

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Facultad de Ciencias Médicas
Ingeniería Biomédica

PROYECTO INTEGRADOR

**ENTRECruzAMIENTO POR TRATAMIENTO
DEHIDROTERMAL DE ANDAMIOS DE COLÁGENO Y
ÁCIDO HIALURÓNICO IMPRESOS EN 3D**



Alumno: Bavaresco Elissetche, Bruno Nicolás

Asesora: Dra. Cid, Mariana Paula

Co-asesora: Dra. Comín, Romina



Córdoba, Diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi papá Julián y mi mamá Alejandra, que me acompañaron y apoyaron durante toda mi vida. Son mi pilar fundamental y, sin ellos, no hubiese podido hacer mi carrera universitaria.

A todos los amigos que hice al venir a Córdoba y también a aquellos que me acompañan desde la infancia. Personas increíbles, que todos estos años hicieron que el estar lejos de casa no fuese difícil.

A toda mi familia, que siempre me brindó su apoyo incondicional y me alentó a seguir.

A mis asesoras Mariana y Romina, que me recibieron en el laboratorio de la mejor manera y guiaron constantemente durante todo el desarrollo del proyecto.

RESUMEN

La ingeniería en tejidos investiga, entre otras cosas, la combinación de células, moléculas y biomateriales para reparar los órganos o tejidos dañados. La piel, el cartílago y el hueso son algunos de los ejemplos de tejidos artificiales fabricados por esta rama de la ingeniería biomédica.

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano, siendo uno de los principales elementos estructurales del tejido conectivo junto con el ácido hialurónico (AH). Los andamios de estos materiales fabricados en laboratorio, intentan simular la matriz extracelular (MEC) proveyendo un soporte físico con la porosidad adecuada para la proliferación celular y otros procesos biológicos.

Sin embargo, los andamios de colágeno y ácido hialurónico presentan ciertas limitaciones en sus características físicas que son cruciales para el posterior cultivo celular y su implantación. Es por este motivo que se los somete a diferentes tratamientos con el fin de reforzar algunas de sus propiedades, como la resistencia a la tracción y a la degradación enzimática, entre otras. Ante la gran variedad de métodos físicos y químicos que existen en la actualidad, este proyecto utiliza el tratamiento dehidrotermal (DHT), que aumenta el número de enlaces covalentes (crosslinks) entre las cadenas laterales de la molécula de colágeno. Se elige este método por su nula citotoxicidad y la escasa alteración de la estructura química del colágeno y el AH.

Apoyándose en la tecnología de la impresión en 3D, se obtuvieron los andamios mediante esta técnica. Después, se los sometió al tratamiento DHT y se realizó una caracterización química y biológica de los mismos mediante diferentes pruebas.

El análisis de espectrometría infrarroja demostró el aumento en la cantidad de enlaces covalentes luego del tratamiento. Además, el ensayo de degradación enzimática, reveló una mayor resistencia a la enzima colagenasa por parte de los andamios sometidos al tratamiento. Por otro lado, el ensayo de hinchamiento demostró una disminución en la absorción de agua de los andamios entrecruzados, lo cual es producto de un aumento en la densidad en la red polimérica.

El estudio de los andamios por microscopía electrónica de barrido reveló diferentes poblaciones de tamaños de poros. Adicionalmente, los constructos de colágeno y AH con tratamiento DHT presentaron citotoxicidad en células epiteliales tipo Vero, pero ningún andamio evidenció citotoxicidad para células NIH 3T3.

Reuniendo todos los resultados, se demostró la efectividad del tratamiento DHT para el entrecruzamiento de los constructos de colágeno y de colágeno con ácido hialurónico junto con el refuerzo de sus propiedades físicas. Los andamios de estos materiales no presentaron citotoxicidad para posibles aplicaciones *in vivo* en ingeniería en tejidos.

ABSTRACT

The mechanical and biological properties of tissue engineering scaffolds affect cellular adhesion and proliferation. Additionally, these properties are critical for preserving the structural integrity and functionality during *in vivo* implantation. Consequently, it is a common practice to enhance these properties with some chemical or physical technique.

Since collagen and hyaluronic acid (AH) scaffolds demonstrated great potential in tissue engineering, the aim of this study was to investigate the effects of dehydrothermal (DHT) treatment on the structural properties of these scaffolds through chemical and biological analysis. All constructs were obtained with 3D printing technology and subsequently, DHT treatment was performed at 120°C, under 5 cmHg pressure during 24 h.

Fourier transform spectrometry (FTIR) indicated increased amide bond formation with DHT compared to control. A higher value of resistance to enzyme degradation was also reported for the scaffolds treated with DHT. As expected, the swelling ratio of the crosslinked scaffolds was decreased. This is a consequence of the increment in the polymer network density. Scanning electron microscopy (SEM) showed different pore size distribution in the cross section of the scaffolds as well as a heterogeneous surface morphology. Cytotoxicity was evaluated according to ISO 10993-5 with Vero and NIH 3T3 line cells and the scaffolds indicated very low and null cytotoxicity respectively.

Taken together, these results prove the effectiveness of DHT treatment for collagen-glycosaminoglycan scaffolds crosslinking and the enhancement of its physical properties. Furthermore, scaffolds showed high biocompatibility and an acceptable cytotoxicity for future *in vivo* and *in vitro* tissue engineering applications.

Key words: Tissue engineering, Dehydrothermal treatment, collagen, hyaluronic acid.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Tejido Conectivo, Colágeno y Ácido Hialurónico.....	10
1.2 Colágeno.....	12
1.3 Andamios de colágeno y ácido hialurónico	17
1.4 Técnicas de reforzamiento de las propiedades de andamios	18
1.5 Ventajas del entrecruzamiento de los andamios:.....	19
1.6 Métodos de entrecruzamiento.....	20
1.7 Tratamiento Dehidrotermal:.....	20
1.8 Bioimpresión 3D.....	22
2. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	26
2.1 Objetivo General:	26
2.2 Objetivos Específicos:.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Materiales.....	27
3.2 Preparación de las muestras.....	27
3.3 Impresión de los andamios	28
3.4 Liofilización de andamios	28
3.5 Tratamiento DHT.....	29
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS.....	32
4.1 Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	32
4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	33
4.3 Análisis de degradación enzimática	33
4.4 Análisis de hinchamiento	34
4.5 Análisis de la porosidad	35
4.6 Análisis de solubilización en medio de cultivo a 37 °C.....	35
4.7 Ensayo de Citotoxicidad con células Vero	36
4.8 Ensayo de Citotoxicidad con células NIH 3T3.....	38
4.9 Análisis estadístico.....	38
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	39

5.1	Obtención de los andamios.....	39
5.2	Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	40
5.3	Microscopía de barrido electrónico	45
5.4	Análisis de degradación enzimática	53
5.5	Análisis de Hinchamiento	55
5.6	Análisis de porosidad	58
5.7	Análisis de solubilización en medio de cultivo a 37°C.....	60
5.8	Ensayo de Citotoxicidad con células Vero	62
5.9	Ensayo de Citotoxicidad con células NIH 3T3.....	65
6.	CONCLUSIONES	67
7.	BIBLIOGRAFIA	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Resumen de dimensiones de andamios en secciones transversales	49
Tabla II: Resultados del ensayo de degradación enzimática	53
Tabla III: Resultados del análisis del hinchamiento.....	55
Tabla IV: Resultados del ensayo de porosidad	58
Tabla V: Resultados del ensayo de disolución en extracto de cultivo	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de proteoglicanos y GAG.....	11
Figura 2: Unidad estructural de Ácido Hialurónico	12
Figura 3: Motivo repetitivo de las cadenas α	13
Figura 4: Estructura de triple hélice de la molécula de tropocolágeno	14
Figura 5: Período D y estriaciones de la fibrilla colágena.....	15
Figura 6: Estructura de una Fibra de colágeno	15
Figura 7: Entrecruzamiento intermolecular del tropocolágeno	16
Figura 8: Formación de lisino-alanina	21
Figura 9: Enlaces covalentes formados durante el tratamiento dehidrotermal.....	21
Figura 10: Tipos de bioimpresoras 3D	25
Figura 11: Conexión de componentes para el tratamiento DHT	30
Figura 12: Obtención de andamios	39
Figura 13: Espectros FTIR de andamios.....	40
Figura 14: Espectros FTIR de andamios.....	42
Figura 15: Espectros FTIR de andamios.....	43
Figura 16: Imágenes SEM de la superficie de andamios	45
Figura 17: Imágenes SEM de las secciones transversales de los andamios.....	46
Figura 18: Imágenes SEM de andamios	48
Figura 19: Distribución de tamaño de poros de los andamios.....	50
Figura 20: Análisis ANOVA de los tamaños de poros de los andamios	51
Figura 21: Ensayo de degradación enzimática	54
Figura 22: Análisis de hinchamiento en agua.....	56
Figura 23: Análisis de porosidad	59
Figura 24: Análisis de disolución en extracto de cultivo	61
Figura 25: Ensayo de citotoxicidad con células Vero	63
Figura 26: Ensayo de citotoxicidad con células NIH 3T3	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tejido Conectivo, Colágeno y Ácido Hialurónico

En el cuerpo humano, el tejido conectivo cumple la función de sostén e integración sistémica del organismo, participando en la cohesión de los diferentes elementos tisulares que componen los órganos y sistemas. También en él se distribuyen las diferentes estructuras vasculonerviosas que irrigan e inervan diferentes órganos. Como todos los tejidos del organismo, está constituido por componentes celulares y extracelulares. En estos últimos, englobamos a la sustancia fundamental y las fibras, que son los componentes principales de la matriz extracelular (MEC), de los cuales dependen mayoritariamente las características morfofisiológicas de los tejidos conectivos en general^[1].

1.1.1 Sustancia fundamental

La sustancia fundamental es un material de consistencia gelatinosa que está extensamente hidratada. Su principal función es hacer las veces de solvente para permitir el intercambio de metabolitos de una célula a otra. Sus componentes son:

- Proteínas
- Glicosaminoglicanos (GAG)

Estos últimos son polisacáridos (polímeros hidrófilos) que muchas veces se asocian a proteínas. Este conjunto, denominado proteoglicano, atrae cationes solubles (principalmente Na^+) entonces, por efecto osmolar, atrae agua contribuyendo así a la hidratación de la matriz extracelular.

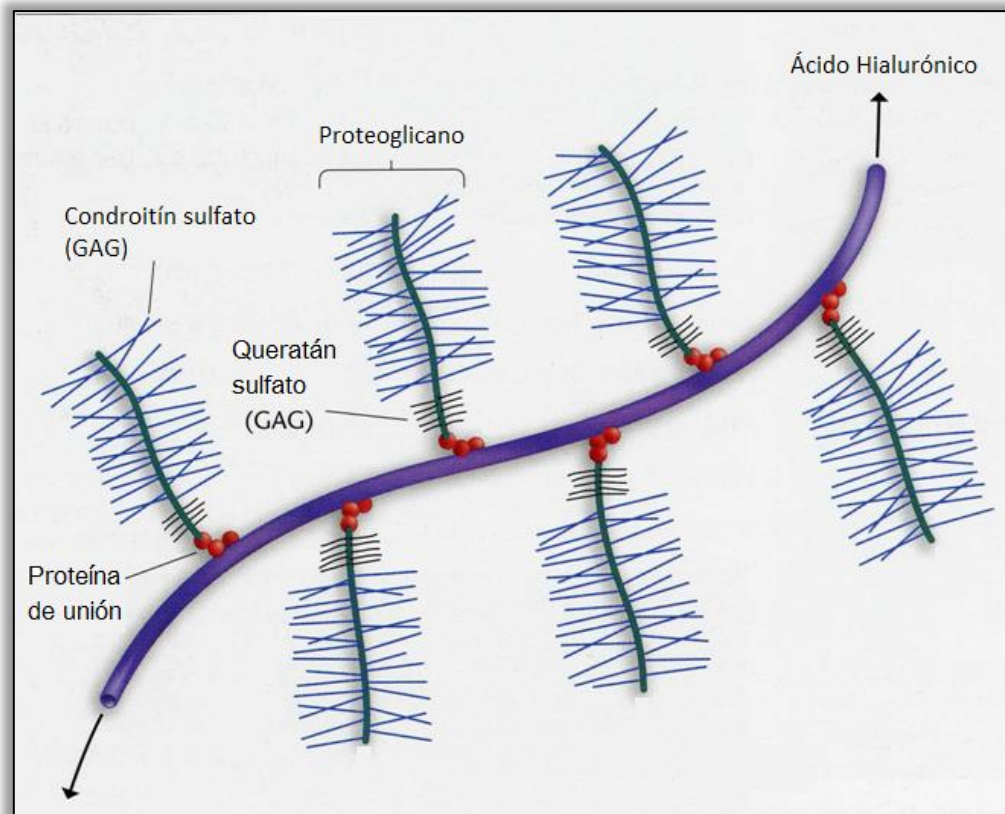


Figura 1: Estructura de proteoglicanos y GAG^[2]

Los principales GAG son:

- Condroitín sulfato
- Heparán sulfato
- Queratán sulfato
- Ácido hialurónico

Particularmente el ácido hialurónico es el GAG más abundante del tejido conectivo laxo del cuerpo humano. Está compuesto por unidades repetitivas de un disacárido (Acido D-glucurónico ligado a N-acetil-D-glucosamina) y es el único GAG no sulfatado^{[3][4]}. Es el GAG utilizado en este trabajo para la elaboración de los andamios.

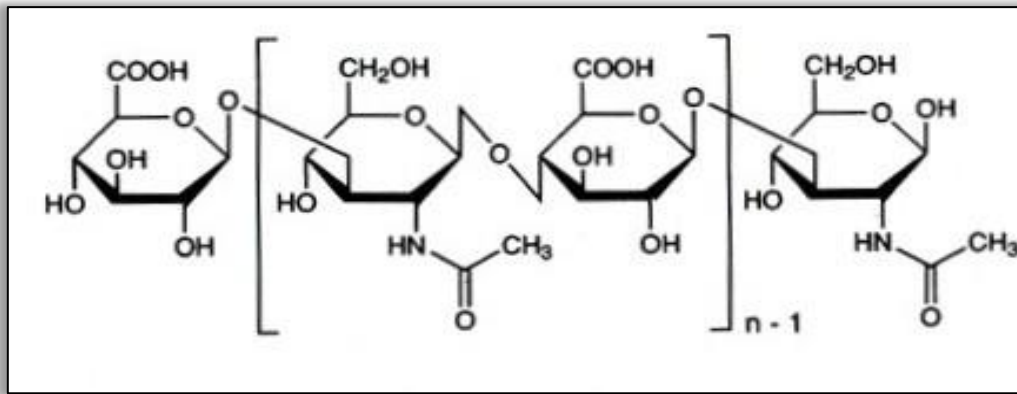


Figura 1: Unidad estructural de Ácido Hialurónico^[5]

1.1.2 Fibras:

Las fibras que componen la matriz extracelular pueden ser de varios tipos: fibras colágenas, fibras elásticas y microfibrillas. Cualitativa y cuantitativamente, el colágeno es la fibra más importante y abundante en el organismo, y son los fibroblastos las células responsables de su síntesis. Las fibras colágenas sirven para resistir estiramientos y otros esfuerzos mecánicos de la MEC. Están presentes en todo tipo de tejido conjuntivo, en particular tendones, ligamentos y las fascias.

1.2 Colágeno

Existen cerca de 33 cadenas polipeptídicas, diferentes en términos genéticos, que constituyen al menos 20 tipos de colágeno distintos. Una sola molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas α de unidades repetitivas (Gly-X-Y) donde frecuentemente los amino ácidos en las posiciones X e Y son prolina e hidroxiprolina respectivamente.

El hecho de que la tercera posición esté ocupada por Glicina (el amino ácido más pequeño, que contiene solamente un átomo de hidrógeno en la posición de su cadena lateral) le permite a la cadena α formar una vuelta cerrada levógira sobre sí misma.

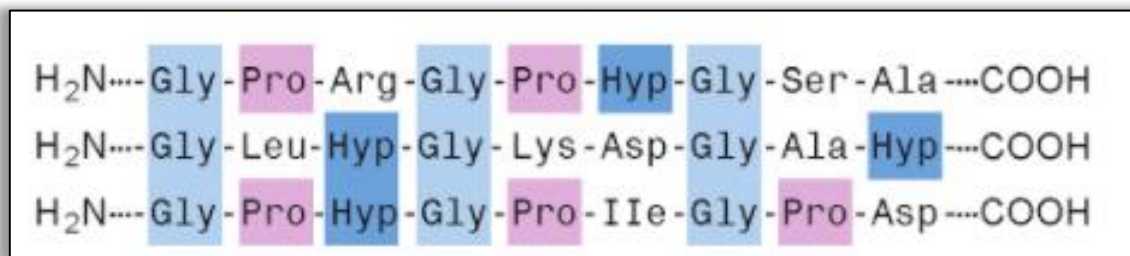


Figura 3: Motivo repetitivo de las cadenas α ^[6]

A su vez, tres cadenas α se enlazan entre sí formando una triple hélice dextrógira (denominada tropocolágeno) reforzada por enlaces de hidrógenos entre la glicina de una cadena y la prolina de otra. En esta disposición de triple hélice, la glicina se orienta hacia el centro de la misma mientras que la prolina y la hidroxiprolina lo hacen hacia la superficie.

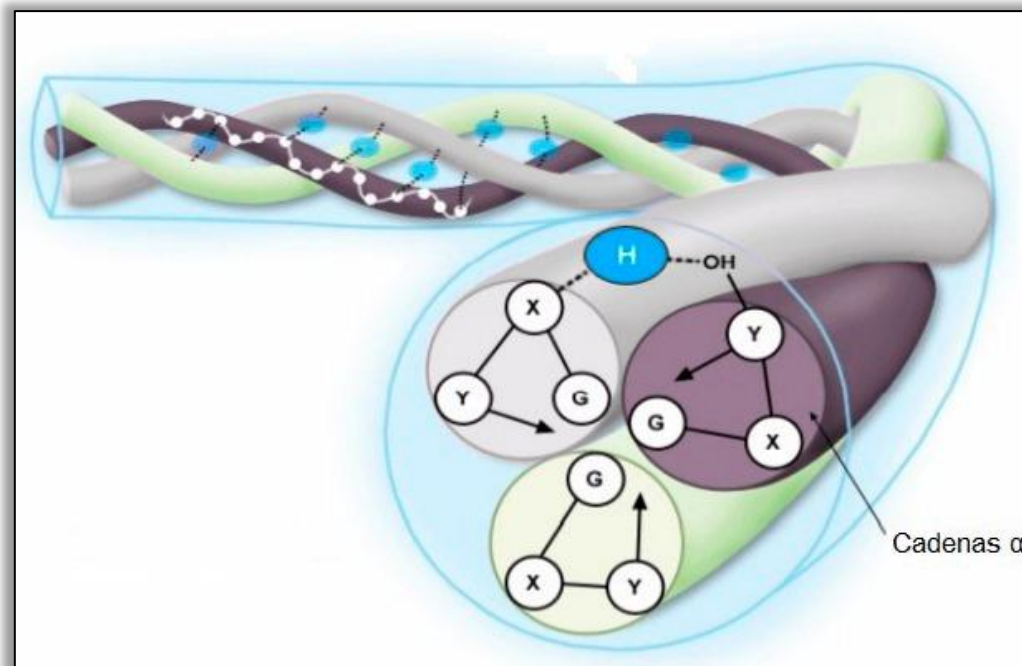


Figura 4: Estructura de triple hélice dextrógira y puentes de hidrógeno entre las cadenas^[7]

La estructura de triple hélice rígida y bien empaquetada de colágeno, análoga a la de una cuerda, es responsable de su fuerza tensil característica^{[8][6][9]}.

Las unidades de tropocolágeno se disponen en hileras y éstas a su vez se empaquetan en haces que constituyen fibrillas. Todas las unidades de tropocolágeno en una fibrilla tienen igual orientación, esto es, las “cabezas” (extremos N-terminales de las cadenas polipeptídicas) están dirigidas hacia el mismo lado. Cada segmento tropocolágeno en una hilera está desplazado con respecto al segmento de la hilera adyacente en aproximadamente un cuarto de la longitud total de la unidad. Este desplazamiento se mantiene con gran regularidad en todas las filas y es responsable de las estriaciones (período D) que presentan las fibrillas colágenas cuando se las observa al microscopio electrónico.

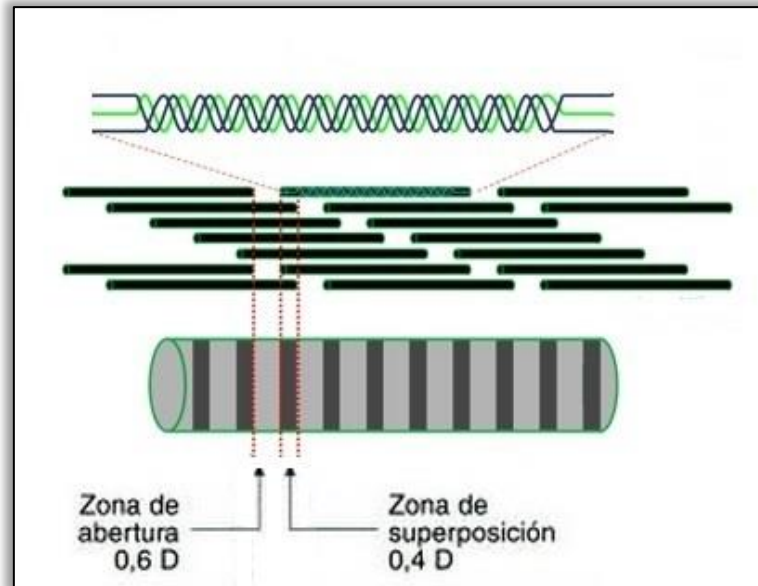


Figura 5: Período D y estriaciones de la fibrilla colágena [6]

Finalmente, las fibrillas de colágeno se agrupan en gran número para constituir una fibra de colágeno[9].

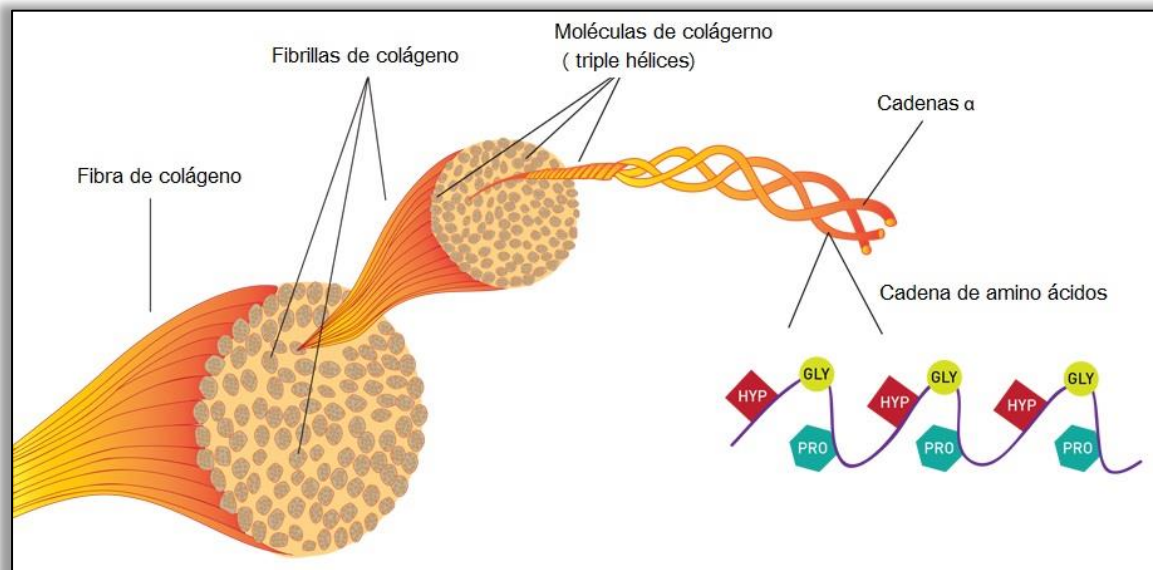


Figura 6: Estructura de una Fibra de colágeno[7]

Para reforzar aún más la fibrilla de colágeno y estabilizar la molécula, ocurre lo que se denomina entrecruzamiento químico, promovido por la enzima lisil oxidasa. Esta enzima contiene cobre y convierte los residuos de lisina a los del aldehído alisina. De esta manera, pueden unirse hasta cuatro cadenas laterales en forma covalente entre sí. Este entrecruzamiento no se forma en un sitio al azar, sino que tiene lugar preferentemente en las regiones terminales de los tropocolágenos y aumenta enormemente la estabilidad mecánica de las fibrillas de colágeno^{[4][10][6]}.

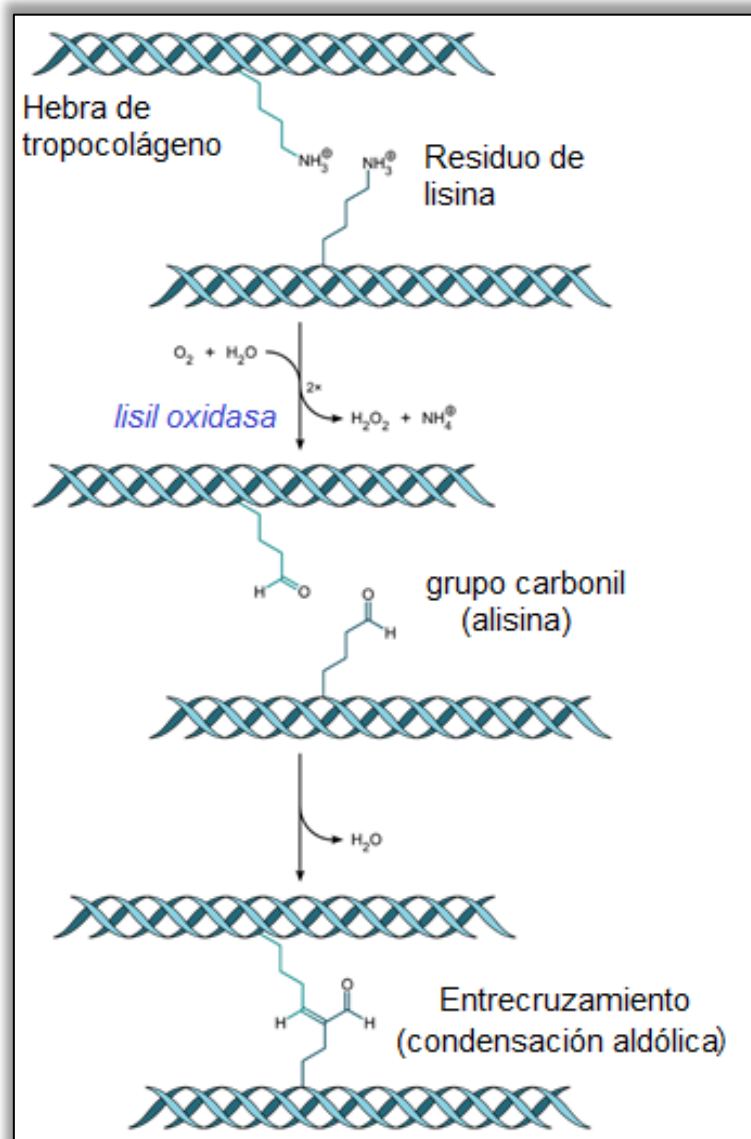


Figura 7: Entrecruzamiento intermolecular del tropocolágeno promovido por la enzima lisil oxidasa^[11]

Estos enlaces cruzados de la molécula de colágeno, aumentan con la edad. Eventualmente, la elasticidad de las fibrillas va disminuyendo dando lugar a que aumente la fragilidad de los huesos, disminuya la elasticidad de los ligamentos y se endurezcan las articulaciones y los vasos.

1.3 Andamios de colágeno y ácido hialurónico

La ingeniería en tejidos utiliza la combinación de células y métodos de la ingeniería de materiales para mantener, mejorar o restaurar la función de tejidos y órganos del cuerpo humano mediante la obtención de tejidos funcionales *in vitro*. Entre sus objetivos podemos mencionar: la reparación de órganos del cuerpo humano, las transfusiones, trasplantes y terapias génicas entre otros. Es una especialidad de carácter interdisciplinario ya que involucra a la ingeniería de materiales, la biología celular, la fisicoquímica y la medicina entre otras^[12].

Los tres ejes fundamentales de la ingeniería en tejidos son:

- Cultivo de células
- Moléculas o compuestos que llevan a cabo determinadas funciones (mensajeros, factores de crecimiento celular, etc)
- Estructuras de soportes o andamios (*scaffolds*)

Este trabajo se basa en el último ítem. Los andamios son estructuras en 3D que sustituyen parte de un tejido, total o parcialmente. Se confeccionan con distintos materiales en función del órgano o tejido donde se vayan a implantar. Existen varios métodos de fabricación, como la descelularización de tejidos, la infiltración de espumas poliméricas y el electrohilado (*electrospinning*) entre otros. Sin embargo, en este trabajo se utiliza una técnica relativamente nueva para la obtención de los andamios: la impresión 3D.

Es indispensable que los andamios cumplan con una serie de requisitos:

- En primer lugar deben ser biocompatibles, esto quiere decir que no generarán rechazos a la hora de su implantación.
- Deberán tener una vida media determinada según la función que cumplan. Esto implica que deben ser biodegradables en el caso de servir como soporte para el crecimiento de algún tejido.
- Sus propiedades mecánicas deben ser adecuadas para servir de estructura de soporte para el crecimiento celular. Además, debe ser mecánicamente funcional una vez implantado.
- La porosidad del andamio es otra de las propiedades que juega un papel importante a la hora de su construcción. Los poros deben estar interconectados para permitir el crecimiento y migración celular, como así también el transporte de nutrientes. Si el diámetro de los poros es muy pequeño, la migración celular se verá limitada, lo cual provocará una “encapsulación” del andamio en su superficie ya que las células no podrán crecer en su interior. Además de la limitación en la difusión de nutrientes esto restringirá también la remoción de desechos, que podrá causar la aparición de zonas necróticas dentro del constructo. Por otra parte, si el diámetro de los poros es demasiado grande habrá una disminución en la superficie del andamio, lo cual limitará la adhesión celular^{[13][12]}.

1.4 Técnicas de reforzamiento de las propiedades de andamios

El colágeno y los glicosaminoglicanos (GAG) son utilizados frecuentemente en la fabricación de andamios por su biocompatibilidad y su excelente interacción con las células y otras macromoléculas ya que son unos de los componentes principales de la matriz extra celular (MEC).

Sin embargo, existe la necesidad de estabilizar las fibras con el fin de controlar ciertas características físicas, como el tiempo de biodegradación en el cuerpo, la elasticidad o la resistencia a la degradación enzimática^{[10][14]}.

Es práctica habitual, recurrir a métodos para reforzar las propiedades mecánicas de los andamios de colágeno y GAG. Una forma de lograr esto, es aumentando los enlaces covalentes entre las cadenas de tropocolágeno, esto se denomina reacción de entrecruzamiento (*crosslinking*). Como se mencionó anteriormente, este fenómeno tiene lugar de manera natural en el organismo gracias a la enzima *lisil oxidasa*, la cual provoca entrecruzamiento intermolecular en la fibra de colágeno con el fin de estabilizar las fibrillas^[6].

1.5 Ventajas del entrecruzamiento de los andamios:

Entre las ventajas del entrecruzamiento *in vitro* de los andamios podemos enumerar:^{[10][15]}

- Aumento en el módulo de compresión y tracción del constructo
- Aumento en la resistencia a la degradación enzimática
- Aumento de la temperatura de desnaturalización del colágeno
- Reducción del grado de hidratación de la matriz polimérica
- Retención de la forma original del andamio a la hora del cultivo

Un uso de esta técnica tiene lugar en la industria farmacéutica, ya que al modificar el grado de entrecruzamiento de los andamios, se puede controlar con mayor precisión el tiempo de biodegradabilidad de los mismos. Esto es de crucial importancia en la liberación controlada de fármacos.

En la oftalmología también es usual recurrir a esta técnica para tratar patologías como el queratocono o la degeneración marginal pelúcida, donde el colágeno

corneal está debilitado. Se aplican rayos UVA al paciente con el objetivo de recuperar la rigidez corneal.

1.6 Métodos de entrecruzamiento

En la actualidad, existen varias alternativas de entrecruzamiento *in vitro*. De manera general, se los agrupa en métodos químicos y físicos. Entre los primeros, algunos de los agentes químicos utilizados son: Glutaraldehído (GTA), Diisocianato de hexametileno (HMDC), Cianamida, Carbodiimida (EDC) y Difenil fosforil azida (DPPA). Mientras que los métodos físicos empleados son: Radiación X y gamma, Luz ultravioleta (UV) y tratamiento dehidrotermal (DHT).

A estos últimos, se los denomina también métodos de longitud cero (*Zero-length methods*) ya que no agregan ninguna molécula que actúe como puente de unión entre las cadenas de colágeno y las cadenas de colágeno y los GAG. No se incorpora ningún compuesto químico a la red polimérica^[8].

Esta cualidad le otorga a los métodos físicos una ventaja sobre los químicos, ya que los andamios obtenidos por los métodos de longitud cero presentan citotoxicidad nula con respecto a los obtenidos por métodos químicos^[8]. Esta característica fue el motivo por el cual el método Dehidrotermal (DHT) fue el elegido para llevar a cabo este proyecto.

1.7 Tratamiento Dehidrotermal:

Este proceso físico consiste en someter a los andamios a altas temperaturas (>90°C) y vacío durante períodos de tiempo prolongados. Esto remueve el agua contenida en la red polimérica y promueve la formación de entrecruzamientos intermoleculares entre las cadenas de colágeno a través de enlaces amida^[14]. Los

aminoácidos involucrados en estos enlaces son la lisina y la alanina. Luego de una reacción de eliminación β de la serina, se forma dehidroalanina que luego reacciona con la lisina para formar lisinoalanina^[10].

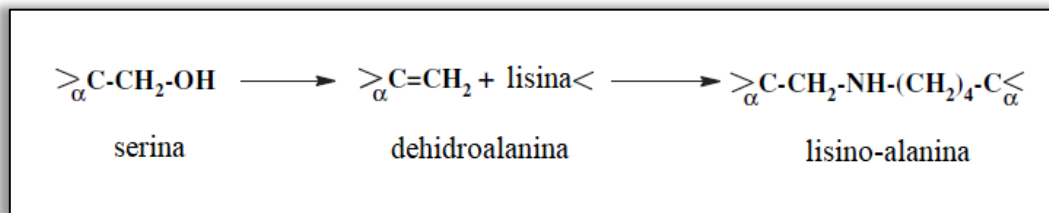


Figura 8: Formación de lisino-alanina^[10]

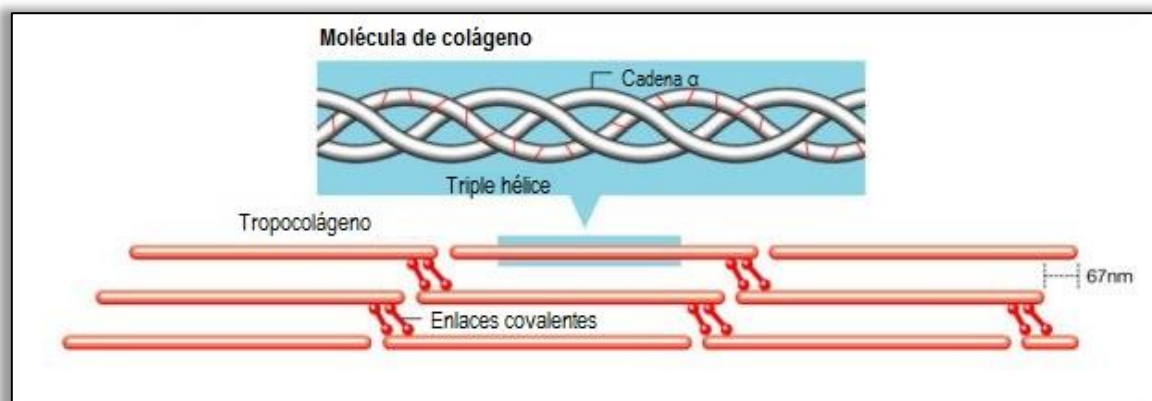


Figura 9: Enlaces covalentes formados durante el tratamiento dehidrotermal^[16]

El tratamiento DHT es preferible a otros métodos de entrecruzamiento ya que además de no utilizar agentes citotóxicos, esteriliza las muestras debido a la prolongada exposición a altas temperaturas.

Sin embargo, esto tiene como contrapartida la desnaturalización de la molécula, que se traduce como una desorganización de la estructura de triple hélice donde las

cadena se reensamblan de manera aleatoria. Aunque generalmente la desnaturalización es indeseada ya que corrompe la estructura original del colágeno, se ha comprobado que la misma reduce la respuesta inflamatoria y promueve la adhesión celular *in vivo*. Esto último se explica al observar que luego de la desnaturalización, quedan expuestos más sitios de unión de la molécula (que en su estado normal son inaccesibles) para los receptores celulares de integrinas. Entonces, la desnaturalización aumenta el número de sitios expuestos para la adhesión celular en la molécula de colágeno^{[8][17]}. No obstante, en la fabricación de andamios, la desnaturalización debe ser sumamente controlada puesto que trae aparejada una biodegradación más rápida.

1.8 Bioimpresión 3D

La Bioimpresión 3D es una técnica de construcción por capas con materiales biológicos, celulares o no, basado en un diseño por computadora para producir estructuras que simulan los diferentes tejidos del organismo. A diferencia de la impresión convencional, la bioimpresión 3D implica consideraciones adicionales, tales como la elección de materiales (tipos de células y la composición del hidrogel que las contendrá) y parámetros técnicos relacionados, como la sensibilidad de las células a la impresión y la integridad mecánica del constructo a imprimir^[18].

1.8.1 Materiales y constructos:

En la actualidad, los materiales utilizados en la bioimpresión 3D son predominantemente polímeros naturales (alginato, gelatinas, colágenos, quitosano, fibrina y ácido hialurónico) obtenidos de tejidos animales, o moléculas sintéticas (polietilenglicol; PEG, policaprolactona; PLA)^{[18][19][20]}. Por un lado, el uso de polímeros naturales resuelve los problemas de biocompatibilidad que frecuentemente presentan los polímeros sintéticos. Por otro lado, las propiedades

físicas de los polímeros sintéticos son mucho más flexibles a la hora de someter al material a diferentes procesos para satisfacer necesidades de aplicaciones particulares.

Independientemente del material que se elija, es necesario que presente propiedades mecánicas y de biocompatibilidad adecuadas no solo para cumplir con las necesidades físicas del constructo sino también para el proceso de impresión.

1.8.2 Técnicas de Bioimpresión

Bioimpresión a base de inyección de tinta:

Es la técnica más comúnmente usada tanto para aplicaciones biológicas como para no biológicas. Cuenta con un cartucho, el cual contiene un hidrogel que normalmente es una solución de un hidrogel y células encapsuladas. Este cartucho se encuentra conectado al cabezal de impresión, el cual es deformado por un actuador térmico o piezoeléctrico para generar gotas de un tamaño controlable^[18].

La ventaja de esta técnica es el bajo costo de la misma, debido a que el mecanismo es similar al de las impresoras convencionales. Además los constructos poseen alta viabilidad celular, entre un 80-90%.

Por otro lado, una de las desventajas de la técnica es el hecho de que no soporta hidrogeles con alta viscosidad y densidad celular. Esto se debe principalmente a que la boquilla se atasca frecuentemente. Otra desventaja es el efecto de sedimentación: el hidrogel recién cargado se encuentra bien mezclado, pero durante el proceso de impresión las células permanecen en el cartucho y no son eyectadas por la boquilla^{[20][21]}.

Bioimpresión por extrusión:

Es la técnica utilizada en este proyecto. Las bioimpresoras más accesibles del mercado son de este tipo. El mecanismo de acción consta de un dispositivo neumático o mecánico como un pistón o tornillo. Para extruir el filamento, se aplica sobre el hidrogel una presión que genera una eyección continua de material y no gotas del mismo, característica que la distingue de otras técnicas de impresión^[18].

Una de las ventajas de la técnica se basa en la posibilidad de imprimir gran cantidad de hidrogeles diferentes, con alta densidad celular y un costo razonable. Asimismo, tiene compatibilidad con sistemas de entrecruzamiento químico, térmico y con luz. Igualmente, los equipos tienen gran versatilidad a la hora de intercambio de extrusores.

La principal desventaja es el largo período de exposición de las células a estrés mecánico, esto reduce la viabilidad celular notablemente^[20]. Esto no fue un problema para este proyecto puesto que no se imprimió con componentes celulares.

Bioimpresión basada en tecnología láser:

Aunque menos habitual que las técnicas anteriores, la bioimpresión por láser está comenzando a ser utilizada para aplicaciones de ingeniería en tejidos. Básicamente la técnica se apoya en la transferencia de energía inducida por láser.

El equipo consta de un emisor de láser pulsado y una cinta con dos capas. Durante la impresión, la capa superior (generalmente de oro o titanio) absorbe la energía proveniente del haz y provoca una vaporización que eyecta el hidrogel de la capa inferior.

Una de las ventajas de esta técnica, en comparación con las precedentes, es que la impresión evita el contacto directo entre el hidrogel y el dispensador, lo cual limita el estrés mecánico que sufren las células y eleva la viabilidad celular a valores

de 95%. Además, la técnica permite utilizar diferentes tipos de hidrogeles, puesto que no conlleva limitaciones de viscosidad.

Sin embargo, esta técnica es la más costosa^{[18] [22]}.

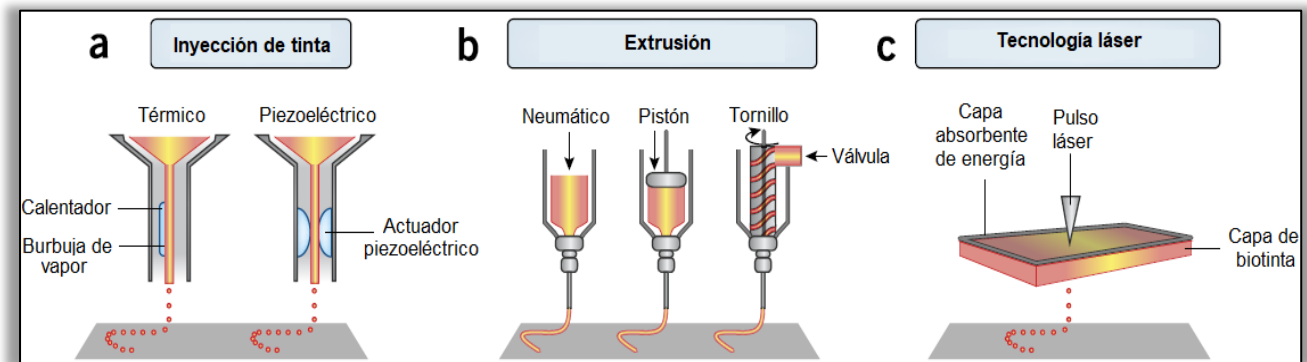


Figura 10: Técnicas de Bioimpresión^[18]

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1 Objetivo General:

Obtener andamios de colágeno y colágeno con ácido hialurónico impresos en 3D para luego entrecruzarlos mediante tratamiento dehidrotermal y demostrar los efectos del mismo a través de caracterizaciones químicas y biológicas.

2.2 Objetivos Específicos:

- Obtención de preparados de colágeno y ácido hialurónico en el laboratorio en concentraciones indicadas en protocolos.
- Impresión 3D de andamios de estos componentes
- Entrecruzamiento de los constructos por tratamiento dehidrotermal.
- Caracterización química y biológica de los andamios:
 - Determinación cuantitativa del nivel de entrecruzamiento mediante Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)
 - Análisis topográfico de la superficie de los andamios y dimensiones de poros por microscopía de barrido electrónico (SEM)
 - Ensayo de degradación enzimática
 - Evaluación de hinchamiento en agua y porosidad en etanol de los andamios
 - Evaluación biológica de los constructos: ensayo de solubilidad en medio fisiológico y ensayos de citotoxicidad según norma ISO 10993-5.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen los procesos de elaboración, impresión y caracterización de los andamios. La mayor parte de las actividades fueron llevadas a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC).

3.1 Materiales

El colágeno utilizado en este trabajo es de origen porcino, tipo I. El mismo fue extraído y purificado según protocolo^[23] a partir de piel porcina en el laboratorio de Química Biológica de la FCEFyN. Brevemente, fragmentos de piel se sometieron a 12 tratamientos consecutivos de 24hs cada uno: seis tratamientos de fosfato de sodio 0,211 M, dos tratamientos de cloruro de sodio 0,48 M, dos tratamientos de buffer de citrato 0,225 M (ajustado pH 3.7) y dos tratamientos de ácido acético de 0,175 M. Una vez completos los 12 tratamientos, las muestras se lavaron cuatro veces con agua desionizada, se congelaron y liofilizaron. Ácido hialurónico (AH) de origen comercial también se utilizó para la preparación de los andamios. El resto de los reactivos químicos utilizados fueron provistos por el Departamento de Química Biológica de la FCEFyN.

3.2 Preparación de las muestras

El colágeno se hidrato en una relación de 60 mg por ml de buffer de ácido acético. El hidrogel se homogenizó manualmente mediante el paso del mismo a

través de jeringas con agujas de calibre 21G. En el caso del hidrogel de colágeno y ácido hialurónico, la relación usada fue 100 mg de colágeno cada 8,8 mg de ácido hialurónico. Este hidrogel mixto se hidrató en el buffer en la misma relación que el de colágeno (60 mg de colágeno por cada ml de buffer).

1.1 Impresión de los andamios

La bioimpresora utilizada para imprimir los constructos pertenece a la empresa *LifeSi*. Una gran cantidad de andamios fueron impresos por extrusión en condiciones de temperatura y humedad ambiente y el tiempo empleado para imprimir cada uno fue cerca de 4 minutos.

Las medidas finales de los constructos fueron de 5 mm de lado aproximadamente. Además, el diámetro de la fibra extruida fue de 500 μm y 1mm para el “paso” de la impresora. Esto determinó el patrón de “entretejido” de los constructos, con huecos de 500 μm entre las fibras. Estas dimensiones, fueron las que luego determinaron los diámetros de los macro poros de los constructos.

1.2 Liofilización de andamios

Siguiendo el protocolo^[14], y con la finalidad de secar los constructos de manera que conserven su forma antes de iniciar el tratamiento DHT, los mismos fueron liofilizados a -90°C durante 4 horas.

1.3 Tratamiento DHT

Materiales para el tratamiento DHT:

- Matraz kitasato de vidrio pirex
- Manguera de silicona resistente a alta temperatura
- Bridas
- Manómetro de vacío (CIMPA NuovaFima)
- Fastix de alta temperatura y sellador de roscas H3
- Llave de paso tipo esférica
- Bomba de vacío DVP 3A 0,5HP
- Horno refractario (ORL Hornos Eléctricos S.A., Buenos Aires, Argentina)

La mayoría de estos materiales fueron provistos por el Departamento de Materiales de la FCEFYN, el resto fueron adquiridos.

Se selló el matraz kitasato con las muestras dentro aplicando pegamento de alta temperatura a su tapón. Las mangueras, el manómetro de vacío y la llave de paso fueron sellados con sella roscas (*Hidro 3 termofusión*). El extremo libre de la manguera fue conectado a la bomba de vacío como se muestra en el siguiente esquema

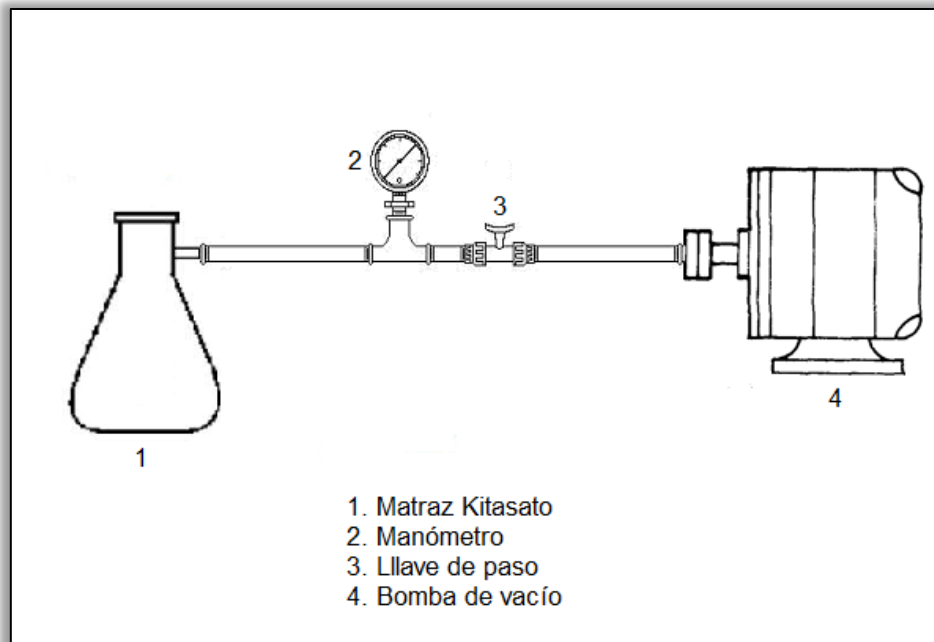


Figura 11: Ilustración e imagen de conexión de componentes para el tratamiento DHT

3.5.1 Procedimiento

Este tratamiento fue llevado a cabo en el laboratorio de Materiales de la FCEFyN. Una vez posicionado el matraz dentro del horno refractario, se colocó un sensor de temperatura tipo termocupla con el objetivo de controlar este parámetro de manera más precisa. Se mantuvieron las muestras en vacío a temperatura ambiente durante 30 minutos siguiendo el protocolo^[8]. A continuación, se comenzó a subir la temperatura del horno de manera progresiva. Las muestras siempre se mantuvieron a 5 cmHg de presión de vacío. El horno tardó 49 minutos en llegar a la temperatura de régimen. Una vez alcanzada ésta, se inició el registro de tiempo del procedimiento, el cual finalizó exactamente a las 24 horas.

Los parámetros elegidos para el tratamiento son los utilizados en dos protocolos^{[8][14]} y fueron los siguientes:

- Temperatura: **120°C**
- Presión de vacío: **5cmHg**
- Tiempo: **24hs**

Nota: El control de la temperatura no fue exacto ya que el horno presentó inercia térmica con variaciones de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Eventualmente se llevó la presión de vacío a 20cmHg para remover el exceso de humedad (se observó condensación en el tubo). Esta humedad es indeseable en el tratamiento.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS

2.1 Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Este ensayo fue realizado en la Facultad de Ciencias Químicas (UNC), donde se utilizó un equipo *Thermoscientific, Nicolet iN10*. Muestras del orden de los microgramos fueron extraídas de los andamios y se posicionaron sobre una pastilla de bromuro de potasio para su lectura. El procedimiento fue llevado a cabo en condiciones de temperatura y humedad ambiente.

Se procedió a hacer un barrido con una resolución de 4 cm^{-1} , en un rango de $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$. Cada espectro fue realizado 5 veces para aumentar la relación señal-ruido. Las señales fueron luego analizadas usando un software especializado (*Essential FTIR*).

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), es de gran utilidad para realizar un análisis cuantitativo del nivel de entrecruzamiento y desnaturalización de los andamios^[14]. La lectura de los espectros, permite elaborar índices que reflejan los cambios que han sufrido los andamios, por lo tanto, éstos fueron evaluados antes y después del tratamiento DHT. De la misma manera, se utilizó este ensayo para comprobar si hubo alteración química del colágeno o el AH durante el tratamiento.

2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis de Rayos X (*LAMARX, FAMAF, UNC*) utilizando un microscopio de barrido electrónico (*Sigma FE-SEM*) a 5KV_a y 4KV_a con diferentes magnificaciones. Previo a realizar el ensayo, las muestras fueron metalizadas en vacío con oro y cromo.

En total se analizaron 4 muestras y para cada una de ellas se obtuvieron imágenes de la superficie y de una sección transversal de la misma. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con un software específico (*ImageJ, National Institutes of Health, USA*) para obtener medidas de las dimensiones de poros, fibras y porcentaje de porosidad de los andamios.

Para cuantificar los diámetros de los poros y las fibras, se utilizaron imágenes del mismo aumento de la superficie y las secciones transversales de los andamios y se definió un nivel de gris umbral en las imágenes para binarizarlas y luego medirlas. Con el fin de evaluar el comportamiento de la distribución de tamaños de poros y determinar diferencias estadísticas, se llevó a cabo un análisis ANOVA para la superficie y la sección transversal de las muestras.

En cuanto al porcentaje de porosidad, éste se obtuvo con imágenes del mismo aumento de la superficie de los andamios. Se calculó el porcentaje como el cociente entre los píxeles correspondientes al poro y los píxeles totales de la imagen^[24].

2.3 Análisis de degradación enzimática

Antes de comenzar el ensayo según el protocolo^[25], todos los andamios fueron pesados con balanza analítica. Se prosiguió sumergiendo los constructos en una solución de 1ml 0,1 M de Tris-HCl (ph 7,4) y 1 mg/ml de enzima colagenasa bacteriana. Se dejaron incubar por 90 minutos a 37 °C y luego la reacción fue frenada agregando 0,2 ml al 0,25M de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Inmediatamente después, las muestras fueron centrifugadas tres veces a 5000 xg, y

4°C durante 15 minutos. Entre cada centrifugado, se lavaron con agua destilada para eliminar todos los reactivos. Finalmente se dejaron secar en estufa a 37 °C durante 24 horas para eliminar el agua excedente y se procedieron a pesar nuevamente.

El porcentaje de degradación fue determinado con el peso residual de los andamios, y fue expresado como porcentaje del peso inicial de los mismos^[25]. Este ensayo fue realizado por triplicado para cada muestra y se llevó a cabo un análisis ANOVA para determinar diferencias entre las mismas.

2.4 Análisis de hinchamiento

El grado de hinchamiento de los andamios se determinó mediante un procedimiento gravimétrico simple^[26]. Se procedió a pesar las muestras en seco (P_s) con balanza analítica para luego dejarlas por 24 horas en agua bidestilada. Transcurrido este tiempo, los andamios fueron retirados y escurridos ligeramente para retirar el agua excedente. Inmediatamente después, fueron pesados por segunda vez y se estableció el peso húmedo (P_H). De la misma manera que el ensayo de degradación enzimática, esta prueba fue realizada por triplicado para cada andamio.

El porcentaje de hinchamiento se determinó mediante la siguiente ecuación^[26]:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{P_H \times 100}{P_s}$$

Por último, se realizó un análisis ANOVA para determinar diferencias entre las muestras.

2.5 Análisis de la porosidad

Con el objetivo de determinar la capacidad de penetración del etanol en los andamios, se llevó a cabo el análisis de porosidad. Al igual que en el ensayo anterior, se tomó el peso en seco (P_0) de los andamios en balanza analítica. Posteriormente, los constructos se dejaron reposar 24 horas inmersos en etanol a temperatura ambiente para luego ser pesados nuevamente (P_1).

Una vez obtenido los valores, se calculó el porcentaje de porosidad con la siguiente fórmula^[27]:

$$\text{Porosidad (\%)} = \frac{(P_1 - P_0)\delta_1}{P_0\delta_2 + (P_1 - P_0)\delta_1} \times 100$$

Donde δ_2 y δ_1 representan la densidad del etanol (0,798 g/ml) y la del andamio (1,358 g/ml) respectivamente.

Nota: Para determinar la densidad del andamio, se tuvo en cuenta la densidad de sus componentes (colágeno 1,32 g/ml y AH 1,8 g/ml) como así también la concentración de los mismos en el andamio.

De la misma manera que en los ensayos precedentes, se realizó un análisis ANOVA para determinar diferencias entre las muestras.

2.6 Análisis de solubilización en medio de cultivo a 37 °C

Una vez finalizados los ensayos de hinchamiento y porosidad, los andamios fueron sometidos a una prueba final de solubilización en medio de cultivo a 37 °C. Este ensayo simula las condiciones fisiológicas a las cuales estarían sometidos los

andamios *in vivo*. Para ello, los constructos fueron incubados en un medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) (*Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ*) durante 72 hs a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se extrajo el medio de cultivo y se lavó cuatro veces a los andamios con agua destilada. Después de cada lavado se centrifugó a 5000 xg. Luego las muestras se dejaron secar 24 hs en estufa, también a 37°C. Seguidamente, se tomó el peso de los constructos con balanza analítica (por triplicado). Así, el porcentaje de degradación, fue determinado con el peso residual de los andamios, y fue expresado como porcentaje del peso inicial de los mismos. El ensayo se realizó por triplicado y finalmente se llevó a cabo un análisis ANOVA.

2.7 Ensayo de Citotoxicidad con células Vero

Este ensayo fue realizado por el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (*IIBYT, CONICET-UNC*). Se evaluó la citotoxicidad de los andamios según el ensayo propuesto por la norma ISO 10993-5 (2009)^[28], utilizando extractos de las muestras según ISO 10993-12 (2012)^[29]. Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular basándose en la reducción de bromuro 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.

El MTT es una sal color amarilla, la cual es captada por las células y reducida por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su estado insoluble: Formazán, constituyendo cristales azules insolubles en agua. No obstante, éstos pueden disolverse con isopropanol. De esta forma, puede cuantificarse la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico (cambio de coloración del amarillo al azul como consecuencia de la reacción). La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular (proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazán en solución).

La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT después de ser tratadas con un extracto del constructo a evaluar, permite obtener información acerca de la toxicidad de este compuesto.

Siguiendo la normativa, se utilizó una de las líneas celulares sugerida para evaluar toxicidad de materiales para uso médico: la línea celular Vero de origen epitelial.

Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (*PAA, Pasching, Austria*), 4 mM de L-Glutamina (*Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ*), 4 mM de Piruvato de Sodio (*Sigma, St. Louis, USA*), 10.000 unidades/ml de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomina. La placa fue incubada a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24h para la formación de una monocapa de células.

Para obtener los extractos de los andamios, 3,5 mg de éstos fueron incubados por mililitro de DMEM durante 72hs a una temperatura de 37°C. Cuatro diluciones para cada extracto fueron ensayadas, a concentraciones de 100, 75, 50 y 25% respectivamente.

Las células Vero fueron sembradas en una placa de 96 pocillos con una densidad de 10.000 células/pocillo e incubadas con DMEM suplementado durante 24 hs. Luego, el medio de cultivo fue retirado y se les adicionó las diferentes diluciones del extracto de cada andamio. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Células incubadas con DMEM suplementado durante todo el ensayo fueron utilizadas como control negativo de citotoxicidad; y además se realizó un control positivo con una solución de Fenol al 0,2%. Estos controles fueron realizados por sextuplicado.

Una vez transcurridas 24h de cultivo de las células con el extracto, el mismo fue retirado de la placa y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. A todas las muestras ensayadas se les agregó MTT con una concentración final de 1 mg/ml en buffer fosfato salino y fueron incubadas a 37°C durante 1:30 hs. Las absorbancias de las muestras fueron leídas en un lector de microplacas (*MultiskanSpectrum, ThermoScientific*) a 595 nm y el porcentaje de viabilidad celular

fue obtenido como la relación porcentual entre la absorbancia (*densidad óptica, DO*) de las células tratadas y la absorbancia de las células de control.

Por último, se llevó a cabo un análisis ANOVA de comparación múltiple para evaluar la interacción del AH, el tratamiento DHT y la concentración del extracto.

2.8 Ensayo de Citotoxicidad con células NIH 3T3

Este segundo ensayo de citotoxicidad fue realizado exactamente de la misma manera y con los mismos parámetros que el precedente (también según ISO 10993-5), la única diferencia fueron el tipo de células utilizadas. En este ensayo, se utilizó la línea *NIH 3T3* de origen fibroblástico.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar. Los datos se analizaron usando ANOVA de una o de dos vías, seguido por una prueba a posteriori de comparación de medias individuales Tukey, con el software *GraphPadPrism*. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ representa una diferencia significativa entre los valores de las medias. El número de muestras por cada ensayo fue de 3 ($n=3$)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

3.1 Obtención de los andamios

A continuación se muestran imágenes de los andamios impresos antes y después de los procesos de liofilización y tratamiento DHT. En las imágenes se aprecia que ningún constructo sufrió alteraciones de morfología y tamaño en ninguno de los dos procesos.

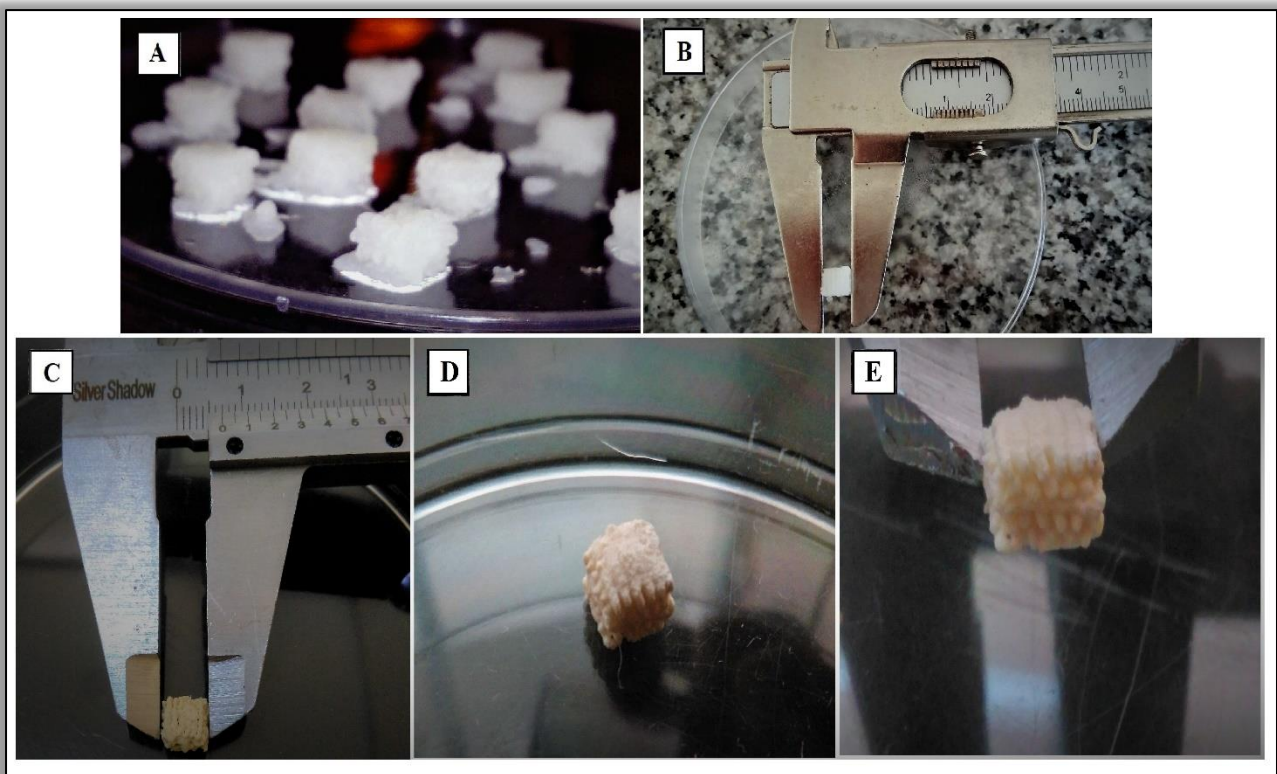


Figura 12: A y B: Andamios de colágeno y ácido hialurónico antes de los tratamientos de liofilización y dehidrotermal. C: Andamio de colágeno y ácido hialurónico luego de tratamientos DHT y liofilizado. D y E: Andamios de colágeno luego de tratamientos DHT y liofilizado

3.2 Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 13, se observan los espectros de los andamios y, por encima, el de sus componentes por separado.

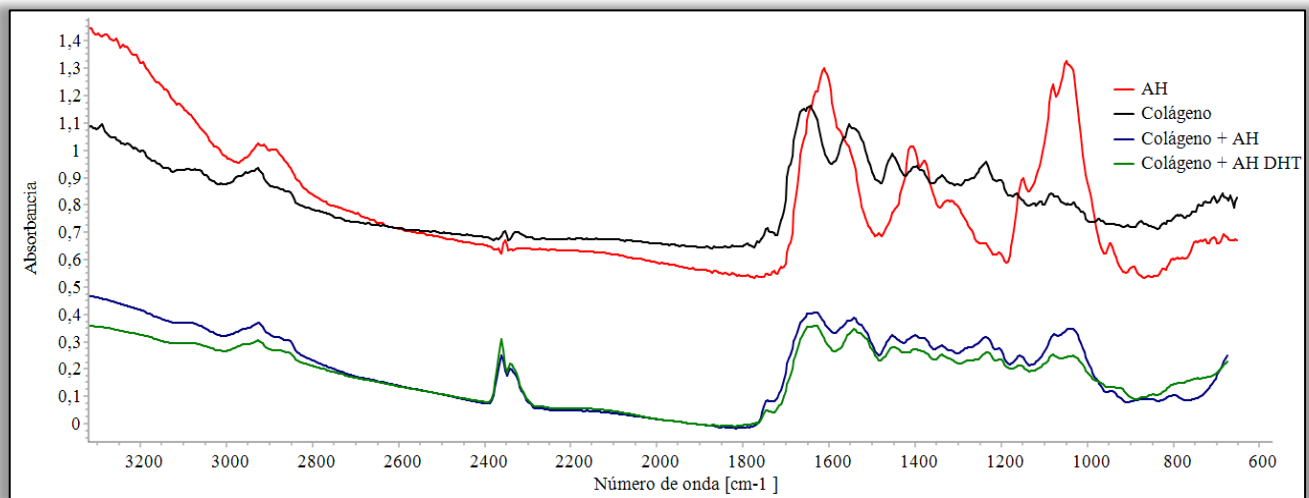


Figura 13: Espectros de absorción de los componentes (AH y C) y de los andamios por debajo

En primer lugar, se aprecia en los espectros de los andamios, los componentes tanto del colágeno como del ácido hialurónico. Sin embargo, es notable la similitud entre los espectros de los andamios con el espectro del colágeno puro. Esto era de esperar ya que en los andamios, el colágeno está aproximadamente 10 veces más concentrado.

Por otro lado, entre las frecuencias de 970 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} se observa un pico característico en el espectro del AH, correspondiente a vibraciones de uniones ésteres, propio de los glicosaminoglicanos. De igual manera, estas bandas correspondientes a enlaces entre grupos carboxilo e hidroxilo de colágeno y GAG estuvieron presentes en los espectros de los andamios con y sin tratamiento DHT.

Estas últimas, son indicios de entrecruzamiento entre el colágeno y el ácido hialurónico^[30].

Una de las formas de monitorear la formación de enlaces cruzados durante el tratamiento, y por consiguiente el grado de entrecruzamiento, consiste en analizar el pico de absorbancia de amida II a aproximadamente 1550 cm⁻¹ (P₁). Este valor de absorbancia, es proporcional a los enlaces NH₂ que son convertidos a NH durante el entrecruzamiento por reacciones de condensación. Una disminución en el valor de absorbancia a 1550 cm⁻¹ corresponde a un aumento de enlaces cruzados^{[30][14]}.

De igual modo, se evalúa el pico de absorbancia en 1236 cm⁻¹(P₃) de amida III correspondiente a los grupos -CH₂ de la glicina y prolina de las cadenas laterales del tropocolágeno. Es posible entonces, utilizar este valor para estimar los cambios en la estructura de triple hélice de la molécula y, por consiguiente, determinar el grado de desnaturalización que sufrieron los andamios durante el tratamiento^[8].

Con el objetivo de normalizar los espectros, se utilizó el pico de absorbancia de 1450 cm⁻¹ (P₂) como referencia. Este pico se reporta como invariante en la bibliografía en cuanto a su frecuencia e intensidad, por lo que se lo utilizó para confeccionar los siguientes índices^{[8] [14] [30]}:

$$\frac{P_2}{P_1} \quad \frac{P_3}{P_2}$$

Donde P₂/P₁ se utilizó para estimar el porcentaje de entrecruzamiento y P₃/P₂ el grado de desnaturalización de las muestras de colágeno.

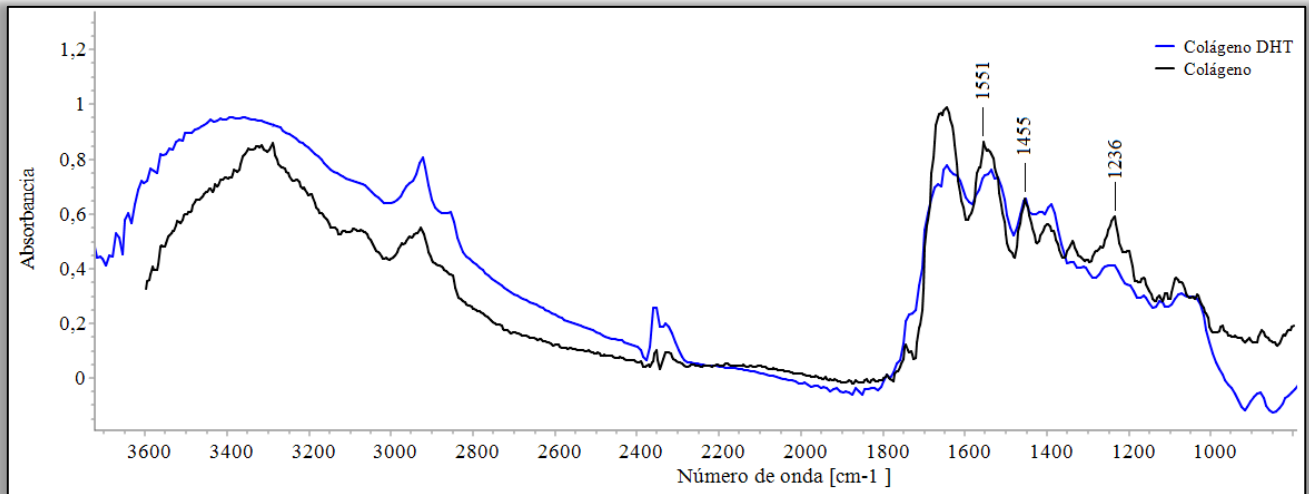


Figura 14: Espectros de absorbanca de los andamios de colágeno sin tratar (negro) y colágeno con tratamiento DHT (azul)

Los valores para el andamio de colágeno fueron:

$$\frac{P_2}{P_1} = 0,7748 \quad \frac{P_3}{P_2} = 0,9208$$

Mientras que los del andamio de colágeno DHT fueron:

$$\frac{P_2}{P_1} = 0,9020 \quad \frac{P_3}{P_2} = 0,7464$$

Un aumento de la relación P_2/P_1 implica un mayor entrecruzamiento puesto que disminuye la absorbanca de P_1 . Se procedió a calcular un porcentaje de

entrecruzamiento con respecto al andamio que no fue sometido al tratamiento, el cual se asumió como 0%. Respecto a la desnaturalización, el valor 0,9208 fue asumido también como 0% ya que se trata del andamio sin tratar (colágeno con estructura terciaria intacta). Valores inferiores a éste, representan un porcentaje de desnaturalización.

El porcentaje de entrecruzamiento fue de 16% y el de desnaturalización de 18%. Ambos valores están dentro de los rangos para los parámetros elegidos del tratamiento según la bibliografía^[8].

Otra forma de evidenciar la desnaturalización, es observando el corrimiento de la banda de amina II en frecuencias. La misma se trasladó de 1551 cm^{-1} en el colágeno sin tratar a 1536 cm^{-1} en el colágeno tratado. Estos desplazamientos se observaron en todos los andamios analizados^{[8][15][32]}.

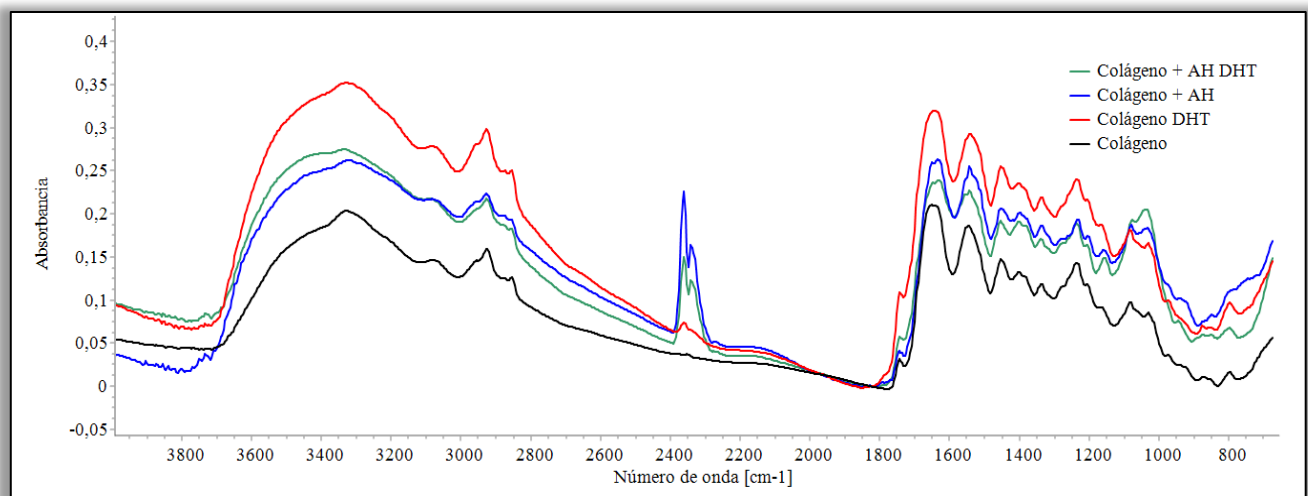


Figura 15: Espectros de absorción de los andamios de Colágeno (negro), Colágeno DHT (rojo), Colágeno + AH (azul) y Colágeno + AH DHT (verde)

Al observar los espectros de los andamios antes y después del tratamiento, se constató que ningún componente fue agregado a los mismos, tampoco hubo alteración de ningún grupo funcional de los compuestos durante el tratamiento DHT. Esto es propio de los métodos de entrecruzamiento de longitud cero (*zero-length methods*)^[8] [32].

Es importante destacar que la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier fue una herramienta de gran utilidad a la hora de cuantificar los resultados del tratamiento. Adicionalmente, los parámetros elegidos para el tratamiento DHT dieron como resultado porcentajes de entrecruzamiento y desnaturalización que se encuentran dentro de un rango aceptable.

No obstante, la bibliografía indica que si se quisiera aumentar el grado de entrecruzamiento de los andamios, se podría conseguirlo incrementando la temperatura del tratamiento DHT, sin embargo, esto traerá aparejado un aumento en la desnaturalización del colágeno. Como ambos fenómenos ocurren en simultáneo durante el tratamiento, resulta interesante cuantificarlos para los parámetros de temperatura y tiempo elegidos^[8].

3.3 Microscopía de barrido electrónico

La biocompatibilidad de un andamio utilizado en ingeniería en tejidos depende, entre otras características, de la topografía de la superficie y el interior del constructo. La presencia de poros y fibras en andamios favorece la integración del mismo con los tejidos circundantes ya que promueven la proliferación y la infiltración celular dentro del constructo.

Así mismo, para obtener una adhesión celular adecuada, es necesario controlar las microestructuras de poros (forma, tamaño y distribución) y fibras del andamio^[27].

Por lo expuesto anteriormente, los andamios han sido analizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en su superficie y en su sección transversal.

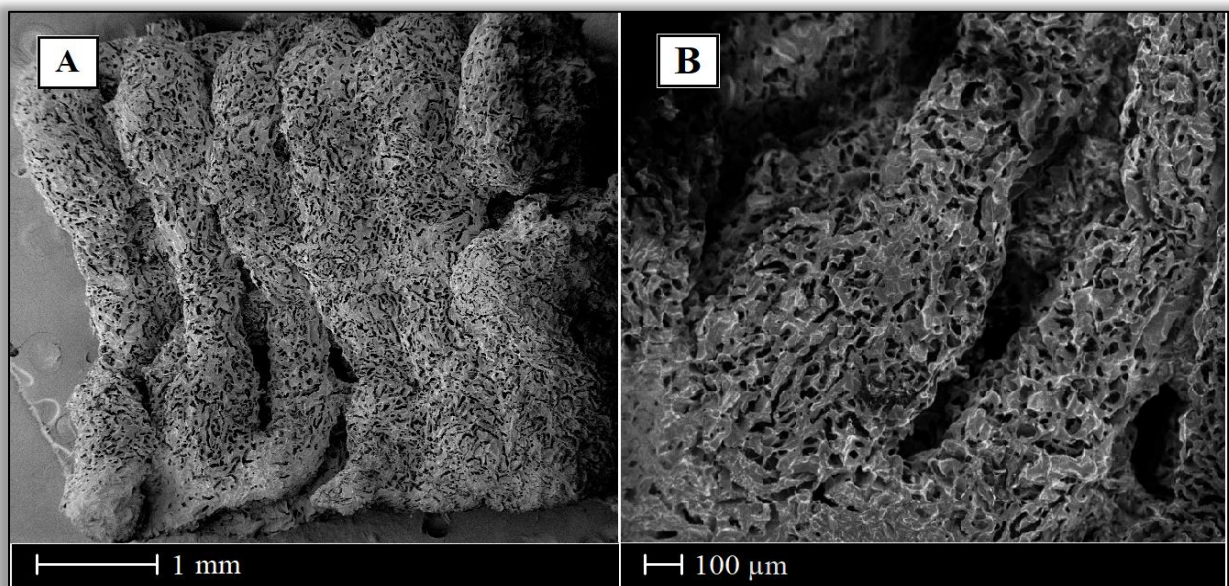


Figura 16: Imágenes SEM de la superficie de andamios de colágeno sin tratamiento DHT a distintas magnificaciones A: 128X B: 394X

La figura 16 muestra la superficie de los andamios. En ambas imágenes se distingue el patrón en forma de “rejilla” con el que fueron impresos los constructos. Con el objetivo de diseñar macro poros en los andamios, las hebras del material extruido durante la impresión fueron de 500 μm (que fue el diámetro de la aguja utilizada) y las canaletas que separan dichas hebras tienen un ancho de 350 μm aproximadamente.

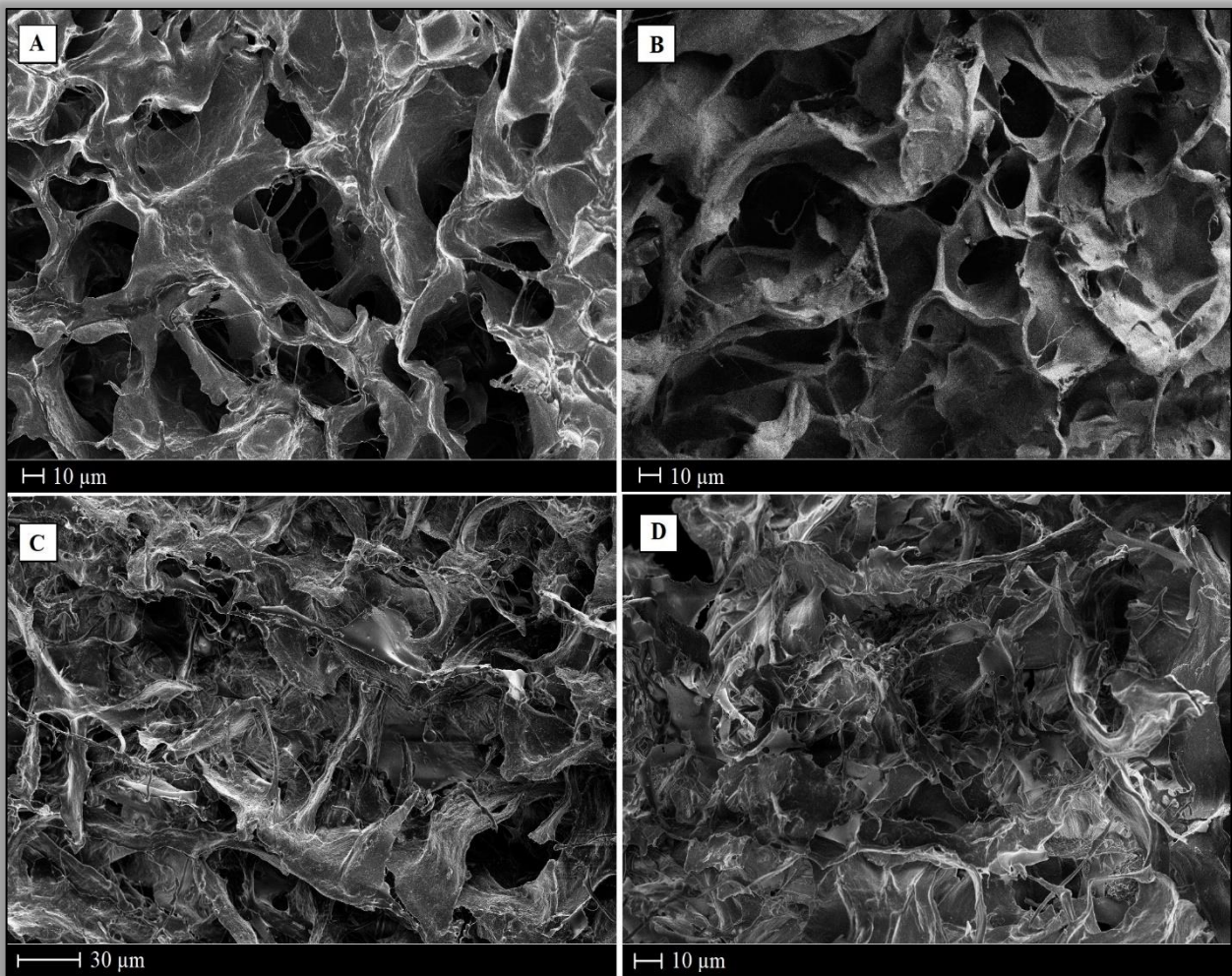


Figura 17: Imágenes SEM de las secciones transversales de los andamios. A: Colágeno. B: Colágeno con tratamiento DHT. C: Colágeno y Ácido Hialurónico. D: Colágeno y Ácido Hialurónico con tratamiento DHT

En la figura 17 se observan los cuatro tipos de constructos, con una morfología de poros bien interconectados y distribuidos. Como indica la bibliografía, los parámetros de la liofilización (en particular la velocidad de enfriado y la temperatura final) determinan, en gran medida, las dimensiones de los poros que tendrán los andamios. Mientras menor sea la temperatura final de liofilizado, más chicos serán los diámetros de los poros^{[14][13]}.

Con respecto a las dimensiones de las fibras, éstas se encuentran en el orden de los nanómetros. En la figura 18 se muestran imágenes con mayor aumento de los constructos donde se ven las fibras.

Por otra parte, las imágenes SEM también sirvieron para obtener información cuantitativa de los andamios. Los diámetros de poros y fibras como así también el porcentaje de porosidad de los andamios fueron medidos con el software *ImageJ*. Todos los andamios fueron analizados en su superficie y en su sección transversal. En la tabla I se muestran los resultados de las mediciones de las secciones transversales y en la figura 19 se indica la distribución de tamaños de poros también de la sección transversal de los andamios.

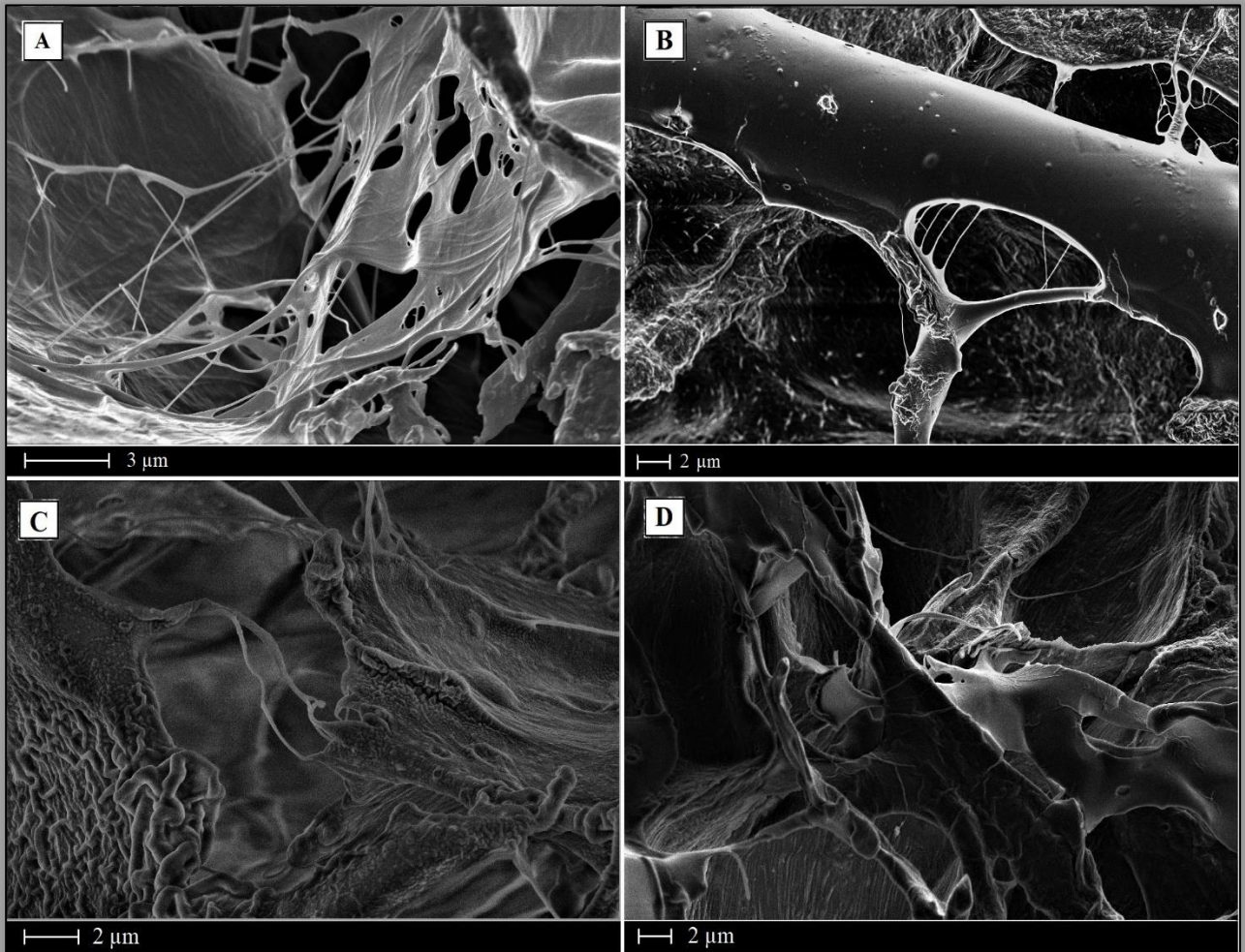


Figura 18: A: andamio de colágeno. B: andamio de colágeno y ácido hialurónico. C: andamio de colágeno con tratamiento DHT. D: andamio de colágeno y ácido hialurónico con tratamiento DHT

Tabla I : Resumen de dimensiones de andamios en secciones transversales

Andamios				
	Colágeno	Colágeno DHT	Colágeno y Ácido Hialurónico	Colágeno y Ácido Hialurónico DHT
Diámetros de Poros [μm]				
Mínimo	16,79	4,76	2,24	5,60
Máximo	59,96	47,65	112,80	78,10
Media ^a	32,83 \pm 1,90	18,27 \pm 0,98	11,74 \pm 2,88	24,76 \pm 1,37
Diámetros mínimos de Fibras [μm]				
	58	114	134	20
Porosidad [%]				
	29,51	34,71	39,60	32,15

a: Las medidas se presentan como la media \pm error estándar.

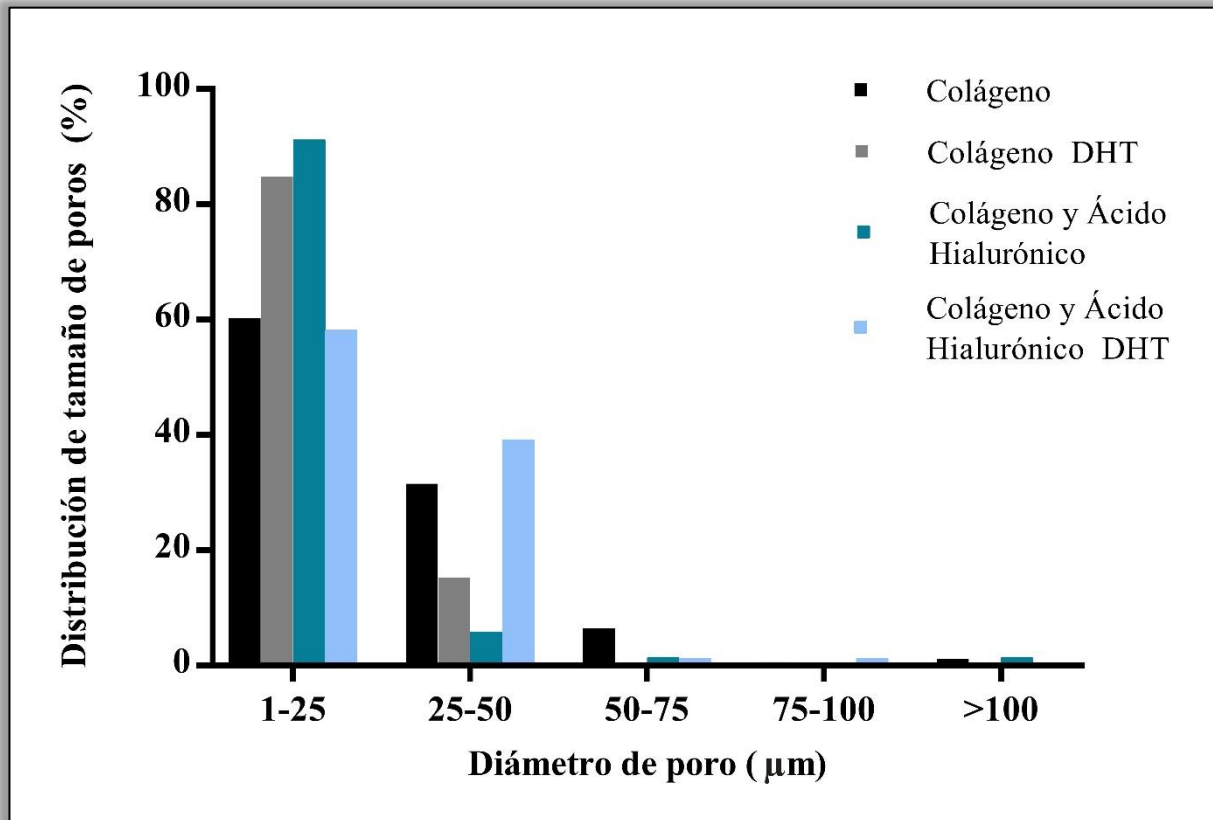


Figura 19: Distribución de tamaño de poros de los andamios

En primer lugar, se observa que la mayoría de los poros poseen un diámetro inferior a 25μm para todos los andamios. Sumado a esto, los gráficos indican que las poblaciones de poros con diámetros mayores a 100 μm también aparecen en los andamios de colágeno y colágeno con AH.

Con respecto al porcentaje de porosidad, se indica en la tabla 1 que el valor de las muestras oscila en un 30% independientemente de la presencia de ácido hialurónico o del tratamiento DHT.

Todos los andamios contienen fibras de diferentes tamaños en el rango de los nanómetros. Sin embargo, aquellos donde hay mayor número de fibras y de menor tamaño son los que contienen ácido hialurónico y fueron sometidos al tratamiento.

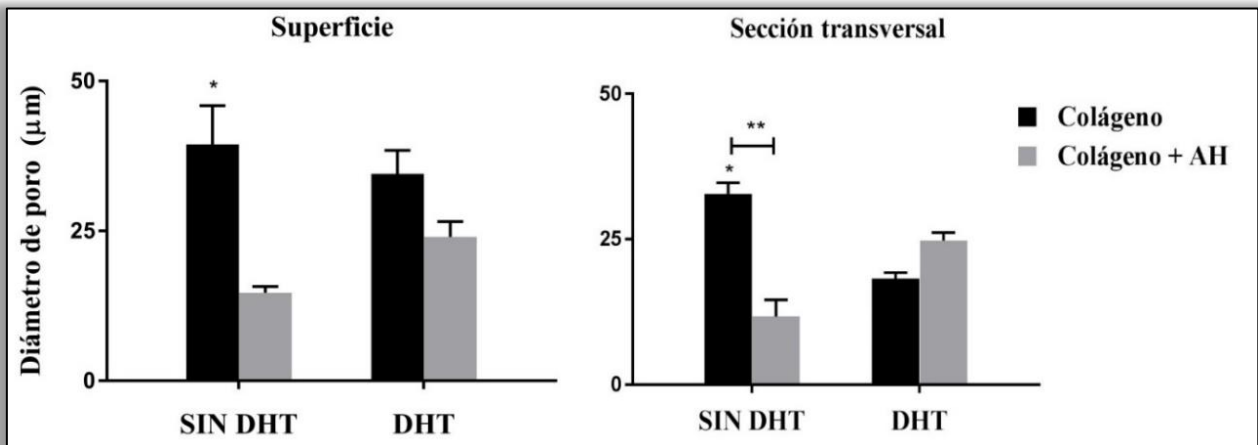


Figura 20: Promedio de los diámetros de los andamios en la superficie y sección transversal de los mismos. * Colágeno significativamente diferente a Colágeno + AH del grupo SIN DHT. ** Grupo SIN DHT significativamente diferente a grupo DHT. Las barras representan la media \pm error estándar.

En la figura 20 se aprecia que la media del tamaño de poros se comporta de manera distinta en la superficie y en la sección transversal de los andamios. Esto fue comprobado con el análisis ANOVA de la superficie por un lado, y de la sección transversal por otro.

En la superficie, la única variable que tuvo un efecto significativo en el diámetro de poros fue la presencia del ácido hialurónico ($p = 0,002$), mientras que en la sección transversal, tanto la presencia del ácido hialurónico ($p < 0,0001$) como el tratamiento DHT ($p < 0,0001$) hicieron diferir las medidas del diámetro de poro de todas las poblaciones sometidas al análisis.

Los resultados indican que el agregado de AH tiende a disminuir la media de los diámetros de los poros de los andamios de colágeno. Por otro lado, el tratamiento DHT aumenta ligeramente la media del diámetro de poro (tanto en la superficie como en la sección transversal) de los andamios de colágeno con AH. Lo opuesto ocurre con los andamios de colágeno.

Las dimensiones de los poros pueden afectar la migración celular, el flujo de nutrientes y la remoción de desechos a través de los andamios, motivos por los cuales son un factor decisivo a la hora del diseño de los mismos^[34]. La figura 19 muestra que aproximadamente el 80% de los diámetros de los poros de los andamios están por debajo de los 50 μm en todos los constructos, esto denota una buena relación área/volumen.

Podemos concluir que la presencia de ácido hialurónico y el tratamiento DHT influyen en el diámetro de los poros de los constructos. La bibliografía indica que el origen y el tipo de colágeno, junto con el liofilizado, también están relacionados a las dimensiones finales de éstos^{[13][27][35]}.

Por último, se observó que estas medidas de poros (comprendidas entre 20 y 120 μm) son adecuadas para una buena adhesión y proliferación celular; y los constructos podrían utilizarse como base de cultivo celular en regeneración dérmica^[13]. A su vez, los macros poros, cuyas dimensiones exceden los 250 μm , diseñados con impresión 3D, son los indicados en regeneración ósea y son necesarios además para la vascularización del constructo^[13].

3.4 Análisis de degradación enzimática

Lo que se observó en los resultados fue confirmado por el análisis estadístico, que se observa en la tabla II y figura 21.

El mismo indicó que el tratamiento DHT vuelve a los andamios de colágeno más resistentes a la acción de la colagenasa ($p=0,0022$). Concretamente, estos andamios tratados fueron degradados un 8% menos con respecto a los que no fueron sometidos al tratamiento.

Para los andamios de colágeno y AH, este fenómeno se volvió a repetir ($p= 0,05$) y los mismo fueron degradados un 5% menos con respecto a los andamios que no tuvieron tratamiento DHT por la enzima colagenasa.

Tabla II: Resultados del ensayo de degradación enzimática

	Peso inicial [mg]	Peso final [mg]	% Remanente	% Degradado
C	2,83±0,33	0,15±0,07	5,23±1,85	94,77±1,85
C + AH	2,55±0,17	0,17±0,01	6,70±0,47	93,30±0,47
C DHT	2,03±0,4	0,25±0,05	12,14±0,67	87,86±0,67
C + AH DHT	2,64±0,23	0,28±0,07	10,62±2,03	89,38±2,02

Las medidas se presentan como la media \pm error estándar.

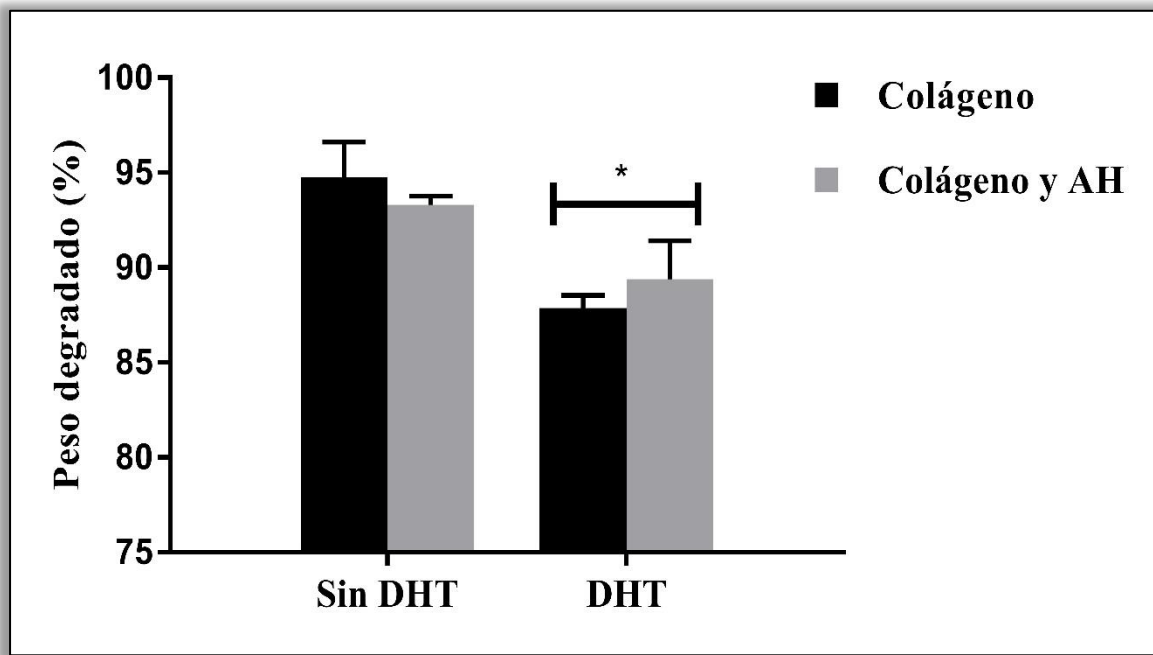


Figura 21: Ensayo de degradación enzimática. *Grupo Sin DHT significativamente diferente a grupo DHT. Las barras representan la media \pm error estándar.

La bibliografía^[24], señala que la resistencia a la degradación enzimática de los andamios es influenciada principalmente por el método de entrecruzamiento elegido y, en menor medida, por el tipo y la concentración de colágeno. Los métodos químicos (con glutaraldehído) son los que le otorgan mayor resistencia a los constructos.

3.5 Análisis de Hinchamiento

La capacidad de hinchamiento (*Swelling ratio*) de un material, está definida como la cantidad de agua que es capaz de absorber en relación a su peso en seco. Generalmente, hidrogeles hechos de polímeros hidrofílicos y con un bajo grado de entrecruzamiento, son los que tienen mayor capacidad de hinchamiento^[36]. La capacidad de un andamio de absorber agua, se puede traducir como la cantidad de medio de cultivo celular que el constructo será capaz de incorporar durante el cultivo. Por consiguiente, esta propiedad influenciará significativamente las características del cultivo, como la difusión de nutrientes, la adhesión, el crecimiento y la diferenciación celular entre otras^[33].

En la tabla III y la figura 22, pueden observarse los resultados de este ensayo

Tabla III: *Resultados del análisis del hinchamiento*

	Peso seco [mg]	Peso húmedo [mg]	% de Hinchamiento
C	2,58±0,55	52,03±10,61	2027,99 ± 171,81
C DHT	3,33±0,32	31,83±8,94	968,72 ± 331,39
C + AH DHT	7,36±2,67	40,44±6,35	587,59 ± 158,63

Las medidas se presentan como la media ± error estándar.

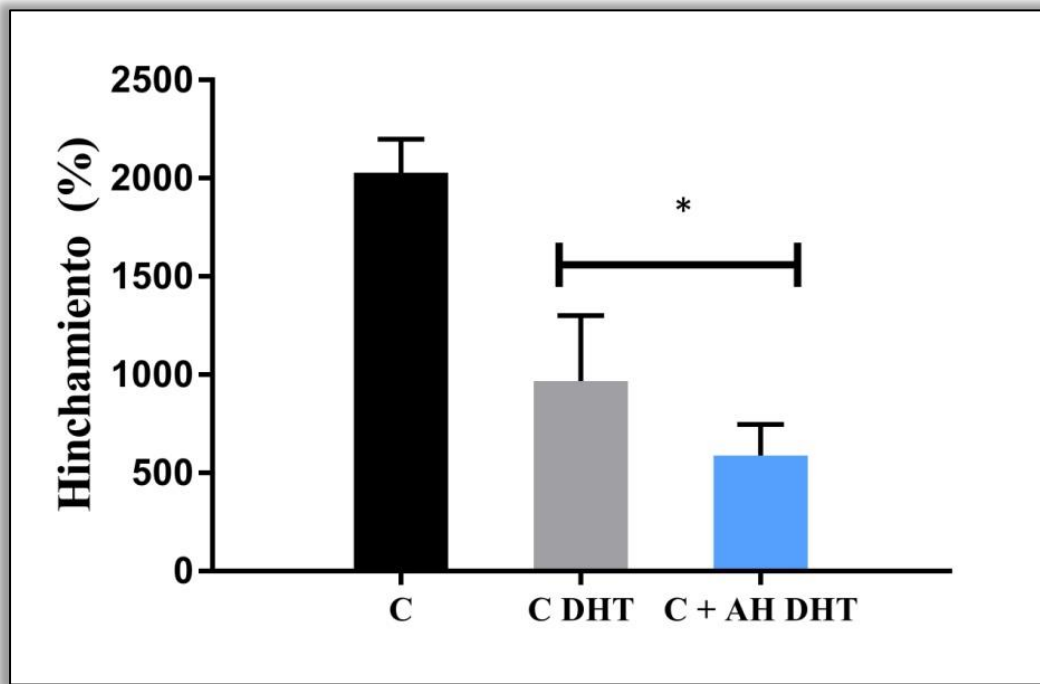


Figura 22: Análisis de hinchamiento en agua. *Colágeno y Colágeno + AH con tratamiento DHT significativamente diferentes respecto a colágeno sin DHT. Las barras representan la media \pm error estándar.

Durante el transcurso del ensayo, los andamios de colágeno y ácido hialurónico sin tratamiento DHT (C + AH) se deshicieron por completo, razón por la cual resultó imposible medir su peso húmedo. El ácido hialurónico, además de ser soluble en agua a temperatura ambiente, aumenta la polaridad del constructo y, por consiguiente, la capacidad de absorber agua. Es por esto, que los andamios no resistieron 24 horas sumergidos en agua.

El ensayo de hinchamiento, fue realizado para estimar de manera cualitativa el nivel de entrecruzamiento de los andamios. Una de las características que determina la capacidad de captar agua de un polímero, es su grado de entrecruzamiento. Éste, es inversamente proporcional a la capacidad de hinchamiento^[37]. Como se observa en el gráfico, las muestras sometidas al tratamiento DHT redujeron significativamente su capacidad de hinchamiento ($p < 0,003$) producto de los nuevos enlaces covalentes de la red. Para los andamios

de colágeno con tratamiento DHT, hubo una reducción de aproximadamente un 45% de su capacidad de hinchamiento.

Por otro lado, los andamios de C + AH con tratamiento DHT fueron los que mostraron su capacidad de hinchamiento más reducida y conservaron su estructura una vez retirados del agua. Esto puede deberse al entrecruzamiento adicional existente entre los grupos carboxílicos del AH y los grupos oxhidrilo y amino colágeno, con los cuales se forman uniones tipo amida y éster respectivamente^[38].

La habilidad de absorber agua de un andamio, es un aspecto decisivo a evaluar en ingeniería de tejidos. Es importante subrayar la importancia del entrecruzamiento para andamios de colágeno y AH. Este ensayo demostró la efectividad del tratamiento para preservar la morfología de estas matrices poliméricas a la hora de embeberlas en líquido durante un largo período de tiempo.

Aunque la capacidad de absorber agua de un andamio depende de la temperatura, presión del líquido, naturaleza del polímero y pH del medio entre otros, el grado de entrecruzamiento juega un papel crucial en esta propiedad. La disminución en la capacidad de hinchamiento de los andamios DHT con AH sugiere que este polisacárido incrementa el nivel de entrecruzamiento de los constructos. A pesar de aumentar la polaridad de la red polimérica, disminuye la hidrofiliidad del conjunto^[38].

Junto con la porosidad y el estudio de los diámetros de los poros, estos análisis revelan el comportamiento de la estructura interna y la morfología del andamio. Pese a que el entrecruzamiento es crucial para reforzar las propiedades de los andamios, aumentar la temperatura del tratamiento DHT para obtener mejores rendimientos, puede afectar la perfusión de los líquidos en la matriz polimérica y por consiguiente, el cultivo que se desarrolle sobre ella. Este fenómeno, es un aspecto a tener en cuenta en la elaboración de andamios para ingeniería en tejidos.

3.6 Análisis de porosidad

Como se mencionó anteriormente, la porosidad es una propiedad de gran importancia en los andamios. De ella depende la capacidad de la matriz de integrarse en los tejidos, permitir la infiltración celular y la proliferación en su interior. El proceso de liofilización determina en gran medida la microestructura interna del constructo^[24].

Este ensayo, a diferencia de la porosidad determinada a partir de las imágenes SEM (que fue medida en dos dimensiones a partir de una imagen), midió el peso de los andamios contemplando su estructura en 3D y la interconectividad interna de los poros. De manera que son dos análisis totalmente distintos y de ahí deriva la discrepancia entre sus resultados.

El análisis estadístico ANOVA no arrojó ninguna diferencia significativa entre la porosidad de los andamios y los resultados se muestran en la tabla IV y figura 23.

Tabla IV: *Resultados del ensayo de porosidad*

	P₀ [mg]	P₁ [mg]	% de Porosidad
C	2,72±1,04	20,84±2,84	91,67±0,03
C + AH	3,48±1,05	27,06±5,56	92,07±0,00
C DHT	2,93±1,08	30,37±10,28	93,95±0,00
C + AH DHT	5,99±1,91	35,53±1,06	89,24±0,03

Las medidas se presentan como la media ± error estándar.

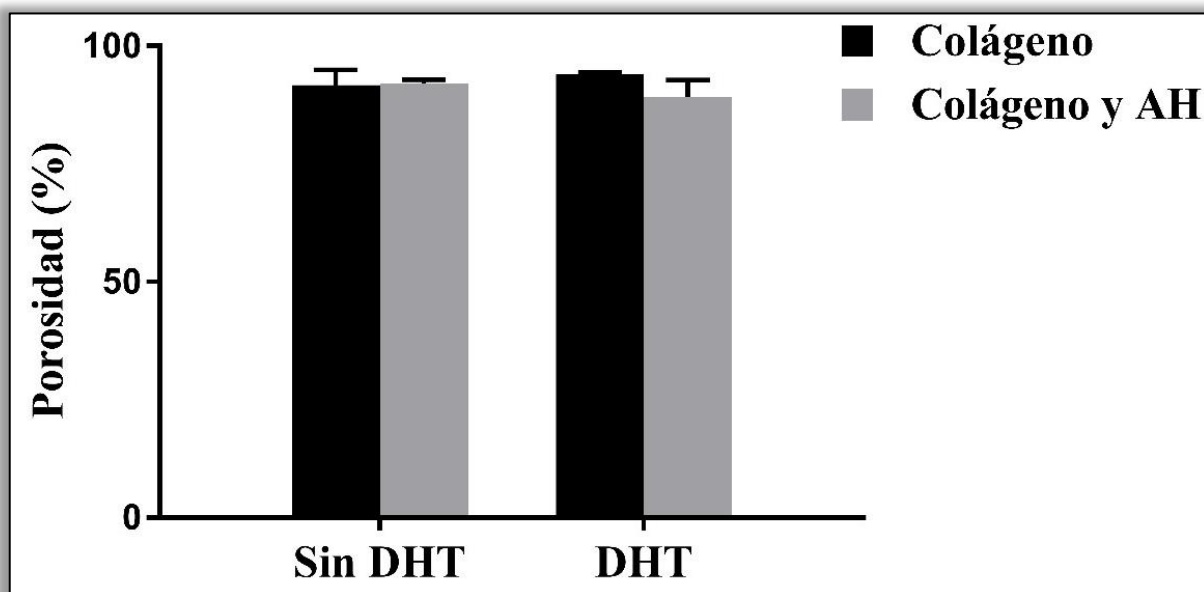


Figura 23: Análisis de porosidad. Las barras representan la media \pm error estándar.

Los valores de porosidad arrojados por este análisis, complementan a los resultados de las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para describir la morfología y microestructura interna de los constructos.

Se comprobó que tanto el tratamiento DHT como el Ácido Hialurónico no influyeron en la porosidad de los andamios. De acuerdo a la bibliografía^{[34][39]}, una porosidad del orden del 90% denota una alta relación superficie/volumen de los andamios, que los vuelve eficaces para un posterior cultivo celular.

3.7 Análisis de solubilización en medio de cultivo a 37° C

Con el fin de evaluar el comportamiento de los andamios bajo condiciones fisiológicas reales, se incubaron los diferentes andamios a 37 °C durante 72 hs con un medio de cultivo celular que simula las condiciones en las cuales se desarrollan las células. El medio tiene como componentes: aminoácidos, factores de crecimiento, hormonas, sales, glucosa y vitaminas entre otros. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla V: Resultados del ensayo de disolución en extracto de cultivo

	% Peso remanente	% Peso perdido
C	86,72 ± 7,61	13,31 ± 7,65
C + AH	30,77 ± 17,70	69,34 ± 17,75
C DHT	83,37 ± 3,54	16,68 ± 3,50
C + AH DHT	84,30 ± 1,90	15,87 ± 1,92

Las medidas se presentan como la media ± error estándar.

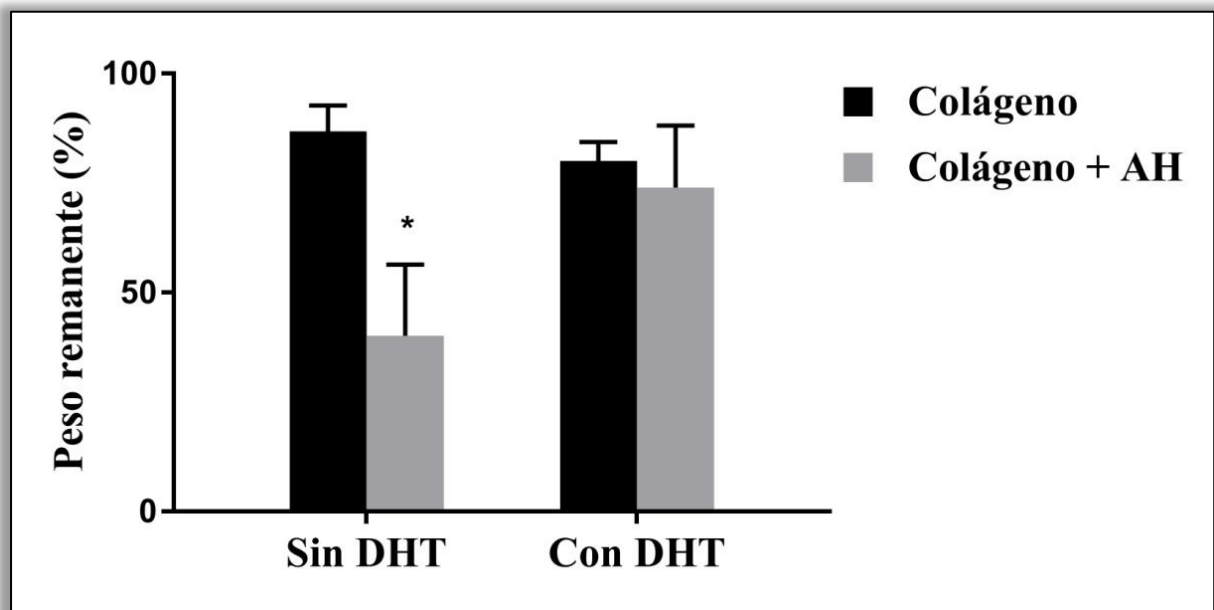


Figura 24: Análisis de disolución en extracto de cultivo. * Colágeno + AH significativamente diferente a Colágeno dentro del grupo sin DHT. Las barras representan la media \pm error estándar.

Los andamios de sólo colágeno, no evidenciaron diferencias significativas y podemos afirmar que su disolución en medio de cultivo no se vio modificada por el tratamiento DHT.

Por otro lado, los resultados mostraron que el tratamiento DHT contribuye significativamente a preservar la estructura de los andamios colágeno + AH. Estos andamios sin tratar, pierden más del 50% de su estructura luego de 72hs en medio de cultivo. Este porcentaje disminuyó notablemente en los constructos a los cuales se les realizó el tratamiento DHT. Adicionalmente, en el grupo sin DHT, los andamios de Colágeno + AH evidenciaron diferencias estadísticas en su peso ($p < 0,001$) con respecto a los andamios de Colágeno. Se observó que la adición de AH provoca la disolución de los andamios en aproximadamente un 56% más.

Por último, es importante distinguir la utilidad de este análisis para conocer de manera aproximada cómo se comporta la estabilidad de los constructos en fluidos fisiológicos a 37°C.

3.8 Ensayo de Citotoxicidad con células Vero

La citotoxicidad de los andamios fue analizada con células Vero incubadas en presencia de distintas concentraciones del extracto a través del ensayo de MTT, como se mencionó en la sección Materiales y Métodos.

El porcentaje de viabilidad celular fue calculado de la siguiente manera:

$$\% Viabilidad = \frac{D.O. [células tratadas]}{D.O. [células control]} \times 100$$

Donde D.O. significa densidad óptica.

Los resultados obtenidos para las células cultivadas en contacto con el extracto de los andamios evaluados en cada una de sus diluciones (25, 50, 75 y 100 %) se muestran a continuación en la figura 25. Se graficó adicionalmente un control positivo (CP).

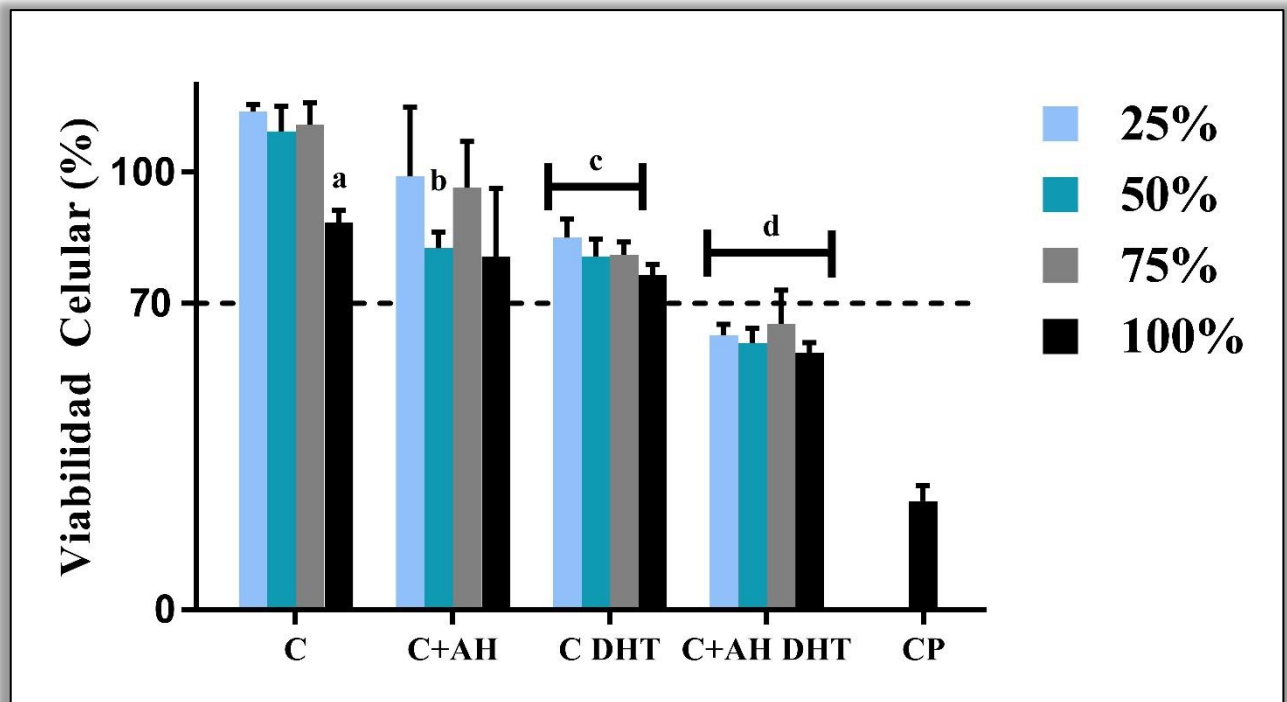


Figura 25: Ensayo de citotoxicidad con células Vero. Las barras representan la media \pm error estándar

- Los andamios de colágeno, en una concentración de 100% de extracto, mostraron un comportamiento diferente ($p < 0,011$) respecto a sus concentraciones más bajas (grupo C). Esto se traduce como una disminución de la viabilidad celular en concentraciones de 100% de extracto.
- La adición de AH en los andamios (grupo C+AH), únicamente mostró un comportamiento estadístico diferente de los correspondientes andamios de colágeno (Grupo C, $p = 0,0004$) en la concentración de 50% de extracto.
- Los andamios de colágeno con tratamiento DHT (Grupo C DHT), evidenciaron diferencias con respecto a las respectivas concentraciones de extracto del grupo colágeno (Grupo C, $p < 0,0001$) en todas las concentraciones de extracto, excepto en la de 100%.
- Los andamios de colágeno con AH sometidos al tratamiento DHT (Grupo C+AH DHT), resultaron diferentes ($p < 0,004$) en todas las concentraciones de extracto respecto a los grupos precedentes (C, C+AH, C+AH DHT).

Este ensayo demostró que los andamios no son citotóxicos para células Vero según la norma ISO 10993-5 exceptuando los andamios de C + AH DHT.

Al observar los gráficos y los resultados del análisis ANOVA se comprobó que la presencia de AH y el tratamiento DHT disminuyen la viabilidad celular de los

andamios pero ninguno por debajo del 70%. Sin embargo, estos dos parámetros juntos, vuelven a los andamios citotóxicos según la norma ISO 10993-5.

Estos resultados, pueden deberse a la línea celular con la que se realizó la prueba, que es de origen epitelial.

3.9 Ensayo de Citotoxicidad con células NIH 3T3

Con el objetivo de evaluar si la causa de citotoxicidad positiva del ensayo anterior se debió al tipo de células utilizadas, se repitió el ensayo esta vez con fibroblastos NIH 3T3. De la misma manera, se prepararon 4 diluciones como en el ensayo anterior. La figura 26 muestra los resultados obtenidos:

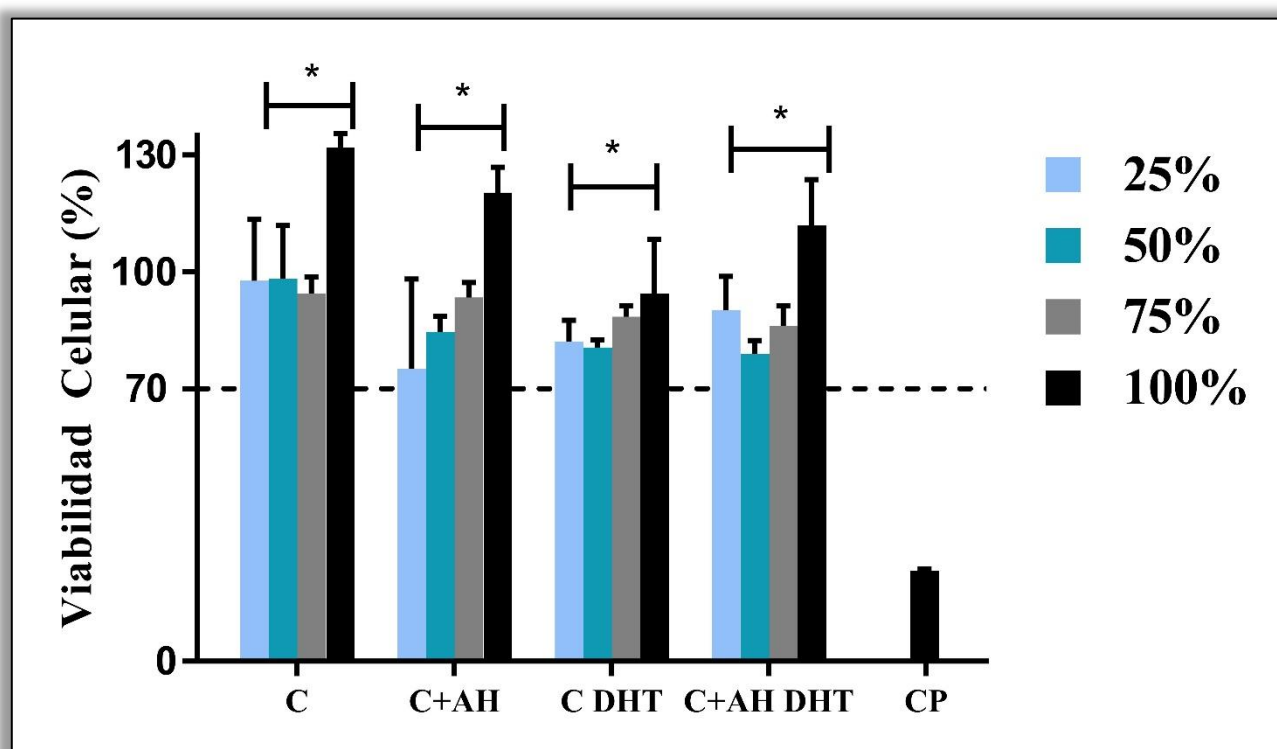


Figura 26: Ensayo de citotoxicidad con células NIH 3T3. C: colágeno. C+AH: colágeno + ácido hialurónico. C DHT: colágeno con tratamiento DHT. C+AH DHT: colágeno + ácido hialurónico con tratamiento DHT. CP: control positivo. Las barras representan la media \pm error estándar. * Todos los grupos diferentes al CP

Este nuevo estudio demostró que ningún constructo resultó citotóxico para las células NIH 3T3, ya que todos los valores de viabilidad celular se encuentran por encima del 70% exigido por la Norma ISO 10993-parte 5. La medición del pH de los extractos indicó que no hubo variaciones del mismo, el cual se mantuvo en 7,4.

De los dos análisis de citotoxicidad llevados a cabo, podemos concluir que únicamente resultan citotóxicos los andamios C+AH DHT para las células epiteliales VERO, mientras que no mostraron citotoxicidad frente a células fibroblásticas NIH 3T3. Esto se puede explicar por el distinto origen de las líneas celulares empleadas; las células fibroblásticas en la matriz extracelular de los tejidos son las que se encuentran en íntimo contacto con colágeno tipo I y ácido hialurónico, ambas macromoléculas muy abundantes en la matriz extracelular. Mientras que las células epiteliales se encuentran adheridas a la lámina basal, principalmente formada por colágeno tipo IV y fibras reticulares de colágeno tipo III^[40].

4. CONCLUSIONES

En este proyecto, se lograron imprimir los dos tipos de andamios propuestos: colágeno y colágeno con ácido hialurónico. Luego de impresos, se comprobó que los constructos preservaron la estructura de “entretelado” con la que fueron diseñados. Esto indicó que los hidrogeles preparados tienen un comportamiento adecuado para la impresión de andamios 3D de uso biomédico.

Una vez impresos, los andamios fueron sometidos a un tratamiento dehidrotermal para así generar uniones de entrecruzamiento covalentes en los mismos, que mejoren sus propiedades físicas y su tiempo de biodegradabilidad. El aumento del entrecruzamiento de los constructos fue demostrado por la espectrometría infrarroja, la cual indicó que hubo un incremento del 16% de los enlaces covalentes en la red polimérica. Los ensayos de degradación enzimática y disolución en medio de cultivo reafirman estos resultados. Por su parte, el análisis de hinchamiento en agua demostró la importancia del entrecruzamiento de los andamios de colágeno y AH para preservar la estructura de los mismos.

El estudio de las dimensiones de los poros, reveló que los andamios poseen poblaciones con diámetros que van desde los 25 μm (en mayor medida) hasta los 350 μm (estos últimos diseñados con impresión 3D). Se observó también que la adición de AH tiende a disminuir la media de los diámetros de los poros mientras que el tratamiento DHT tiende a aumentarlos. La interconectividad de los poros y el alto porcentaje de porosidad de los constructos fueron probados con el análisis de inmersión en etanol. El amplio rango en las dimensiones de los poros de los constructos, mejora la adhesión y proliferación celular como así también la vascularización del andamio (gracias a los macroporos). Adicionalmente, los ensayos de citotoxicidad demostraron que ni el ácido hialurónico ni el tratamiento DHT son citotóxicos para células fibroblásticas NIH 3T3.

Dentro de las aplicaciones, además de servir como base y sustento de cultivos celulares para cartílago, piel, hueso y córnea, también se reportaron usos de las esponjas de colágeno como liberadores controlados de analgésicos y agente hemostático en cirugía, entre otros^[41].

En el futuro, pensamos complementar la caracterización de los andamios con ensayos de tracción, compresión y determinación del módulo de elasticidad de los mismos. Finalmente, se considera la posibilidad de hacer pruebas *in vivo* como así también probar el tratamiento DHT con diferentes parámetros de temperatura y duración.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] K. E. Barrett and W. F. Ganong, *Ganong fisiología médica*. McGraw-Hill Interamericana, 2013.
- [2] “Connective Tissue - Anatomy An111 with Anderson at Arthur A. Dugoni School of Dentistry - StudyBlue.” [Online]. Available: <https://www.studyblue.com/notes/n/connective-tissue/deck/7146938>. [Accessed: 29-Jul-2017].
- [3] A. C. Guyton, J. E. Hall, and J. E. Hall, *Tratado de fisiología médica*, 12.^a. Barcelona: Elsevier, 2011.
- [4] A. Blanco and G. Blanco, *Química biológica*. El Ateneo Editorial, 2011.
- [5] “File:Hyaluronan.svg - Wikimedia Commons.” [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hyaluronan.svg>. [Accessed: 29-Jul-2017].
- [6] D. Voet and J. G. Voet, *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana, 2006.
- [7] “COLLAGEN Structure , Distribution , Synthesis & Regulation.” [Online]. Available: <https://es.slideshare.net/DrDebashis/collagen-drdeb/14>. [Accessed: 29-Jul-2017].
- [8] M. Madaghiele *et al.*, “Assessment of collagen crosslinking and denaturation for the design of regenerative scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 104, no. 1, pp. 186–194, 2016.
- [9] W. Müller Esterl and U. Brandt, *Bioquímica : fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Reverté, 2008.
- [10] P. Fratzl, *Collagen: Structure and Mechanics*. 2008.
- [11] “File:Tropocollagen cross-linkage lysyl oxidase (EN).svg - Wikimedia Commons.” [Online]. Available: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tropocollagen_cross-linkage_lysyl_oxidase_\(EN\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tropocollagen_cross-linkage_lysyl_oxidase_(EN).svg). [Accessed: 29-Jul-2017].
- [12] “NANOTECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE TEJIDOS.” [Online]. Available: <http://aargentinapciencias.org/2/index.php/nanotecnologia/120-nanotecnologia-e-ingenieria-de-tejidos>. [Accessed: 18-May-2017].
- [13] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O’Brien, “The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 461–466, 2010.
- [14] M. G. Haugh, M. J. Jaasma, and F. J. O’Brien, “The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 89, no. 2, pp. 363–369, 2009.

- [15] M. Safandowska and K. Pietrucha, "Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 53, pp. 32–37, 2013.
- [16] "Cape Biology and Chemistry Syllabus: Biology Module 1 - 1.aspects of biochemistry 1.9 outline the molecular structure of haemoglobin as an example of a globular protein and of collagen as an example of a fibrous protein." [Online]. Available: http://getcapenotes.blogspot.com.ar/2015/07/biology-module-1-1aspects-of_18.html. [Accessed: 29-Jul-2017].
- [17] G. E. Davis, "Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 182, no. 3, pp. 1025–31, Feb. 1992.
- [18] S. V. M. & A. Atala, "3D Bioprinting of Tissues and Organs," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014.
- [19] Mariano Bucco and Enrique Hofman, "La impresión 3D y su aplicación en los servicios médicos."
- [20] C. García Villegas and M. M. Vidarte Pastrana, "INFORME 1. ESTADO DEL ARTE DE LA BIOIMPRESIÓN 3D."
- [21] V. K. Lee *et al.*, "Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology," *Biomaterials*, vol. 35, no. 28, pp. 8092–8102, Sep. 2014.
- [22] B. Guillotin *et al.*, "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization," *Biomaterials*, vol. 31, no. 28, pp. 7250–7256, Oct. 2010.
- [23] S. A. Ghodbane and M. G. Dunn, "Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 104, no. 11, pp. 2685–2692, Nov. 2016.
- [24] E. Suesca, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga, H. C. de Sousa, and M. R. Fontanilla, "Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 333–341, 2017.
- [25] H. Cao and S. Y. Xu, "EDC/NHS-crosslinked type II collagen-chondroitin sulfate scaffold: Characterization and in vitro evaluation," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 567–575, 2008.
- [26] A. K. Bajpai and R. Saini, "Preparation and characterization of novel biocompatible cryogels of poly (vinyl alcohol) and egg-albumin and their water sorption study," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 1, pp. 49–61, 2006.
- [27] C. you Gao, D. yong Wang, and J. cong Shen, "Fabrication of porous collagen/chitosan scaffolds with controlling microstructure for dermal equivalent," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 14, no. 6, pp. 373–379, 2003.
- [28] "ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests

- for in vitro cytotoxicity.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/36406.html>. [Accessed: 06-Oct-2017].
- [29] “ISO 10993-12:2012 - Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/53468.html>. [Accessed: 06-Oct-2017].
- [30] A. Matsiko, T. J. Levingstone, F. J. O’Brien, and J. P. Gleeson, “Addition of hyaluronic acid improves cellular infiltration and promotes early-stage chondrogenesis in a collagen-based scaffold for cartilage tissue engineering,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 11, pp. 41–52, 2012.
- [31] J. W. Drexler and H. M. Powell, “Dehydrothermal Crosslinking of Electrospun Collagen,” *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 9–17, 2011.
- [32] X. H. Wang *et al.*, “Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 19, pp. 3213–3220, 2003.
- [33] N. Davidenko, J. J. Campbell, E. S. Thian, C. J. Watson, and R. E. Cameron, “Collagen–hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3957–3968, Oct. 2010.
- [34] S. C. Rodrigues, C. L. Salgado, A. Sahu, M. P. Garcia, M. H. Fernandes, and F. J. Monteiro, “Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 4, pp. 1080–1094, 2013.
- [35] C. F. Hernández, U. Tecnológica, D. La Habana, J. Antonio, and L. Habana, “Obtención de andamios de colágeno para la restauración del tejido del miocardio,” vol. VII, no. 3, pp. 15–24, 2016.
- [36] G. Perale and J. G. (Jöns G. . Hilborn, *Bioresorbable polymers for biomedical applications : from fundamentals to translational medicine*. .
- [37] F. Becerra, “Swelling characterization and drug delivery kinetics of polyacrylamide-co-itaconic acid / chitosan hydrogels,” vol. 3, no. 1, pp. 25–32, 2009.
- [38] N. Davidenko, J. J. Campbell, E. S. Thian, C. J. Watson, and R. E. Cameron, “Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3957–3968, 2010.
- [39] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005.
- [40] A. R. Eynard, M. A. Valentich, and R. A. Rovasio, *Histología y embriología del ser humano : bases celulares y moleculares*. Panamericana, 2008.
- [41] W. Friess, “Collagen - Biomaterial for drug delivery,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 45, no. 2, pp. 113–136, 1998.