). Amniotic Fluid Stem Cells: A New Era in Regenerative Medicine. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*, 68(1), 15-19. <https://doi.org/10.1007/s13224-017-1034-z>
- Sun, Y., Yang, C., Zhu, X., Wang, J., Liu, X., Yang, X., An, X., Liang, J., Dong, H., Jiang, W., Chen, C., Wang, Z., Sun, H., Tu, Y., Zhang, S., Chen, F., & Li, X. (2019). 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(9), 1898-1908. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36675>
- Sundar, G., Joseph, J., C, P., John, A., & Abraham, A. (2020). Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: A critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(9), 593-604. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1740991>
- Szustakiewicz, K., Gazińska, M., Kryszak, B., Grzymajło, M., Pięłowski, J., Wiglusz, R. J., & Okamoto, M. (2019). The influence of hydroxyapatite content on properties of poly(L-lactide)/hydroxyapatite porous scaffolds obtained using thermal induced phase separation technique. *European Polymer Journal*, 113, 313-320. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.01.073>
- Tan, G. Z., & Zhou, Y. (2020). Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(15), 947-960. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1636248>
- Tan, Y., Fei, D., He, X., Dai, J., Xu, R., Xu, X., Wu, J., & Li, B. (2019). L-type voltage-gated calcium channels in stem cells and tissue engineering. *Cell Proliferation*, 52(4). <https://doi.org/10.1111/cpr.12623>
- Ullah, S., Zainol, I., Chowdhury, S. R., & Fauzi, M. B. (2018). Development of various

- composition multicomponent chitosan/fish collagen/glycerin 3D porous scaffolds: Effect on morphology, mechanical strength, biostability and cytocompatibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.136>
- Wang, L., Zhao, Y., Yang, F., Feng, M., Zhao, Y., Chen, X., Mi, J., Yao, Y., Guan, D., Xiao, Z., Chen, B., & Dai, J. (2020). Biomimetic collagen biomaterial induces in situ lung regeneration by forming functional alveolar. *Biomaterials*, *236*, 119825. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119825>
- Willerth, S. (2017). Chapter 6—Synthetic biomaterials for engineering neural tissue from stem cells. En S. Willerth (Ed.), *Engineering Neural Tissue from Stem Cells* (pp. 127-158). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811385-1.00006-6>
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J., & Werb, Z. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nature Communications*, *11*(1), 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>
- Winnett, J., Jumbu, N., Cox, S., Gibbons, G., Grover, L. M., Warnett, J., Williams, M. A., Dancer, C. E. J., & Mallick, K. K. (2022). In-vitro viability of bone scaffolds fabricated using the adaptive foam reticulation technique. *Biomaterials Advances*, 212766. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212766>
- Wrobel, D., Marcinkowska, M., Janaszewska, A., Appelhans, D., Voit, B., Klajnert-Maculewicz, B., Bryszewska, M., Štofik, M., Herma, R., Duchnowicz, P., & Maly, J. (2017). Influence of core and maltose surface modification of PEIs on their interaction with plasma proteins—Human serum albumin and lysozyme. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *152*, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.042>
- Xu, J., Fang, H., Zheng, S., Li, L., Jiao, Z., Wang, H., Nie, Y., Liu, T., & Song, K. (2021). A biological functional hybrid scaffold based on decellularized extracellular matrix/gelatin/chitosan with high biocompatibility and antibacterial activity for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *187*, 840-849. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.162>
- Yan, J., Chen, R., Zhang, H., & Bryers, J. D. (2019). Injectable Biodegradable Chitosan-Alginate 3D Porous Gel Scaffold for mRNA Vaccine Delivery. *Macromolecular*

- Bioscience*, 19(2), 1800242. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800242>
- Yang, B., Liu, T., Gao, G., Zhang, X., & Wu, B. (2022). Fabrication of 3D GelMA Scaffolds Using Agarose Microgel Embedded Printing. *Micromachines*, 13(3), 469. <https://doi.org/10.3390/mi13030469>
- Zaharin, H., Abdul Rani, A., Azam, F., Ginta, T., Sallih, N., Ahmad, A., Yunus, N., & Zulkifli, T. (2018). Effect of Unit Cell Type and Pore Size on Porosity and Mechanical Behavior of Additively Manufactured Ti6Al4V Scaffolds. *Materials*, 11(12), 2402. <https://doi.org/10.3390/ma11122402>
- Zambon, J. P., Atala, A., & Yoo, J. J. (2020). Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications. *Methods*, 171, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.09.016>
- Zhang, F., & King, M. W. (2020). Biodegradable Polymers as the Pivotal Player in the Design of Tissue Engineering Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, 9(13), 1901358. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901358>
- Zhang, S., Vijayavenkataraman, S., Lu, W. F., & Fuh, J. Y. H. (2019). A review on the use of computational methods to characterize, design, and optimize tissue engineering scaffolds, with a potential in 3D printing fabrication. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(5), 1329-1351. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34226>
- Zhou, L., Ramezani, H., Sun, M., Xie, M., Nie, J., Lv, S., Cai, J., Fu, J., & He, Y. (2020). 3D printing of high-strength chitosan hydrogel scaffolds without any organic solvents. *Biomaterials Science*, 8(18), 5020-5028. <https://doi.org/10.1039/D0BM00896F>
- Zhu, G., Zhang, T., Chen, M., Yao, K., Huang, X., Zhang, B., Li, Y., Liu, J., Wang, Y., & Zhao, Z. (2021). Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*, 6(11), 4110-4140. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.043>
- Zou, Y., Zhang, L., Yang, L., Zhu, F., Ding, M., Lin, F., Wang, Z., & Li, Y. (2018). "Click" chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 273, 160-179. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.023>

ANEXOS

Anexo 1. Pesos obtenidos para el cálculo de porosidad

Tiempo	Bioimpresión 3D (g)			Liofilización (g)		
	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
0 horas	0,0806	0,0932	0,0702	0,0154	0,0170	0,0143
	0,1392	0,0793	0,0998	0,0209	0,0118	0,0113
	0,1875	0,1061	0,0993	0,0178	0,0118	0,0113
24 horas	0,0987	0,1035	0,072	0,2338	0,2420	0,2065
	0,175	0,0857	0,106	0,2161	0,1107	0,1973
	0,232	0,1183	0,101	0,2139	0,2469	0,3130

Anexo 2. Resultados porosidad con replicas

Quitosano/Colágeno	Bioimpresión (%)		Quitosano/Colágeno	Liofilización (%)	
	Colágeno	Quitosano		Colágeno	Quitosano
20,2688	31,6436	2,1978	71,0475	91,0010	68,3499
28,3990	22,3386	6,7086	68,6840	81,6343	67,6364
28,7544	21,5168	2,1978	68,7829	91,3542	77,2204

Anexo 3. Resultados porosidad promedio

Quitosano/Colágeno	Bioimpresión (%)		Quitosano/Colágeno	Liofilización (%)	
	Colágeno	Quitosano		Colágeno	Quitosano
25,8074	25,1663	3,7014	69,5048	87,9965	71,0689

Anexo 4. Desviación estándar de la porosidad

Quitosano/Colágeno	Bioimpresión		Quitosano/Colágeno	Liofilización	
	Colágeno	Quitosano		Colágeno	Quitosano
3,9191	4,5924	2,1264	1,0916	4,5010	4,3595

Anexo 5. Pesos obtenidos para el cálculo de capacidad de absorción de agua

Tiempo	Bioimpresión 3D (g)			Liofilización (g)		
	Qitosano /Colágeno	Colágeno	Qitosano	Qitosano /Colágeno	Colágeno	Qitosano
0:00	0,0598	0,0942	0,0583	0,0137	0,0163	0,0125
	0,1146	0,099	0,0739	0,0168	0,0093	0,0136
	0,0537	0,0951	0,0673	0,0094	0,0136	0,0091
0:30	0,0932	0,1162	0,0912	0,4272	0,1409	0,4648
	0,1736	0,1326	0,0793	0,4757	0,1371	0,5294
	0,0945	0,1275	0,0864	0,2628	0,2657	0,3813
1:00	0,0954	0,1088	0,0963	0,4931	0,1890	0,5491
	0,1664	0,1172	0,0806	0,4964	0,1588	0,5951
	0,0905	0,1128	0,0859	0,2274	0,2019	0,379
1:30	0,0979	0,1164	0,0938	0,5171	0,1322	0,6085
	0,1867	0,1310	0,0786	0,5028	0,1564	0,5881
	0,1064	0,1167	0,0872	0,2794	0,2462	0,3493
2:00	0,1005	0,1153	0,0862	0,5182	0,1735	0,6260
	0,1814	0,1342	0,0858	0,5315	0,173	0,6063
	0,0971	0,1217	0,0895	0,2786	0,2498	0,3894
2:30	0,0973	0,1147	0,0972	0,5426	0,142	0,5997
	0,1686	0,1251	0,0894	0,5397	0,179	0,6290
	0,0915	0,1236	0,0901	0,2885	0,2437	0,4107
3:00	0,1024	0,1176	0,1039	0,4971	0,1631	0,6046
	0,1838	0,1324	0,0915	0,5307	0,168	0,6563
	0,0887	0,1237	0,0886	0,2434	0,2543	0,3734
3:30	0,1048	0,1162	0,0994	0,4958	0,1424	0,6315
	0,1796	0,1289	0,0874	0,5579	0,1458	0,6745
	0,0968	0,1264	0,0867	0,2403	0,2447	0,3852
4:00	0,1017	0,1193	0,1062	0,4906	0,1809	0,626
	0,1868	0,1412	0,0933	0,5338	0,1600	0,6962
	0,1003	0,1284	0,0924	0,2268	0,2587	0,3783
4:30	0,1078	0,1217	0,1127	0,4795	0,1700	0,6616
	0,1903	0,1358	0,0824	0,5525	0,1593	0,7144
	0,0961	0,1263	0,0958	0,2261	0,2646	0,3997
5:00	0,1094	0,1203	0,1195	0,4920	0,1491	0,621
	0,1937	0,1438	0,0856	0,5700	0,1766	0,7104
	0,0952	0,1310	0,0896	0,2304	0,2651	0,4063

5:30	0,1107	0,1193	0,1102	0,4199	0,155	0,6378
	0,1896	0,1386	0,0885	0,5086	0,2139	0,7121
	0,0920	0,1293	0,0923	0,2895	0,2696	0,4154
6:00	0,1100	0,1228	0,1189	0,4285	0,1871	0,652
	0,1955	0,145	0,0909	0,4424	0,1968	0,7338
	0,0902	0,1306	0,097	0,2305	0,2872	0,4075

Anexo 6. Resultados capacidad de absorción de agua con replicas.

Tiempo	Bioimpresión 3D (g/g)			Liofilización (g/g)		
	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
0:00	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0:30	0,5585	0,2335	0,5643	30,1825	7,6442	36,1840
	0,5148	0,3394	0,0731	27,3155	13,7419	37,9265
	0,7598	0,3407	0,2838	26,9574	18,5368	40,9011
1:00	0,5953	0,1550	0,6518	34,9927	10,5951	42,9280
	0,4520	0,1838	0,0907	28,5476	16,0753	42,7574
	0,6853	0,1861	0,2764	23,1915	13,8456	40,6484
1:30	0,6371	0,2357	0,6089	36,7445	7,1104	47,6800
	0,6291	0,3232	0,0636	28,9286	15,8172	42,2426
	0,9814	0,2271	0,2957	28,7234	17,1029	37,3846
2:00	0,6806	0,2240	0,4786	36,8248	9,6442	49,0800
	0,5829	0,3556	0,1610	30,6369	17,6022	43,5809
	0,8082	0,2797	0,3299	28,6383	17,3676	41,7912
2:30	0,6271	0,2176	0,6672	38,6058	7,7117	46,9760
	0,4712	0,2636	0,2097	31,1250	18,2473	45,2500
	0,7039	0,2997	0,3388	29,6915	16,9191	44,1319
3:00	0,7124	0,2484	0,7822	35,2847	9,0061	47,3680
	0,6038	0,3374	0,2382	30,5893	17,0645	47,2574
	0,6518	0,3007	0,3165	24,8936	17,6985	40,0330
3:30	0,7525	0,2335	0,7050	35,1898	7,7362	49,5200
	0,5672	0,3020	0,1827	32,2083	14,6774	48,5956
	0,8026	0,3291	0,2883	24,5638	16,9926	41,3297
4:00	0,7007	0,2665	0,8216	34,8102	10,0982	49,0800
	0,6300	0,4263	0,2625	30,7738	16,2043	50,1912

	0,8678	0,3502	0,3730	23,1277	18,0221	40,5714
4:30	0,8027	0,2919	0,9331	34,0000	9,4294	51,9280
	0,6606	0,3717	0,1150	31,8869	16,1290	51,5294
	0,7896	0,3281	0,4235	23,0532	18,4559	42,9231
	0,8294	0,2771	1,0497	34,9124	8,1472	48,6800
5:00	0,6902	0,4525	0,1583	32,9286	17,9892	51,2353
	0,7728	0,3775	0,3314	23,5106	18,4926	43,6484
	0,8512	0,2665	0,8902	29,6496	8,5092	50,0240
5:30	0,6545	0,4000	0,1976	29,2738	22,0000	51,3603
	0,7132	0,3596	0,3715	29,7979	18,8235	44,6484
	0,8395	0,3036	1,0395	30,2774	10,4785	51,1600
6:00	0,7059	0,4646	0,2300	25,3333	20,1613	52,9559
	0,6797	0,3733	0,4413	23,5213	20,1176	43,7802

Anexo 7. Resultados capacidad de absorción de agua promedio.

Tiempo	Bioimpresión 3D (g/g)			Liofilización (g/g)		
	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
0:00	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0:30	0,6110	0,3045	0,3071	28,1518	13,3076	38,3372
1:00	0,5775	0,1750	0,3396	28,9106	13,5053	42,1112
1:30	0,7492	0,2620	0,3227	31,4655	13,3435	42,4358
2:00	0,6906	0,2864	0,3232	32,0333	14,8713	44,8174
2:30	0,6007	0,2603	0,4053	33,1408	14,2927	45,4526
3:00	0,6560	0,2955	0,4456	30,2559	14,5897	44,8861
3:30	0,7074	0,2882	0,3920	30,6540	13,1354	46,4818
4:00	0,7328	0,3476	0,4857	29,5706	14,7748	46,6142
4:30	0,7509	0,3306	0,4905	29,6467	14,6715	48,7935
5:00	0,7642	0,3690	0,5131	30,4505	14,8764	47,8545
5:30	0,7396	0,3420	0,4864	29,5738	16,4442	48,6775
6:00	0,7417	0,3805	0,5703	26,3773	16,9192	49,2987

Anexo 8. Desviación estándar de la porosidad capacidad de absorción de agua

Tiempo	Bioimpresión 3D			Liofilización		
	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0:30	0,1067	0,0502	0,2012	1,4433	4,4575	1,9475
1:00	0,0961	0,0142	0,2334	4,8247	2,2502	1,0368

1:30	0,1642	0,0434	0,2234	3,7338	4,4386	4,2053
2:00	0,0922	0,0539	0,1297	3,4849	3,6974	3,1014
2:30	0,0968	0,0336	0,1926	3,9084	4,6850	1,1699
3:00	0,0444	0,0365	0,2401	4,2487	3,9567	3,4320
3:30	0,1013	0,0402	0,2255	4,4751	3,9331	3,6626
4:00	0,0997	0,0653	0,2418	4,8447	3,3892	4,2969
4:30	0,0641	0,0326	0,3373	4,7415	3,8264	4,1542
5:00	0,0572	0,0719	0,3860	4,9736	4,7627	3,1519
5:30	0,0825	0,0559	0,2942	0,2206	5,7588	2,9008
6:00	0,0700	0,0659	0,3428	2,8552	4,5542	3,9704

Anexo 9. Pesos obtenidos para calcular la biodegradabilidad replica 1.

Tiempo	Bioimpresión 3D (g)			Liofilización (g)		
	Quitosano /Colágeno	Quitosano	Colágeno	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
Día 2	0,1699	0,3036	0,2518	0,0129	0,0152	0,0112
	0,1514	0,2570	0,2434	0,0237	0,0171	0,0236
Día 4	0,2688	0,3775	0,1745	0,0141	0,0148	0,0108
	0,2100	0,3180	0,1699	0,0260	0,0138	0,0266
Día 7	0,3595	0,3639	0,4649	0,0140	0,0153	0,0123
	0,2800	0,2033	0,3480	0,0319	0,0169	0,0250

Anexo 10. Pesos obtenidos para calcular la biodegradabilidad replica 2

Tiempo	Bioimpresión 3D (g)			Liofilización (g)		
	Quitosano /Colágeno	Quitosano	Colágeno	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
Día 2	0,1772	0,3594	0,2655	0,0200	0,0073	0,0111
	0,1603	0,3252	0,2527	0,0311	0,0129	0,0335
Día 4	0,3084	0,3978	0,1141	0,0210	0,0176	0,0094
	0,2580	0,3277	0,1129	0,0365	0,0064	0,0258
Día 7	0,3326	0,2949	0,4224	0,0198	0,0080	0,0128
	0,2710	0,1654	0,3141	0,0480	0,0086	0,0324

Anexo 11. Pesos obtenidos para calcular la biodegradabilidad replica 3

Tiempo	Bioimpresión 3D (g)			Liofilización (g)		
	Quitosano /Colágeno	Quitosano	Colágeno	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
Día 2	0,2173	0,3897	0,2627	0,0185	0,0129	0,0093
	0,1936	0,3485	0,2544	0,0325	0,0120	0,0249
Día 4	0,2778	0,2886	0,1740	0,0207	0,0135	0,0066
	0,2293	0,2160	0,1526	0,0206	0,0092	0,0173
Día 7	0,3422	0,3140	0,3239	0,0166	0,0122	0,0073
	0,2854	0,1953	0,2205	0,0192	0,0060	0,0123

Anexo 12. Resultados biodegradabilidad replicas

Tiempo	Bioimpresión 3D (%)			Liofilización (%)		
	Quitosano /Colágeno	Quitosano	Colágeno	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
Día 2	10,8888	15,3491	3,3360	-83,7209	-12,5000	-110,7143
	9,5372	9,5159	4,8211	-55,5000	-76,7123	-201,8018
	10,9066	10,5722	3,1595	-75,6757	6,9767	-167,7419
Día 4	21,8750	15,7616	2,6361	-84,3972	6,7568	-146,2963
	16,3424	17,6219	1,0517	-73,8095	63,6364	-174,4681
	17,4586	25,1559	12,2989	0,4831	31,8519	-162,1212
Día 7	22,1140	44,1330	25,1452	-127,8571	-10,4575	-103,2520
	18,5207	43,9132	25,6392	-142,4242	-7,5000	-153,1250
	16,5985	37,8025	31,9234	-15,6627	50,8197	-68,4932

Anexo 13. Resultados biodegradabilidad promedio

Tiempo	Bioimpresión 3D (%)			Liofilización (%)		
	Quitosano /Colágeno	Quitosano	Colágeno	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano
Día 0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Día 2	10,4442	11,8124	3,7722	-71,6322	-27,4119	-160,0860
Día 4	18,5587	19,5131	5,3289	-52,5745	34,0817	-160,9619
Día 7	19,0778	41,9496	27,5693	-95,3147	10,9541	-108,2901

Anexo 14. Desviación estándar de la biodegradabilidad

Tiempo	Bioimpresión 3D			Liofilización		
	Quitosano /Colágeno	Quitosano	Colágeno	Quitosano /Colágeno	Colágeno	Quitosano

Día 0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Día 2	0,6414	2,5378	0,7452	11,8706	35,7560	37,5783
Día 4	2,3889	4,0617	4,9708	37,7656	23,2745	11,5303
Día 7	2,2859	2,9338	3,0855	56,6356	28,2151	34,7340
