

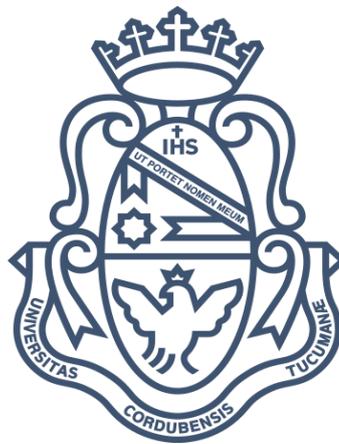
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Escuela de Ingeniería Biomédica

## Proyecto Integrador

# “Impresión 3D y caracterización de andamios de colágeno extraído de piel porcina para uso biomédico”.



**Alumnos:** ADRAGNA, Celeste

Matrícula: 37.525.013

JURCZYSZYN, Santiago

Matrícula: 36.105.585.

**Asesor:** Dra. Bioq. CID, Mariana

**Co asesor:** Dra. Lic. COMIN Romina



## CONTENIDO

Resumen .....	3
Introducción .....	5
Andamios para ingeniería en tejidos .....	6
Impresión 3D .....	10
Colágeno .....	14
Andamios de colágeno .....	18
Objetivos .....	21
Materiales y métodos .....	22
Protocolo de purificación .....	22
Caracterización y cuantificación del colágeno obtenido .....	25
Mediciones de viscosidad .....	27
Fabricación de los andamios 3D .....	28
Caracterización de los andamios impresos .....	28
Ensayo de citotoxicidad .....	29
Cultivo celular .....	31
Evaluación del crecimiento y migración celular en los andamios.....	31
Resultados y discusión .....	32
Conclusiones .....	44
Bibliografía.....	45

## RESUMEN

Los andamios biodegradables con estructura tridimensional porosa son la base para la regeneración tisular, siendo componentes fundamentales para la ingeniería de tejidos; sobre ellos se realizan cultivos celulares para producir sustitutos biológicos que restauren o reparen daños en tejidos u órganos. El colágeno es el principal constituyente proteico de la matriz extracelular humana y posee una estructura que favorece la unión, migración y en ciertos casos la diferenciación de células, siendo uno de los materiales más estudiados para el desarrollo de andamios. Sin embargo, su uso para fabricar estructuras tridimensionales con porosidad controlada, diseñadas para permitir la adhesión y migración de células en su interior y una difusión de oxígeno y nutrientes adecuada, ha sido limitado debido a su difícil procesabilidad mediante tecnologías de construcción capa por capa. En el presente trabajo se propone la impresión tridimensional de andamios de colágeno altamente porosos para uso biomédico.

Para ello se desarrolla un método sencillo y relativamente económico para la purificación de colágeno tipo I de piel porcina a partir de tratamientos con soluciones ácidas y sales, que preservan la estructura de las fibras a diferencia de procedimientos enzimáticos normalmente usados, que desnaturalizan la proteína. El proceso llevado a cabo permitió la purificación, caracterización y cuantificación del colágeno mediante espectrofotometría y electroforesis desnaturalizante; además se analizó su viscosidad a través de un estudio reométrico. Con el colágeno se preparó una biotinta que permitió una extrusión homogénea por la bioimpresora y presentó viscosidad y estabilidad suficientes para la impresión de andamios tridimensionales. Se hizo una caracterización de estos mediante microscopía electrónica de barrido, ensayos de hinchamiento de agua, porosidad y difracción de rayos X; además se comprobó la citocompatibilidad mediante un ensayo de citotoxicidad sugerido por Norma ISO 10993, parte 5-2009, y se realizaron cultivos celulares sobre los andamios para analizar el crecimiento y migración de las células en los mismos.

**ABSTRACT**

Biodegradable scaffolds with three-dimensional porous structure are fundamental components for tissue engineering, on which cell cultures are grown to create biological substitutes that restore or repair tissue or organ damage. Collagen is the main protein of the human extracellular matrix, its structure allows the union, migration and in several cases the differentiation of the cells; becoming one of the most studied material for the development of biomedical scaffolds. However, its use to fabricate reproducible and pore-structure-controlled 3D structures, which are designed to stimulate cell adhesion and subsequent migration, and the easy diffusion of nutrients, has been limited due to its low processability by the means of layer-by-layer technologies. In the present, we propose three-dimensional printing for obtaining highly porous collagen scaffolds for biomedical use.

A simple and economical method is developed for collagen purification starting from porcine skin using treatments with acidic and salt solutions, which preserve the structure of the fibers unlike normally used enzymatic procedures which denature the protein. Characterization and quantification through spectrophotometry and denaturing electrophoresis allowed verifying the effectiveness of this method for obtaining highly pure type I collagen; and rheometric studies indicated the viscosity of the material was suitable for 3D printing applications. A collagen bioink was prepared, which could be homogeneously extruded through the bioprinter and presented appropriated viscosity and stability for printing 3D scaffolds. A characterization of the printed scaffolds was performed through scanning electron microscopy, X-ray diffraction, porosity and water swelling assays; cytocompatibility was probed with a cytotoxicity assay according to the ISO Standard 10993, part 5-2009, and cell cultures were performed to analyze cell growth and migration on the printed scaffolds.

## INTRODUCCIÓN

La necesidad actual de reemplazo, reparación y regeneración de órganos y tejidos para pacientes se encuentra en continuo crecimiento, tal que los suministros disponibles no cubren la demanda existente; debido principalmente a la falta de donantes, y a problemas de compatibilidad que llevan al rechazo de trasplantes. Para superar estas desventajas, científicos han investigado el uso de andamios biocompatibles como alternativa al trasplante<sup>(1)</sup>. Estos andamios son diseñados de modo que imiten la matriz extracelular, proveyendo soporte estructural y promoviendo la unión, proliferación y diferenciación celular, con la meta de formar tejidos u órganos funcionales<sup>(2)</sup>. Tanto la composición del biomaterial del andamio como su arquitectura interna (porosidad, dimensión e interconectividad de los poros) condicionan el comportamiento y la función de las células sembradas, y por ende, son aspectos críticos para la regeneración del tejido<sup>(3)</sup>.

En los últimos años, en el desarrollo de andamios para ingeniería en tejidos han ganado importancia las técnicas de impresión 3D, que permiten crear estructuras definidas con tamaño de poro e interconectividad controlados con capacidad de soportar el crecimiento celular y formación de tejido; logrando adaptar sus características (en términos de integridad estructural y microambiente) para imitar las del tejido diana<sup>(4)</sup>. Por otro lado, aunque numerosos estudios demuestran que algunos andamios basados en colágeno son por mucho los más prometedores en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa<sup>(5)</sup>, su uso para fabricar estructuras 3D reproducibles y con porosidad controlada ha sido limitado debido a su difícil procesabilidad. En particular, la fabricación de andamios de colágeno mediante impresión 3D es desafiante debido a la baja viscosidad a temperatura ambiente de los geles, soluciones o dispersiones de colágeno empleados y se reportan escasos trabajos en este tema<sup>(6)</sup>.

En esta primera parte se presenta una revisión de conceptos, introduciendo la impresión 3D como método para producir andamios con microarquitectura interna controlada. Para abordar los andamios de colágeno, se introducen sus propiedades como biomaterial, y se presentan los avances en cuanto a fabricación de aquellos mediante impresión 3D.

## ANDAMIOS PARA INGENIERIA EN TEJIDOS

La ingeniería en tejidos es un campo multidisciplinario que implica la aplicación de principios y métodos de ingeniería dirigidos hacia la comprensión de las relaciones estructura-función en tejidos normales y patológicos, y el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función del tejido u órgano. Su meta es superar las limitaciones de los tratamientos convencionales basados en trasplante de órganos e implantación de biomateriales, emergiendo como un nuevo campo que envuelve la combinación de células, andamios y agentes bioactivos para fabricar nuevos tejidos funcionales o para la restauración o reemplazo de tejidos vivos dañados<sup>(7)</sup>.

Uno de los principales métodos detrás de la ingeniería de tejidos implica el cultivo de células *in vitro* para generar un neo-tejido tridimensional (3D)<sup>(2)</sup>. Las células por sí mismas carecen de la capacidad de crecer en orientaciones 3D y así definir la forma anatómica del tejido; sino que emigran aleatoriamente para formar una capa bidimensional (2D). Los tejidos tridimensionales necesarios se consiguen entonces sembrando las células en matrices porosas conocidas como andamios, que dirigen el crecimiento celular<sup>(3;8)</sup>.

Para optimizar su capacidad regenerativa, un andamio ideal requiere una composición y una física y mecánica similares a las fisiológicas de la matriz extracelular (MEC) nativa<sup>(8)</sup>. La MEC es un componente vital del microambiente celular, que provee la arquitectura 3D apropiada para el normal desarrollo y crecimiento del tejido, por lo tanto, aquel debe ser esencialmente una estructura porosa tridimensional que organice las células en la construcción adecuada y facilite el crecimiento del nuevo tejido<sup>(5;9)</sup>. Se ha demostrado además que las moléculas estructurales y funcionales de la MEC proporcionan propiedades mecánicas necesarias para el buen funcionamiento de cada tejido y facilitan la transducción de señales entre células adyacentes y con la matriz propiamente dicha<sup>(10)</sup>.

Tanto el material empleado como la estructura 3D del andamio tienen un efecto significativo sobre la actividad celular<sup>(1;2)</sup>.

En general, requisitos para su producción son<sup>(11)</sup>:

- Estructura tridimensional porosa bien definida (alta relación superficie-volumen) para favorecer la integración y vascularización del tejido, así como suficiente movimiento de nutrientes, oxígeno y metabolitos<sup>(3)</sup> (las altas tasas de difusión requeridas en un medio de cultivo son inducidas por distancias pequeñas, en el orden de los 150-400µm).
- Estructura físico-química que permita la unión, proliferación y diferenciación celular, y la producción de MEC para organizar las células en una arquitectura tridimensional.
- Material de construcción con biodegradabilidad controlada o bioreabsorbible, de modo que haya un reemplazo gradual y ordenado del andamio por un tejido funcional; a medida que las células se infiltran degradan el armazón temporal de soporte de células<sup>(12)</sup>.
- Propiedades mecánicas adecuadas al sitio de implantación; incluyendo elasticidad, compresibilidad, comportamiento viscoelástico, resistencia a la tracción.
- Posibilidad de fabricarse fácilmente en una variedad de formas y tamaños<sup>(1)</sup>.

Debido a estos requerimientos, siempre se encuentra un reto asociado al diseño y fabricación de los andamios biomédicos<sup>(8)</sup>.

## TECNOLOGÍAS DE FABRICACIÓN

Los enfoques en el diseño de andamios deben ser capaces de crear estructuras porosas jerárquicas en formas tridimensionales complejas para obtener las propiedades mecánicas y de transporte masivo (permeabilidad y difusión) deseadas. Las características arquitectónicas juegan un papel importante en la regeneración tisular: el transporte de moléculas a través de los poros es función de su tamaño, conectividad y tortuosidad de los canales internos, afectando directamente a la motilidad celular durante la regeneración del tejido<sup>(3; 4; 9)</sup>; además se ha demostrado que el tamaño de poro influye en la adhesión y crecimiento celular<sup>(13; 14)</sup>.

Se han desarrollado varias técnicas para procesar andamios 3D altamente porosos, que facilitan la distribución celular y guían su crecimiento, pero la mayoría crean matrices con macro y microarquitecturas inconsistentes, porosidad aleatoria y control insuficiente de los parámetros relevantes (tamaño de poro e interconectividad). Con las técnicas

convencionales (tecnologías textiles, moldeo por solvente, lixiviada de partículas, laminación de membrana, separación de fases y moldeo por fundido) no es posible controlar precisamente el tamaño, geometría y distribución espacial de poros en los andamios. Experimentos *in vitro* con este tipo de andamios han dado como resultado el crecimiento de tejidos con secciones transversales delgadas, penetrando las células menos de 500µm desde la superficie externa. Las células no pueden emigrar profundamente en el andamio debido a la limitación de difusión de nutrientes y eliminación insuficiente de metabolitos a las que condiciona la estructura, por lo que sólo sobreviven cerca de la superficie. Sí se han podido cultivar exitosamente sobre aquellos andamios tejidos como cartílago (cultivos primarios con secciones transversales mayores de 1mm), ya que tiene bajos requerimientos de oxígeno, y piel, la cual no requiere formar secciones gruesas. Sin embargo, la mayoría de los tejidos requieren alta concentración de oxígeno y nutrientes<sup>(8)</sup>.

El prototipado rápido (RP), también conocido como fabricación de libre forma (FFL) ha sido desarrollado como un grupo de tecnologías avanzadas para superar dichas limitaciones; permitiendo fabricar andamios con forma externa personalizada y morfología interna predefinida y reproducible, representando un enfoque prometedor para la ingeniería de tejidos. Éstas fabrican un objeto 3D aplicando diseño asistido por computadora y ayuda asistida por computadora (CAD - CAM) para construir estructuras complejas superponiendo una serie de cortes 2D con propiedades definidas, es decir, secciones transversales diseñadas por CAD que la máquina usa como guías para imprimir, y son agregadas capa por capa de abajo hacia arriba<sup>(3; 4)</sup>. Aquí toma importancia la impresión 3D.

Las ventajas sobre las técnicas convencionales incluyen la alta reproducibilidad de la arquitectura y control de la microestructura del andamio: puede controlarse la porosidad, tamaño y distribución de poros, e incluso formar estructuras para aumentar el transporte masivo de oxígeno en todo el andamio; así como la capacidad de controlar sus propiedades mecánicas y cinética de degradación<sup>(14)</sup>. Se ha utilizado tecnologías de RP para producir andamios con dimensiones que varían entre nanométricas y milimétricas; los distintos métodos han sido revisados y comparados en muchos artículos científicos<sup>(8; 15; 18)</sup>,

y numerosos grupos de investigación han demostrado que dichos andamios apoyan la adhesión celular *in vitro* y el crecimiento y regeneración tisular *in vivo* <sup>(14; 19)</sup>.

Típicamente, la terminología estándar ASTM (*American Society for Testing and Materials*, organización de normas técnicas internacionales) incluye varios principios, tales como fotopolimerización (estereolitografía), inyección de material, extrusión de material (deposición fundida), fusión de lecho de polvo (sinterización laser selectiva), y deposición por energía dirigida (deposición por láser) <sup>(4)</sup>. Si bien existen varios procesos aditivos agrupados bajo el término, la importancia que se le ha dado a la impresión 3D durante la última década ha llevado a que se refieran a éstos como sinónimos <sup>(20)</sup>.

## IMPRESIÓN 3D

La impresión 3D permite diseñar andamios capaces de imitar estructuras complejas de la MEC, y de esta forma proveer un microambiente para la adhesión celular y posterior proliferación, distribución y diferenciación, con la capacidad de soportar el crecimiento celular y promover la regeneración de tejidos efectivamente<sup>(11; 20-22)</sup>.

### Materiales usados para la impresión de andamios

Los biomateriales para impresión 3D de andamios, ya sean naturales o sintéticos, varían dependiendo del tipo de tecnología empleada. Estos incluyen metales, cerámicas, polímeros y composites<sup>(14; 20)</sup>.

- **Metales:** presentan alta resistencia mecánica, similar a la del hueso, desarrollándose sobre todo para regeneración de tejido óseo. Se han usado aleaciones cromo-cobalto, titanio, nitinol y aceros inoxidable. Limitaciones incluyen la toxicidad de iones metálicos generados por corrosión y tiempos de degradación muy largos que llevan a la formación de tejido alrededor del andamio, en lugar de reemplazar al mismo. Recientemente han surgido los llamados “metales biodegradables” basados en calcio, magnesio, hierro o zinc como candidatos para ser impresos; los basados en hierro estuvieron entre los primeros usados para impresión 3D de andamios y se demostró la proliferación y diferenciación celular *in vitro* sobre andamios de Fe-Mn.

- **Cerámicos:** han sido utilizados para la impresión 3D de andamios gracias a su gran resistencia a la compresión y biocompatibilidad; siendo también capaces de generar andamios para regeneración ósea. Se han estudiado andamios impresos con hidroxiapatita (naturalmente presente en el hueso) e hidroxiapatita más trifosfato de calcio para regenerar hueso.

- **Polímeros:** varios polímeros sintéticos, naturales e híbridos se usan para fabricar andamios biomédicos 3D porosos, incluyendo poli(etilenglicol) diacrilato y metacrilato de gelatina natural, empleados para fabricar hidrogeles. Los hidrogeles poseen propiedades mecánicas ajustables, son biocompatibles y tienen la capacidad mantener su estructura 3D al ser hidratados. En general los materiales naturales presentan ventajas debido a sus propiedades inherentes de reconocimiento biológico, incluyendo la presentación de

ligandos de unión a receptores celulares, degradación proteolítica y remodelación por parte de las células activadas, mientras que los polímeros sintéticos pueden causar problemas como toxicidad o falta de reconocimiento por las células <sup>(6)</sup>. El polímero natural más ampliamente usado para andamios biomédicos es el colágeno; otros incluyen gelatina, condroitín sulfato, quitosano, alginato y ácido hialurónico <sup>(2;23)</sup>. Los polímeros sintéticos tales como poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), pueden proveer mayor resistencia mecánica, mejor procesabilidad, y tasas de degradación controlables. Sin embargo, tienen actividad biológica relativamente baja comparados con los naturales, en términos de promoción de la regeneración tisular; además, la hidrofobicidad intrínseca de ciertos polímeros sintéticos, como los poliésteres, resultan en una adhesión celular baja <sup>(24)</sup>.

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones sobre andamios impresos ha sido concerniente a tejidos óseos, siendo necesarios más estudios en el campo respecto a otros tejidos. Para ser una opción viable para la regeneración tisular, los materiales usados para impresión 3D deben ser imprimibles con un alto grado de reproducibilidad; también deben ser manipulables para formar la morfología deseada de los andamios diseñados <sup>(25)</sup>.

### **Proceso de impresión.**

La impresión 3D involucra la fabricación de estructuras a través de la deposición sucesiva de capas mediante un proceso computarizado. Las principales tecnologías son la microextrusión, impresión por chorro de tinta e impresión asistida por láser <sup>(26;27)</sup>. Aquellas basadas en la extrusión son las más avanzadas debido a la posibilidad de deposición con alta precisión y la capacidad de poder emplear diferentes biomateriales <sup>(28)</sup>: pueden imprimirse casi todos los tipos de soluciones de pre-polímero de hidrogel de viscosidad variable y agregados con alta densidad de células. La mayoría de los bioimpresoras comerciales, incluyendo el Bioplotter (EnvisionTec, Gladbeck, Alemania) y NovoGen 3D Bioprinting plataforma (Organovo, San Diego, EE.UU.), se basan en la tecnología de extrusión, que es en esencia una modificación de la impresión por chorro de tinta <sup>(29)</sup>.

Este proceso utiliza un sistema de presurización neumática para extruir materiales tratados química o térmicamente a través de una boquilla de impresión similar a una

jeringa, con capacidad de movimiento a lo largo de los ejes X-Y-Z; algunos sistemas usan cabezales múltiples para dispensar varios materiales. Al igual que en todos los métodos de impresión 3D, primero se crea un archivo CAD y se envía a la impresora. En un proceso análogo a la sección histológica, las trayectorias de impresión se crean "cortando" matemáticamente los modelos de objetos en capas, trazando el perímetro e interior de cada una. El espesor de estas capas representa la resolución de una impresora en particular, normalmente en el rango de 100-500µm. Las trayectorias son las instrucciones leídas y ejecutadas por la bioimpresora, que mediante la aplicación de una fuerza continua imprime líneas cilíndricas ininterrumpidas o hebras <sup>(26;28;30)</sup> en dos dimensiones según las direcciones del software CAD-CAM, luego el cabezal se mueve sobre el eje Z para depositar la capa siguiente, que se adhiere sobre la primera; y se construye el modelo en un proceso aditivo que forma un objeto 3D con una colección de cortes 2D <sup>(26)</sup>. Cada capa puede contener combinaciones de distintos materiales; la bioimpresora es capaz de usar y cambiar el material o "biotinta" para desarrollar la estructura.

Una característica clave de estas impresoras es que pueden imprimir geles cargados con células, a menudo con otros materiales poliméricos como PCL, para producir andamios funcionales <sup>(20)</sup>. Por esta razón muchos autores emplean el término bioimpresión exclusivamente para aquellas aplicaciones en que las células son incorporadas en la biotinta e impresas directamente, a diferencia de aquellas donde se utiliza la impresión 3D para construir el andamio sobre el que luego se siembran cultivos.

Se han usado bioimpresoras de microextrusión para fabricar distintos tejidos <sup>(31; 18)</sup>, como válvulas aórticas <sup>(31)</sup>, árboles vasculares ramificados <sup>(32)</sup>, modelos *in vitro* para estudios farmacocinéticos<sup>(33)</sup>, así como modelos de tumores <sup>(34)</sup>. Los andamios construidos por extrusión han exhibido en todos los casos buena adhesión celular con una arquitectura regular y reproducible. Sin embargo, la principal desventaja es la gran sensibilidad a la concentración o viscosidad de los materiales en la boquilla de impresión <sup>(30)</sup>.

### **Características de los geles para impresión.**

El material debe ser fácil de manipular por la tecnología de la impresora para ser dispensado en estructuras tridimensionales complejas, y proveer soporte estructural al

constructo. Para el caso de bioimpresión de células el material también debe mantener la viabilidad celular. La importancia de las propiedades del material para la impresión recae en que éste debe ser lo suficientemente fluido para facilitar la extrusión a través de la boquilla, de pequeño diámetro, y debe mantenerse mecánicamente a sí mismo después de la deposición <sup>(35)</sup>. La impresibilidad se refiere a la capacidad de poder ser precisamente depositado con el control espacial deseado <sup>(26)</sup>. Suele referirse también a un control temporal, refiriéndose la capacidad del material de mantener la estabilidad necesaria a corto plazo para asegurar que poros y canales no colapsen. Los principales parámetros fisicoquímicos que determinan la capacidad de un gel para ser impreso en 3D son sus propiedades reológicas y mecanismos de entrecruzamiento. En muchos casos las condiciones han limitado las soluciones de pre-polímero de hidrogel empleadas a polímeros entrecruzables foto, química o térmicamente <sup>(29)</sup>.

La microextrusión permite incorporar materiales altamente viscosos para mantener la forma después de su deposición; el proceso es compatible con viscosidades dentro de un amplio rango, desde 30mPa/s a más de  $6 \times 10^7$  mPa/s <sup>(26; 27; 36)</sup>. Algunos investigadores explotan materiales que poseen propiedades pseudoplásticas, comportamiento no newtoniano que causa una disminución de la viscosidad con aumentos de las fuerzas de corte <sup>(37)</sup>. Las tasas altas en la boquilla durante la extrusión permiten que estos materiales fluyan a través de la misma, y luego de ser depositados aumenta su viscosidad al estar el fluido en reposo.

Las propiedades reológicas del material pueden ser adaptadas de manera que las extrusiones mantengan su forma. Típicamente, puede tenerse mayor control sobre el peso molecular y su distribución en geles de materiales sintéticos, así como sobre las densidades de entrecruzamiento, que permiten control de propiedades mecánicas específicas tales como el módulo elástico. Por otra parte, para los polímeros empleados en hidrogeles derivados naturalmente es difícil manipular sus propiedades para que estén dentro de rangos específicos, pero su bioactividad innata hace a estos materiales los más atractivos, siendo los más estudiados en investigaciones de bioimpresión. También se han trabajado combinaciones de polímeros sintéticos y naturales para mejorar la resistencia mecánica de los hidrogeles <sup>(25;35;38)</sup>.

## COLÁGENO

El colágeno es la proteína más abundante dentro de la MEC de los tejidos conectivos tales como piel, hueso, cartílago y tendón de los mamíferos y comprende más del 90% de su peso seco. Se han identificado más de 25 tipos distintos de colágeno, cada uno con una función biológica única <sup>(39)</sup>. El colágeno estructural primario en los tejidos de mamíferos es el tipo I; esta proteína ha sido bien caracterizada y es omnipresente a través de especies animales y vegetales. Otros tipos de colágeno están presentes en la MEC de la mayoría de los tejidos, pero en cantidades mucho más bajas, y proporcionan a los tejidos específicas características mecánicas y permiten interacciones específicas MEC-célula <sup>(40)</sup>.

Debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y función como MEC, el colágeno es ampliamente utilizado como biomaterial para aplicaciones médicas actuales y para el desarrollo de productos de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa <sup>(41)</sup>. Varios de estos andamios biológicos (por ejemplo los derivados de piel) han sido utilizados en estudios preclínicos y aplicaciones clínicas <sup>(42)</sup>.

### CARACTERIZACIÓN DEL COLÁGENO COMO BIOMATERIAL

#### *Estructura.*

La versatilidad del colágeno como material se debe principalmente a su compleja estructura <sup>(43)</sup>. El modelo de la estructura del colágeno tiene como unidad básica la molécula de tropocolágeno, que consiste de una triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas  $\alpha$  levógiras. Las cadenas  $\alpha$  están compuestas de repeticiones de tres aminoácidos que típicamente tienen glicina cada tercer residuo, un conjunto que se repite en la secuencia es la forma Gly-X-Y, donde X suele ser prolina e Y, prolina o hidroxiprolina. La glicina es el aminoácido esencial más pequeño, por lo que esta disposición permite la rotación necesaria para formar la estructura de hélice. En la isoforma colágeno tipo I, dos cadenas  $\alpha$  son idénticas, y la tercera tiene una secuencia levemente distinta, enrollándose en una hélice de 300nm de longitud, 1,5nm de diámetro y con un peso molecular de 300kDa (ver Fig. 1). Su estabilidad se debe principalmente a los entrecruzamientos intermoleculares <sup>(44)</sup>.

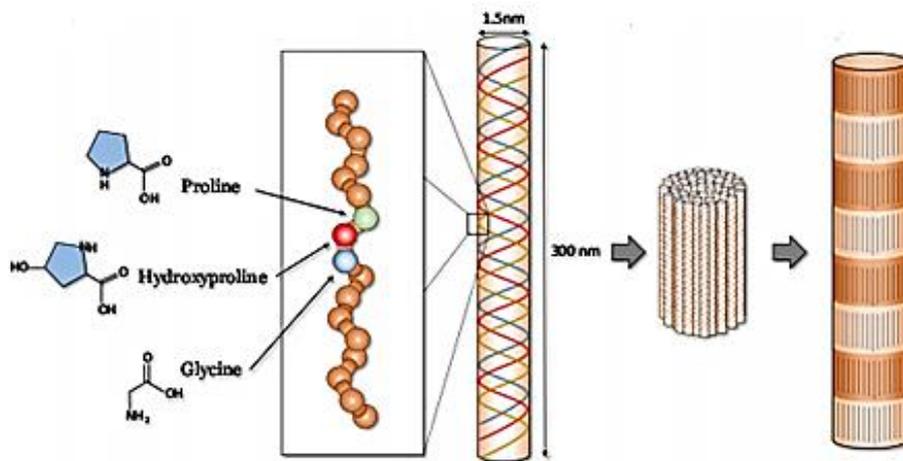


Figura 1. Estructura del colágeno. Extraído de van Blitterswijk C A, de Boer J. "Tissue Engineering" (2015)<sup>(40)</sup>

Una característica importante del colágeno tipo I es su estructura jerárquica desde la nanoescala a la macroescala. Dentro de las células se sintetizan y modifican las cadenas  $\alpha$  y se ensamblan a la forma de procolágeno, el cual es secretado al espacio extracelular y luego se separan las regiones terminales por enzimas específicas para formar la molécula de tropocolágeno; permitiendo que estas subunidades luego se autoensamblen en forma de fibrillas de 10 a 300 nm. Las moléculas de tropocolágeno se unen covalentemente entre ellas de manera escalonada, dando a las fibras de colágeno un patrón típico de bandas que se ve en alta magnificación, con periodicidad axial de 67 nm<sup>(43)</sup>. Las fibrillas se ensamblan entonces en microfibras y finalmente se agregan en fibras de colágeno de 0,5 a 3  $\mu$ m (ver Fig. 2). Esta arquitectura altamente organizada desde el orden de hélices alfa hasta fibras de colágeno resulta en la resistencia y estabilidad de la MEC<sup>(45)</sup>.

#### *Propiedades.*

El colágeno pertenece a la familia de proteínas con estructura fibrilar; ésta contribuye a mantener la integridad estructural y biológica de la MEC y proveer soporte físico a los tejidos. El colágeno ofrece baja inmunogenicidad, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, interactúa específicamente con otras biomoléculas, contiene secuencias específicas que median la regulación de la morfología, adhesión, migración y diferenciación de células. El colágeno tiene una estructura relativamente estable debido a la formación de enlaces covalentes entre las fibras; sin embargo, su naturaleza proteica determina su biodegradabilidad, por acción de colagenasas y proteinasas no específicas

una vez que las primeras han desarmado las hélices<sup>(46)</sup>. Las células pueden remodelar matrices colágenas por digestión a través de secreción de enzimas y síntesis de colágeno endógeno<sup>(23;44;45)</sup>.

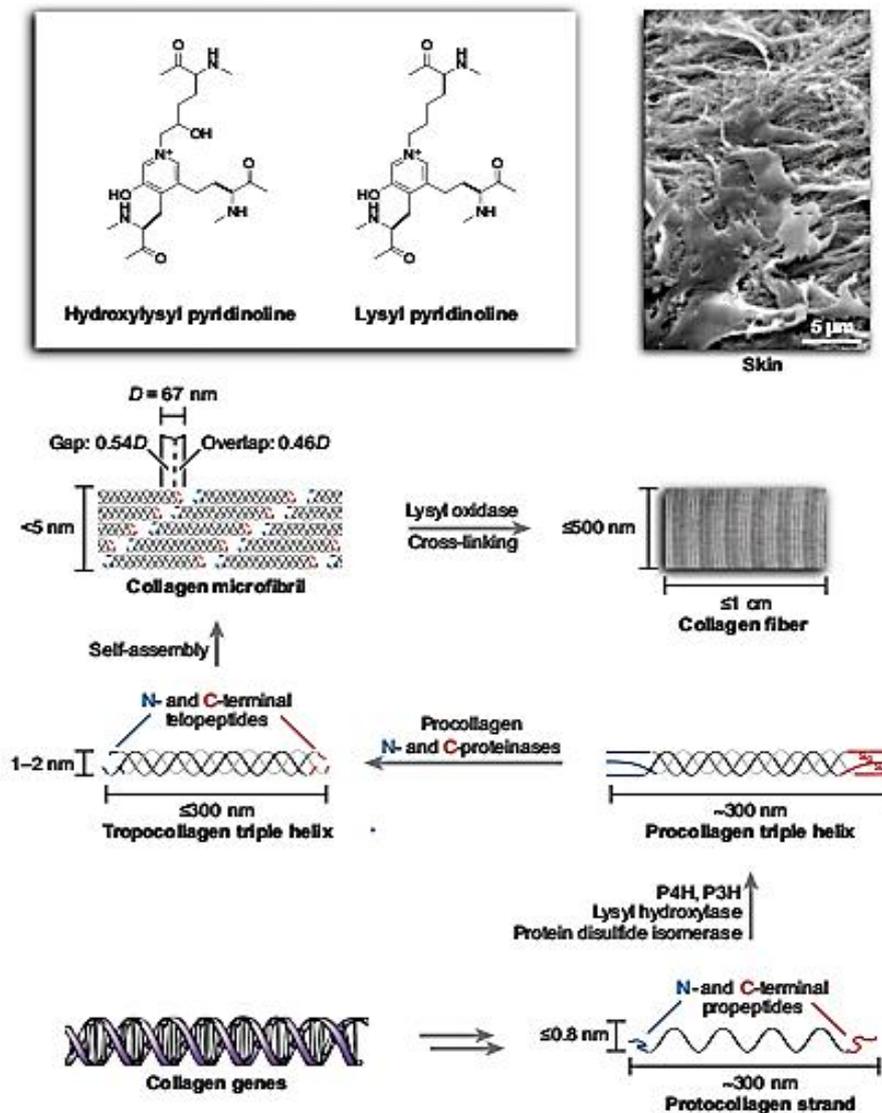


Figura 2. Biosíntesis de fibras de colágeno. Extraído de Shoulders M.D., Raines R.T. "Collagen Structure and Stability" (2009)<sup>(44)</sup>

Todas estas características lo hacen un material prometedor para andamios en ingeniería tisular; sin embargo los andamios de colágeno suelen carecer de suficiente estabilidad estructural y resistencia mecánica cuando son hidratados, lo cual limita su aplicación en tejidos particulares. El entrecruzamiento mediante métodos físicos o químicos puede mejorar las propiedades mecánicas de dichos andamios; también suele combinarse el colágeno con otros polímeros para tal fin<sup>(46)</sup>.

**Fuentes de obtención.**

Los colágenos tipo I alogénicos y xenogénicos han sido reconocidos como una fuente de andamios biocompatibles útil con bajo potencial antigénico. El colágeno tipo I se extrae mediante procedimientos enzimáticos o con soluciones ácidas de tejidos de origen mamífero (principalmente bovino y porcino) ricos en la proteína fibrosa, como piel y tendón <sup>(47)</sup>. Normalmente el colágeno extraído es mayormente soluble; las fibras de colágeno luego pueden reconstituirse *in vitro* <sup>(45)</sup>. Las técnicas más populares involucran la extracción proteolítica con pepsina, sin embargo cabe destacar que la misma altera la estructura molecular del colágeno al eliminar las regiones terminales telopeptídicas, resultando en una disminución del autoensamblaje de fibrillas y desnaturalización de las proteínas <sup>(41)</sup>.

La forma física del material de colágeno puede adaptarse a diversas aplicaciones: hidrogeles inyectables que crean microambientes tridimensionales para el cultivo y diferenciación de las células <sup>(5)</sup>, micro/nanoesferas que sirven como vehículos de suministro, membranas y películas utilizadas para guiar la regeneración de tejidos, y andamios 3D porosos adecuados para regeneración tisular <sup>(45;48)</sup>.

## ANDAMIOS BASADOS EN COLÁGENO

Se han reportado muchas investigaciones sobre el colágeno y sus formas desnaturalizadas para andamios de ingeniería en tejidos<sup>(46)</sup>. Andamios fabricados a partir de colágeno, con una porosidad mayor al 90% y tamaños de poro entre 100-150µm han sido ampliamente usados para ingeniería de tejidos en cartílago, hueso, hígado, piel y tejido cardíaco. También se ha usado colágeno en tejido nervioso para mejorar la guía de células de Schwann y fibroblastos y regeneración axonal<sup>(49)</sup>.

La mayoría de la investigación actual apunta a la optimización de biomateriales basados en colágeno para aplicaciones médicas mejorando su resistencia mecánica, biodegradabilidad o características de liberación mediante entrecruzamiento o combinación de biopolímeros<sup>(41)</sup>.

## AVANCES EN ANDAMIOS TRIDIMENSIONALES DE COLÁGENO

Generalmente, se han fabricado andamios 3D porosos de colágeno por métodos de liofilización y evaporación en punto crítico; sin embargo, las esponjas obtenidas de esta manera permiten un transporte limitado de oxígeno y nutrientes profundamente dentro del andamio, y consecuentemente no pueden soportar el crecimiento de tejidos con un grosor mayor a 500µm<sup>(6)</sup>. A pesar de su enorme potencial como biomaterial, su procesabilidad mediante métodos de impresión es limitada debido a la naturaleza extremadamente hidrofílica del colágeno y su baja viscosidad a temperatura ambiente<sup>(6; 50)</sup>. Solo muy pocos estudios fueron realizados y tres estrategias han sido reportadas hasta ahora:

En primer lugar, se desarrolló un enfoque indirecto para fabricar andamios con canales internos para vascularización predefinidos, generando un molde de sacrificio por impresión de chorro de tinta de compuestos orgánicos de bajo punto de fusión<sup>(51)</sup>. Vertiendo una dispersión de colágeno poco viscoso en el molde y disolviendo éste en etanol después del punto crítico de evaporación (posibilidad de quedar residuos remanentes en el andamio pudiendo afectar la biocompatibilidad), resultaron andamios con estructura porosa interconectada; sin embargo, presentaron considerable encogimiento, inversamente relacionado a la concentración de colágeno. En un estudio

posterior, se encontró que con liofilización se induce menor encogimiento, se produce una estructura porosa más definida y se reproducen más precisamente los diseños<sup>(52)</sup>.

En segundo lugar, Ahn y cols (2010)<sup>(6)</sup> desarrollaron un método de impresión criogénica combinado con liofilización y electrospinning para obtener andamios de colágeno de baja viscosidad a temperaturas bajo cero, a fin de mejorar ciertos aspectos de la impresión directa (tamaños grandes de hebra y poro, procesabilidad). La liofilización permitió obtener hebras altamente porosas, y con el tiempo de deposición de micro y nano fibras con el proceso de electrospinning se pudo controlar el tamaño de poro.

Por último, Lode y cols (2016)<sup>(50)</sup> trabajaron directamente sobre la dispersión de colágeno empleada. Encontraron que para obtener una preparación dispensable a través de una aguja de dosificación y adecuada para la construcción de andamios en 3D, son determinantes la viscosidad y homogeneidad de la misma; y lograron una dispersión de colágeno altamente viscosa para la fabricación de andamios 3D por impresión directa a temperatura ambiente.

Los experimentos *in vitro* con distintas líneas celulares realizados por los grupos mencionados confirmaron la idoneidad del colágeno como excelente portador de células, mostrando que los andamios tridimensionales favorecieron la adhesión inicial, y proliferación de las células.

Otras estrategias para generar andamios 3D con colágeno estables usando RP se basan en la combinación de colágeno poco viscoso con otro material, que proporciona la fuerza mecánica deseada; tales como andamios híbridos de colágeno y polímeros termoplásticos sintéticos (policaprolactona, poli(ácido láctico-co-glicólico)) generados por extrusión multicanal<sup>(38)</sup>, o andamios de policaprolactona, fabricados por sinterización láser selectiva y modificación superficial con colágeno<sup>(53)</sup>. En estos casos, las propiedades que permiten la impresión las proporciona el segundo componente.

En un trabajo de investigación reciente del grupo de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en que se desarrolló esta tesis, se presenta una impresora 3D y la bioimpresión de colágeno de tendón bovino para construir estructuras 3D biocompatibles

y se muestra el potencial de esta aplicación <sup>(54)</sup>, sentando las bases para este proyecto.

En el presente proyecto integrador, se trabajó en la obtención de una biotinta consistente en fibras de colágeno insoluble y de alta viscosidad para la fabricación de andamios tridimensionales mediante impresión directa a temperatura ambiente; con las caracterizaciones correspondientes sobre el material purificado y sobre los andamios obtenidos mediante bioimpresión.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un método para purificar colágeno a partir de piel porcina que permita obtener un gel apto para ser impreso en 3D y generar andamios biocompatibles para uso biomédico.

### **Objetivos específicos**

- Extracción y purificación de colágeno tipo I a partir de piel porcina.
- Caracterización química y evaluación de la pureza del colágeno obtenido mediante cuantificación de proteínas, cuantificación específica de colágeno y electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida.
- Medición de la viscosidad del colágeno mediante estudios reológicos.
- Obtención de una biotinta de colágeno que permita su impresión.
- Obtención de andamios mediante bioimpresión 3D.
- Caracterización de los andamios impresos mediante microscopía electrónica de barrido, determinación de porosidad e hinchamiento de agua y difracción de rayos X.
- Evaluar la citotoxicidad de los andamios construidos con el colágeno obtenido por medio del ensayo de MTT de acuerdo a la Norma ISO 10993-5(2009).
- Cultivo de células en el andamio de colágeno impreso: microscopía óptica, tinción de hematoxilina-eosina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Protocolo de purificación de colágeno

Se extrajo el colágeno a partir de piel porcina, modificando el método descrito por Ghodbane y cols (2016) <sup>(55)</sup>. Brevemente, se colocó en frascos estériles con etanol piel porcina comprada a un proveedor y se reservaron los mismos. Se seccionó el tejido en piezas de aproximadamente 1cm; las mismas se congelaron, liofilizaron y rallaron manualmente, realizando cuatro tandas de tejido procesado.

Los fragmentos de piel obtenidos se sometieron a doce tratamientos consecutivos de 24h cada uno: seis tratamientos de fosfato de sodio 0,211M, dos tratamientos de cloruro de sodio 0,480M, dos tratamientos de buffer de citrato 0,225M (ajustado pH 3,7) y dos tratamientos de ácido acético de 0,175M.

Después de cada tratamiento, cada muestra se centrifugó a 800xg durante 15min, se eliminó el sobrenadante, se añadieron 500 ml de agua deionizada sobre el precipitado y se colocó en agitación suave durante 15min. Luego dicha solución fue centrifugada una vez más y se eliminó el agua para añadir la solución del tratamiento siguiente; y tras 15 min de agitación la muestra se reservó a 4°C. Una vez completos los 12 tratamientos las muestras se lavaron cuatro veces con agua deionizada, se frizaron y liofilizaron. Las muestras se reservaron en freezer a -20 °C. Se sintetiza el proceso descrito en el siguiente esquema (ver Fig. 3).

El rendimiento de este procedimiento se definió como la relación porcentual entre el peso final de la muestra liofilizada y el peso inicial de la piel liofilizada procesada.

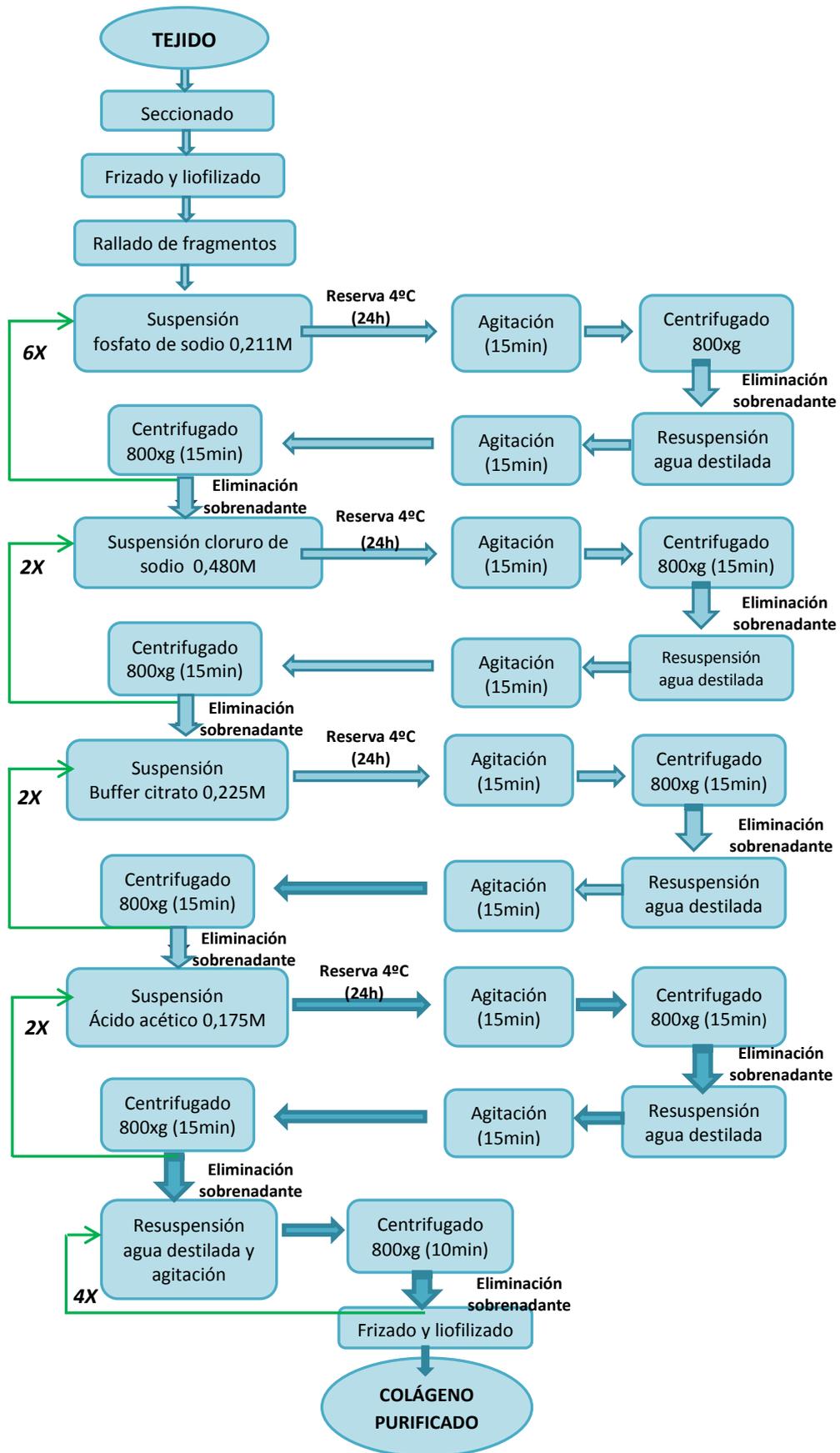


Figura 3. Esquema del protocolo desarrollado para la purificación de colágeno tipo I de piel porcina.



Figura 4. Purificación de colágeno de piel porcina. A y B: corte del tejido, C: fragmentos liofilizados, D y E: rallado de los fragmentos liofilizados, F: pesado antes de iniciar los tratamientos, G: suspensión en solución de tratamiento y agitación, H: centrifugado de los tubos, I: separación del sobrenadante, J y K: liofilizados finales y pesado de los mismos.

## **Cuantificación y caracterización del colágeno.**

### *1. Cuantificación de proteína total.*

Se cuantificó la cantidad de proteína total utilizando un método descrito por Komsa-Penkova (1996)<sup>(56)</sup>, a través de la medición de su absorbancia a 560nm. Este método es una modificación de la técnica de Lowry<sup>(57)</sup> que permite cuantificar proteínas fibrilares como el colágeno que no se solubilizan con el método convencional. Se utilizó colágeno tipo I comercial (Sigma St Louis, USA) como estándar.

Se tomaron muestras representativas de cada una de las cuatro tandas de colágeno liofilizado obtenido con el protocolo descrito anteriormente. Se procedió a pesar con una balanza de precisión la cantidad de miligramos de cada muestra y se hicieron las diluciones correspondientes con agua deionizada, de modo que las soluciones tuviesen la misma concentración (0,93mg de esponja/ml). Para ello se cortaron con bisturí los liofilizados en fragmentos pequeños y homogeneizaron intensamente durante 4h. Con el colágeno testigo se realizaron los mismos pasos para obtener una solución de 0,88mg/ml.

Para obtener la curva estándar en el rango de linealidad, se prepararon tubos con el testigo de colágeno con concentraciones que variaron desde los 0,11mg/ml hasta los 0,44mg/ml. Por otro lado, se prepararon series de diluciones de colágeno a partir de las soluciones madres de cada una de las muestras del material purificado, con valores de concentración comprendidos entre los 0,22mg/ml y 0,465mg/ml.

Se incubaron volúmenes de 200µl de las suspensiones con 180µl de solución acuosa de 0.4% tartrato de sodio-potasio, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaOH 0,5M, y 20µl de una solución acuosa de 2% tartrato de sodio-potasio, 3% Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O y NaOH 0,1M a 55°C durante 20min en un baño caliente. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, se añadieron 600µl de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:15), se agitaron los tubos y se incubaron a 55°C durante 10 min.

Se midió la absorbancia de las muestras a temperatura ambiente con espectrofotómetro (Beckman) a una longitud de onda de 650nm, midiendo primero el testigo para la curva de calibración. Para todas las lecturas, se realizó cada muestra por triplicado.

## 2. Cuantificación de cantidad de colágeno.

Se realizó un ensayo colorimétrico Sirius Red en una placa de 96 pocillos para la cuantificación del contenido de colágeno según el procedimiento descrito por Kliment y cols. (2011)<sup>(58)</sup> usando colágeno tipo I (Sigma St Louis, USA) como testigo. La curva de calibración se construyó con un estándar de colágeno en un rango de 40µg a 2µg por pocillo, cada concentración se ensayó por duplicado. Se analizaron ocho muestras del colágeno purificado, ensayando seis concentraciones con rangos entre 5µg y 48µg de proteína; y realizando cada concentración por triplicado. Las cantidades de solución en microlitros que fueron sembradas en cada pocillo de la placa se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1. Protocolo para sembrado de placa para cuantificación con Sirius Red. Las concentraciones indicadas corresponden a la cantidad de miligramos de esponja por mililitros de agua.**

MUESTRA 0,465mg/ml						MUESTRA 0,465mg/ml					
100	75	50	25	20	15	100	75	50	25	20	15
TESTIGO COLÁGENO 0,20mg/ml										diH2O	
200	150	125	100	75	50	25	20	15	10	100	50

Una vez sembradas las muestras se dejó secar la placa durante la noche en una estufa a 40°C y luego se lavó tres veces con agua destilada (150µl por pocillo). Se añadieron a cada pocillo 150µl del colorante Sirius Red (Direct Red 80, Sigma St Louis, USA) disuelto al 0,1% en ácido pícrico saturado y se incubó durante 1h a temperatura ambiente sobre un agitador (75 rpm). Se lavó la placa cuatro veces con agua acidificada (5% ácido acético, 150µl por pocillo) y se incubó con 150µl de NaOH 0,1M durante 30 min a temperatura ambiente en agitación (95 rpm). Luego se trasvasó el contenido de cada pocillo a una nueva placa para efectuar la lectura en el espectrofotómetro (lector de microplaca *MultiskanSpectrum*, ThermoScientific) a 550nm.

## 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Se analizó el contenido de proteínas del colágeno obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS), basándose en el método de Laemmli<sup>(59)</sup>. Se empleó un gel desnaturante de poliacrilamida con una concentración de 7,5% para el gel resolutivo y 4% para el gel concentrador para analizar una muestra representativa de colágeno. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio espectro (bio-Rad) y colágeno tipo I (Sigma St Louis, USA) como control.

Las muestras y el testigo de colágeno se disolvieron con un buffer de solubilización (SDS 1% (p/v), 100mM Tris-base, pH 9,5) a una concentración de 1mg/ml. Las soluciones se mezclaron con un buffer preparador de muestra (0,5M Tris-HCl pH 6,8, SDS al 10%, glicerol, azul de bromofenol, agua deionizada) en relación 1:1 y  $\beta$ -mercaptoetanol; luego se calentó durante 15 min a 95°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se cargaron 40 $\mu$ l de muestra por calle en el gel de poliacrilamida.

Se realizó la corrida electroforética durante 2h, aplicando durante los primeros 30 min un voltaje de 100V para permitir que las muestras cargadas penetren en el gel con un perfil de bajada parejo en todas las calles; luego se llevó la fuente a 140V durante 45 min, y finalmente se aumentó a 150V durante 45 min para terminar la corrida.

Al término se retiró el gel de la cuba y se fijó con una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético al 10% durante 30 min. Se colocó el gel en una solución de Comassie Blue R-250 0,05% (p/v) en metanol al 10% y ácido acético 5% (v/v) y se dejó en agitación suave (50 rpm) durante toda la noche. Se quitó la solución teñidora y se destiñó el gel con una solución de metanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), cambiando la misma hasta quitar el fondo azul del gel; finalmente se colocó el gel en una solución preservadora (5% glicerol, 10% ácido acético) durante 10 min y se reservó en agua. El gel de poliacrilamida con SDS fue analizado utilizando el software *CliqS 1D pro* de TotalLab.

### **Mediciones de viscosidad**

Este ensayo se realizó en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC). Se hidrató la esponja de colágeno con buffer fosfato salino (PBS) en una proporción de 60mg de esponja por mililitro de PBS. Se midió la viscosidad de la dispersión de colágeno mediante un reómetro de plato MCR501 (Anton Para GmbH, Alemania) utilizando el sistema PP8 de medición plato a plato. La distancia entre placas (espesor de muestra o GAP) se fijó en 1mm y la temperatura a 10°C. Esta baja temperatura fue necesaria para prevenir la evaporación en el borde de los platos, la cual podría haber llevado a un aumento en la concentración de la dispersión de colágeno y consecuentemente afectar la medición. La dispersión del colágeno se aplicó entre las placas y el sistema se templó durante cinco minutos para finalmente medir la viscosidad en

el modo oscilatorio con una frecuencia en el rango de 0,001 a  $1s^{-1}$  para caracterizar el comportamiento del fluido.

### **Fabricación de andamios de colágeno mediante impresión 3D**

Se obtuvo una biotinta rehidratando el colágeno purificado, para lo cual se colocó el mismo en una placa de Petri y se agregó agua deionizada (60 mg/ml), obteniendo una consistencia de gel. Se realizaron pruebas con la misma para comprobar su imprimibilidad, y posteriormente se generaron los andamios (LifeScience, Córdoba) utilizando una bioimpresora de extrusión, con una resolución igual a  $500\mu m$  en los tres ejes ( $0,514 \pm 0,019$  mm diámetro interior de la aguja)<sup>(54)</sup> según el diseño establecido previamente de 6 x 6 x 4 mm de alto.

### **Caracterización de los andamios impresos**

#### *1. Difracción de rayos X.*

Se realizó un estudio de difracción de rayos X con un equipo Philips DRX 1800 (LAMARX, IFEG-FaMAF-UNC), operando a 40kV y 30mA. Las muestras se analizaron a  $2\theta/\theta$  entre 5 y  $60^\circ$  con un paso de  $0,02^\circ$  y a una velocidad de  $1 \text{ min}^{-1}$ . Para observar el difractograma correspondiente se realizó un gráfico utilizando el software *GraphPad* a fin de identificar el patrón característico del material.

#### *2. Estudios de hinchamiento de agua y porosidad.*

Se pesaron y se incubaron dos andamios en agua destilada a temperatura ambiente y determinando el peso húmedo de los mismos 24h después para realizar el estudio de hinchamiento. El porcentaje de hinchamiento de agua se definió como la relación porcentual del incremento de peso respecto al peso inicial del composite.

Se calculó la porosidad mediante la inmersión de los andamios (peso inicial en seco  $W_0$ ) en etanol a temperatura ambiente durante 24h (peso en etanol  $W$ ) a través de la siguiente fórmula<sup>(60)</sup>:

$$\text{Porosidad (\%)} = \frac{(W - W_0) \times \rho_1}{\rho_1 \times W + (\rho_2 - \rho_1)W_0} \times 100$$

Donde  $\rho_1$  y  $\rho_2$  representan la densidad del colágeno (1,21g/ml) y del etanol (0,79g/ml), respectivamente. Se ensayaron cinco andamios, realizando sobre tres de ellos una repetición del procedimiento de medición de porosidad.

### *3. Micro y macroestructura de los andamios impresos.*

Se realizó una microscopía de barrido electrónico (SEM), para estudiar la microestructura de los andamios 3D impresos, investigando la micro y macro porosidad de los mismos. En primer lugar, se fijó los andamios durante toda la noche en glutaraldehído al 4% en PBS a 4°C; luego de lo cual se lavaron tres veces con PBS y deshidrataron en un gradiente de etanol (10-100%) durante 10 min en cada paso de deshidratación. Finalmente, luego de un secado de punto crítico, las muestras se montaron en tacos, se rociaron con oro y analizaron usando un equipo FE-SEM Sigma a 5kV con magnificación variable (LAMARX, IFEG-FaMAF-UNC).

### **Ensayo de citotoxicidad.**

Este ensayo fue realizado por el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT, CONICET-UNC). Se evaluó la citotoxicidad del colágeno obtenido de acuerdo con un ensayo propuesto por la norma ISO 10993-5 (2009)<sup>(61)</sup>, utilizando extractos de las muestras según ISO 10993-12 (2012)<sup>(62)</sup>.

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 amarillo, la cual es captada por las células y reducida por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán, formando cristales azules insolubles en agua. Éstos, en cambio, 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 de la muestra permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

Se utilizó una de las líneas celulares sugerida por la norma para evaluar toxicidad de materiales para uso médico, la línea celular Vero de origen epitelial.

Las células se cultivaron en medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Pasching, Austria), 4mM de L-Glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4mM de Piruvato de Sodio (Sigma, St. Louis, USA) y 10.000 unidades/mL de penicilina - 10.000 µg/mL de estreptomicina. Se incubó la placa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h para la formación de una monocapa de células.

Para obtener el extracto del andamio de colágeno impreso se incubó 0,1g de muestra por mililitro de DMEM durante 72hs a una temperatura de 37°C. Se ensayaron cuatro diluciones para cada extracto, a concentraciones de 100, 75, 50 y 25% respectivamente.

Las células Vero se sembraron en una placa con una densidad de 10.000 células/pocillo e incubaron. Después de 24h se retiró el medio y se agregaron las diluciones de los extractos. Después de 24h, los pocillos se lavaron dos veces con PBS estéril, se agregó 50 µl de MTT 1mg/ml a cada pocillo y se incubó durante 1,30 h a 37 °C. Luego se agregó alcohol isopropílico (150µl) en cada pocillo para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se cuantificó por espectrofotometría a 595 nm usando un lector de microplaca Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). Como control positivo (CP) se utilizó una solución de fenol al 0,2%. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

El porcentaje de viabilidad celular se determinó como la relación porcentual entre la absorbancia (densidad óptica, DO) de las células tratadas y la absorbancia de las células crecidas en condiciones óptimas de cultivo.

**Cultivo celular sobre los andamios.**

El cultivo celular fue realizado por el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT, CONICET-UNC). Se esterilizaron los andamios impresos en etanol al 70% durante 12h y mediante exposición a luz ultravioleta durante 15 min; y luego se colocó cada uno de los andamios en una placa de polietileno de 24 pocillos y se sembraron con células epiteliales Vero (densidad 10.000 células/andamio). Se colocó los andamios sembrados en una incubadora a 37°C y una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, siendo cambiado el medio de cultivo cada tres días. El crecimiento y la migración celular fueron evaluadas a los 7 y 21 días de cultivo.

**Evaluación del crecimiento y la migración celular en los andamios.**

Se empleó el análisis histológico para investigar la infiltración de células en los andamios después de 7 y 21 días de cultivo. Los andamios de colágeno sembrados con células Vero fueron fijados en glutaraldehído (4% en PBS) durante toda una noche, el cual fue removido entonces mediante lavado extensivo.

Las tinciones histológicas fueron realizadas por el Instituto Oulton. Brevemente, se deshidrataron los andamios fijados en una serie de concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en parafina para el corte, obteniendo con un criostato secciones de 10µm de espesor perpendicularmente a la capa de células. Los cortes de los distintos andamios se desparafinaron, rehidrataron y tiñieron con hematoxilina-eosina (H&E). Todos estos pasos se realizaron a temperatura ambiente, y los cortes fueron luego lavados, deshidratados y montados en portaobjetos para observar con microscopio óptico. Se tomaron imágenes digitales de los mismos con una cámara CCD (Modelo DSU1-5MP) montado en un microscopio NIKON ECLIPSE TE-U 2000 (IIBYT, CONICET-UNC).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Purificación de colágeno.**

Se empleó un procedimiento de purificación no enzimático para obtener colágeno insoluble a partir de piel porcina con el protocolo descrito, a través de una serie de tratamientos del tejido con ácidos y sales. Se obtuvieron rendimientos entre 11-16 % para las distintas tandas trabajadas, calculados como la relación porcentual entre el peso final de la muestra liofilizada y el peso inicial de la piel liofilizada (pesado previamente al comienzo de los tratamientos). Tanto en la etapa de rallado del tejido liofilizado como en los primeros tratamientos con la solución de fosfato de sodio se observó el desprendimiento de gran cantidad de grasa en la piel procesada, lo cual incidió en el rendimiento del protocolo, ya que el tratamiento químico aísla la proteína del resto de componentes del tejido; siendo esto informado también por otros autores<sup>(63)</sup>. Similar método empleado para extraer colágeno a partir de tendones de distintas fuentes animales<sup>(55)</sup> ha resultado en mayores rendimientos, debido probablemente a la ausencia de grasa en dicho tejido.

Con respecto a otros métodos de extracción reportados<sup>(64;65)</sup> (basados en solubilización en un medio ácido, digestión enzimática y un proceso de diálisis), se encontró ventajoso este método al preservar la estructura fibrilar del colágeno, la cual imparte resistencia mecánica al material permitiendo luego un comportamiento adecuado para la impresión 3D de los andamios. Además, el mismo implica un costo significativamente menor en relación a los métodos enzimáticos normalmente empleados, evitando el uso de una membrana para diálisis y enzimas, las cuales representan costos mucho más altos.

### **Cuantificación y caracterización del colágeno extraído.**

Luego de obtener el producto se cuantificó el contenido de proteína y de colágeno presente en la muestra mediante técnicas colorimétricas, a fin de caracterizar el material obtenido.

Se tomaron tres muestras de cada tanda para cuantificar la cantidad total de proteína por cantidad de esponja según el método descrito previamente. Para conocer el

rango de concentraciones en las que la concentración de proteína y absorbancia mantienen una relación lineal, se realizó una curva de calibración con el testigo de colágeno. Una vez conocido el rango de trabajo (concentraciones entre 0,11 y 0,46 mg/ml), se realizó una regresión lineal para obtener el coeficiente de extinción.

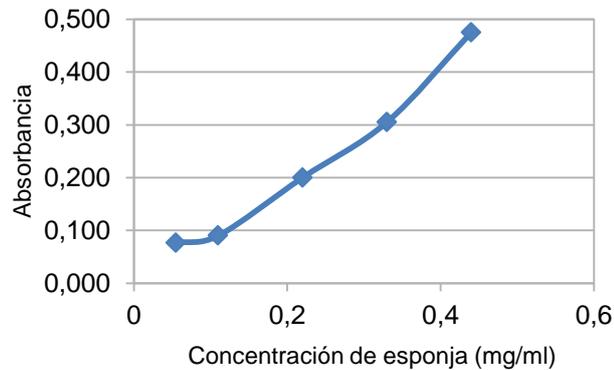


Figura 5. Curva de calibración del testigo de colágeno.

La cantidad total de proteína por miligramo de esponja fue de un 90,25% promedio, con un error del 4,56%; indicando que la composición del material purificado consistió mayormente de proteínas.

Tabla 2. Cuantificación de contenido de proteínas en las esponjas de colágeno extraído.

	Esponja (mg)	H <sub>2</sub> O (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)		Cantidad de proteína por cantidad de esponja (%)	
A1	6,9	7,42	0,969	±0,054	104,15	±5,83
A2	7,3	7,85	0,701	±0,036	75,41	±3,91
A3	7,3	7,85	0,983	±0,109	105,72	±11,75
B1	5,2	5,59	0,739	±0,035	79,49	±3,81
B2	7,5	8,06	0,911	±0,027	97,94	±2,89
B3	7,5	8,06	0,972	±0,049	104,44	±5,23
C1	13,3	14,4	0,915	±0,055	99,07	±5,95
C3	10,3	11,07	0,742	±0,061	79,72	±6,61
C4	9,5	10,22	0,720	±0,041	77,41	±3,36
D1	4,6	4,95	0,631	±0,020	67,95	±1,42
D3	6,1	6,56	1,077	±0,076	115,84	±8,21
D4	4,5	4,84	0,706	±0,063	75,93	±6,75
Promedio total					90,25	±4,56

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se tomaron seis muestras, y se cuantificó la cantidad de colágeno por proteína a través de espectrofotometría, con una técnica basada en la afinidad específica del colorante Sirius Red por la estructura de triple hélice del colágeno. Se realizó la curva de calibración del testigo de colágeno y se trabajó

de manera similar al punto anterior (rango de linealidad identificado entre los 0,003 $\mu$ g y 0,03 $\mu$ g de proteína). En base a las cantidades de proteína sembradas para cada muestra se calcularon las correspondientes cantidades de colágeno en miligramos y se expresaron los resultados como porcentaje.

El porcentaje de colágeno por el contenido total de proteína fue de un 94% promedio, con un error asociado de 6,98%. Esto indica que la mayoría de la esponja obtenida está compuesta por colágeno tipo I, corroborando la efectividad del protocolo de extracción para obtener un producto con alto grado de pureza.

Respecto al peso inicial de piel tratada para purificación, se encontró que el método de purificación empleado permitió obtener una buena cantidad de colágeno con alto grado de pureza; trabajos realizados por otros autores informan extracciones con contenidos mucho menores en cuanto a cantidad de colágeno referidos al peso de piel inicial <sup>(64-67)</sup>.

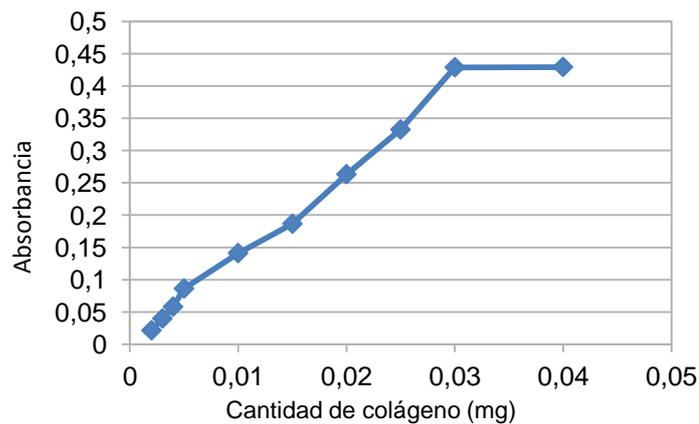


Figura 6. Curva de calibración del testigo para cuantificación de colágeno por Sirius Red.

Tabla 3. Cuantificación de la cantidad de colágeno sobre cantidad de proteína de las muestras.

	Proteína (mg/ml)	Colágeno (mg/ml)	Cantidad de colágeno por cantidad de proteína (%)	
A1	0,484	0,446	<b>92,09</b>	$\pm 0,77$
B1	0,360	0,258	<b>71,63</b>	$\pm 0,24$
B2	0,471	0,375	<b>79,65</b>	$\pm 0,32$
C1	0,451	0,441	<b>97,77</b>	$\pm 0,26$
C3	0,366	0,276	<b>75,57</b>	$\pm 0,41$
C4	0,360	0,368	<b>102,31</b>	$\pm 1,29$
D1	0,316	0,316	<b>99,95</b>	$\pm 0,96$
D4	0,353	0,471	<b>133,50</b>	$\pm 0,56$
<b>Promedio</b>			<b>94,06</b>	$\pm 6,98$

También se analizó la pureza del colágeno mediante la técnica de electroforesis. El patrón electroforético obtenido se presenta en la Fig. 7, encontrándose en la primera calle el marcador de peso molecular, en las calles 2, 4, 6, 8 y 10 el testigo de colágeno y en las calles 3, 5, 7 y 9 la muestra de estudio.

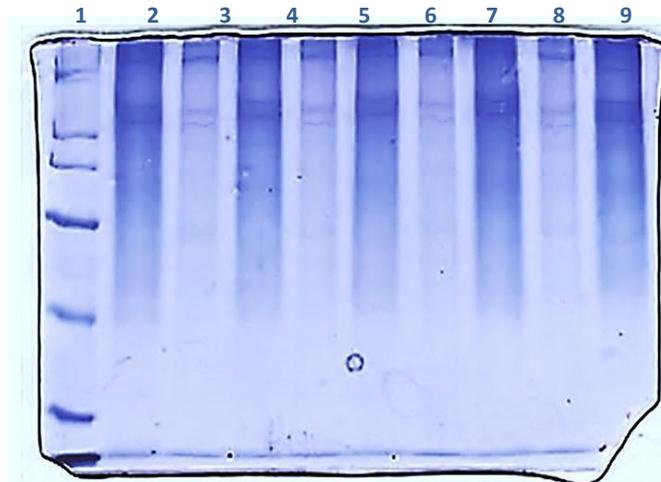


Figura 7. Gel de poliacrilamida tras la tinción, mostrando la separación de bandas de las muestras.

En los patrones electroforéticos de la muestra y del testigo de colágeno tipo I se detectan las mismas cuatro bandas: dos bandas cercanas entre sí con pesos moleculares en los 137 y 152kDa, que se corresponden con las cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  del colágeno; y dos bandas con pesos moleculares mayores, una en los 250kDa y otra en 300 kDa respectivamente, las cuales corresponden a dímeros (cadena  $\beta$ ), y trímeros (cadena helicoidal  $\gamma$ ) de las anteriores; características de la estructura del colágeno tipo I. Este patrón es semejante a los resultados reportados en otros trabajos para colágeno extraído de varias especies, que muestran presencia de cadenas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , dímeros  $\beta$  <sup>(64;68-70)</sup> y trímeros o cadenas helicoidales <sup>(66)</sup>.

Tabla 4. Pesos moleculares correspondientes a cada banda. Los valores están indicados en kDa.

Bandas /Calle	Marcador PM	Muestra colágeno				Testigo colágeno				
	1	3	5	7	9	2	4	6	8	10
1	200	293,43	293,43	298,45	288,95	288,95	303,09	303,09	298,45	284,11
2	116,25	255,70	252,99	249,94	247,31	252,99	255,70	258,83	249,94	249,94
3	97,4	148,81	153,28	160,18	148,81	155,47	157,91	160,18	157,91	153,28
4	66,2	138,39	138,39	140,32	134,43	144,49	146,53	142,49	140,32	136,30
5	45									
6	31									
7	21,5									

## Mediciones de viscosidad

Se ensayaron dos muestras de colágeno con un reómetro de placas paralelas como se ha descrito en materiales y métodos. Se analizó la viscosidad en el rango de velocidades de corte (frecuencia) presentes en la jeringa de la bioimpresora durante la extrusión, observándose que el valor de la misma disminuye a medida que aumenta la frecuencia.

Se encontró que las dispersiones de colágeno fueron altamente viscosas, presentando valores mayores por un orden de magnitud respecto a las viscosidades informadas en el trabajo de Lode y cols<sup>(50)</sup>, que realizaron estudios comparables. Los estudios reométricos también indicaron que el material exhibe un comportamiento pseudoplástico, también reportado por el grupo de trabajo mencionado.

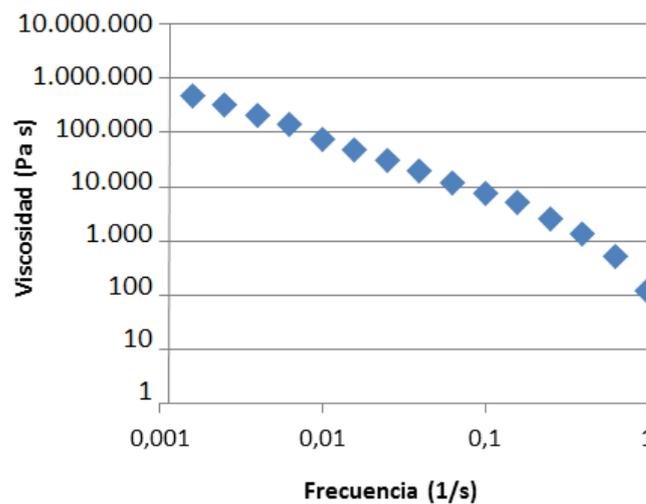


Figura 8. Mediciones reométricas de la dispersión de colágeno.

## Fabricación de andamios de colágeno y caracterización.

Con la biotinta se pudieron fabricar andamios de colágeno a través de impresión tridimensional a temperatura ambiente. La alta viscosidad del colágeno obtenido permitió depositar hebras con presentaron suficiente consistencia para formar la estructura del andamio según la geometría predefinida (CAD) y resistencia adecuada para soportar la construcción de la estructura en el eje Z. Además, las propiedades pseudoplásticas del colágeno se consideraron ventajosas para el proceso de impresión, ya que durante la extrusión del material su viscosidad disminuye a causa de las fuerzas en la boquilla de

impresión, favoreciendo así el flujo del material. Por otro lado después de la deposición (velocidad de flujo nula) la viscosidad del colágeno es muy alta, contribuyendo a la estabilidad y facilitando la fidelidad de forma de la estructura construida.

Se muestra a continuación uno de los andamios impresos (Fig. 9), cuyas dimensiones fueron de 6mm x 6mm x 4mm aproximadamente.



Figura 9. Vista superior de un andamio impreso, observándose el entramado de las capas impresas.

El patrón de difracción de rayos X obtenido para el andamio de colágeno impreso se muestra en la siguiente figura (Fig. 10). Se observa un pico en proximidades de los  $23^\circ$ , correspondiente a un patrón típico del colágeno puro <sup>(71-73)</sup>, por lo que podemos verificar que no se ha afectado la estructura del colágeno durante el proceso y que la triple hélice ha sido conservada.

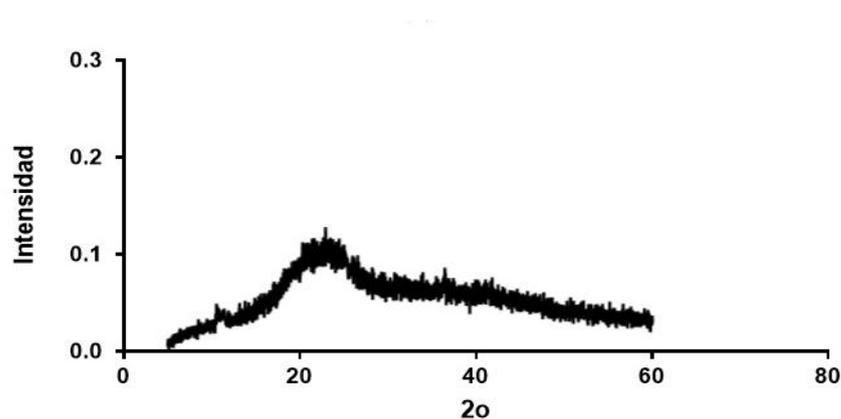


Figura 10. Patrón de difracción de rayos X del andamio impreso.

Para conocer el hinchamiento de agua y porosidad de los andamios 3D impresos se llevaron a cabo los estudios correspondientes, cuyos resultados y mediciones realizadas se muestran en las Tablas 5 y 6.

El hinchamiento de agua es un parámetro importante porque indica cómo responderá el andamio en contacto con un fluido corporal; la capacidad del andamio de tomar agua es favorable para la adhesión y crecimiento celular, y para estudios sobre colágeno se han encontrado porcentajes entre 1000 -1700%<sup>(55;73;74)</sup>.

**Tabla 5. Hinchamiento de agua de los andamios de colágeno.**

	W <sub>0</sub> (mg)	W (mg)	% Hinchamiento
1	4,2	49,2	1071,43
2	9,5	98,9	941,05

**Tabla 6. Mediciones y cálculo de porosidad de los andamios.**

Medición	W <sub>0</sub> (mg)	W (mg)	Porosidad (%)
1	5,1	15,1	92,59
2	3,5	8,5	90,10
3	10	24,5	90,23
4	4	14,3	94,25
5	9,2	20	88,20
6	4,7	15	93,31
7	5,2	8,9	81,92
8	9,5	25,6	91,52
Promedio			90,27
Error			1,38

En cuanto a la microestructura de los andamios, éstos presentaron alta porosidad, con un valor medio de 90,27%  $\pm$  1,38%, y una estructura de poros regulares e interconectados, confirmada por el análisis estructural mediante SEM.

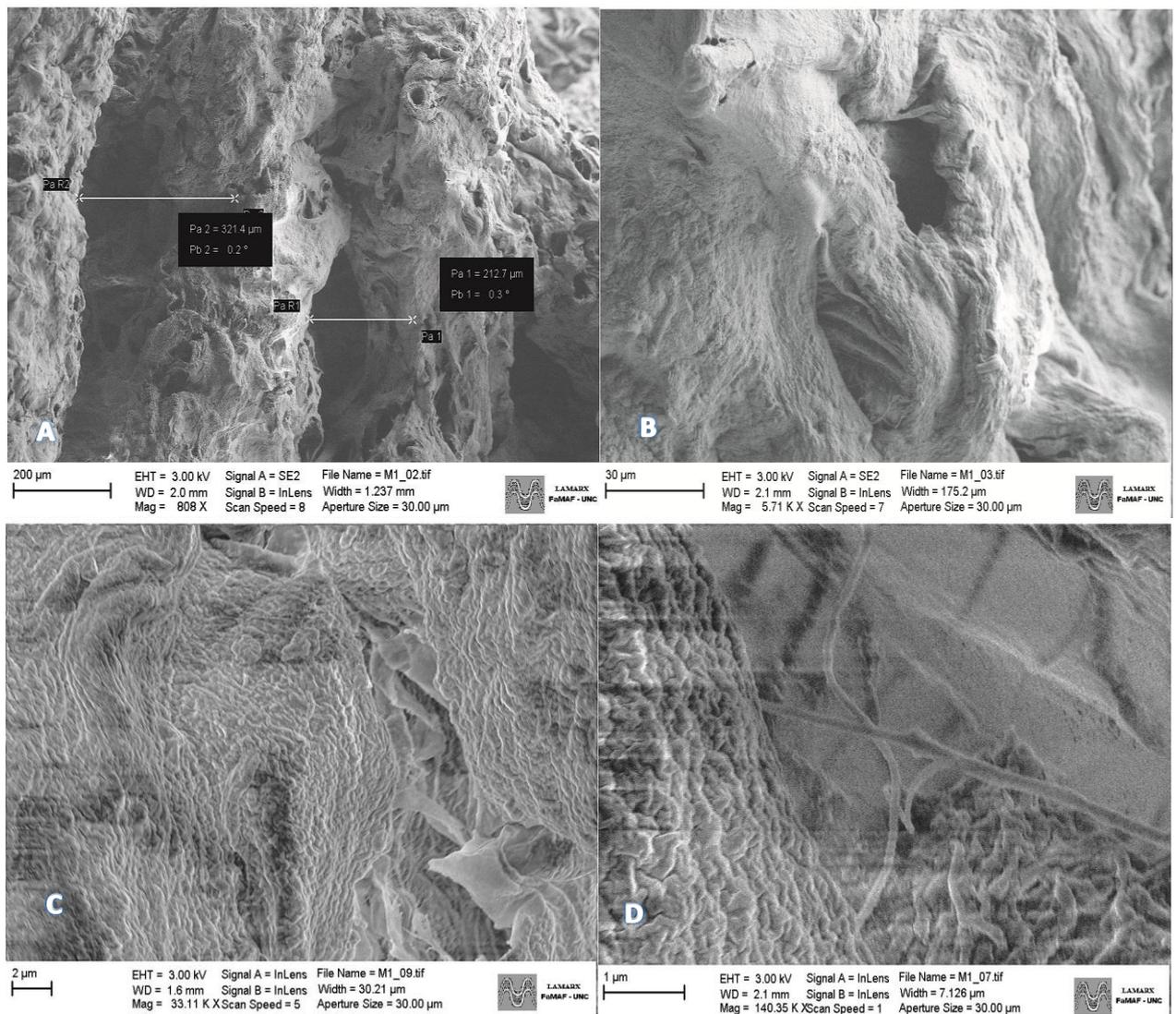
Este es un punto de gran importancia, ya que una microestructura altamente porosa con interconectividad de sus poros es crítica para asegurar una distribución uniforme de células, así como su supervivencia, proliferación y migración *in vitro*, afectando directamente la difusión de nutrientes y desechos metabólicos de las células en los andamios; y también debe proveer el espacio necesario para el crecimiento de vasculatura desde los tejidos circundantes *in vivo*<sup>(16)</sup>.

Generalmente porosidades mayores al 90% son óptimas, mientras que el tamaño de poro del andamio óptimo que permite la entrada máxima de células, así como la adhesión celular y la deposición de matriz varía con los diferentes tipos de células y el tipo de tejido<sup>(16;76)</sup>.

Otros estudios sobre andamios ventajosos para el crecimiento de tejidos y células basados en colágeno exhibieron porosidades similares a las obtenidas<sup>(23;76)</sup>.

En las imágenes de microscopía SEM se indican los macroporos formados en la estructura (Fig 11 (A)), cuyos tamaños se encontraron alrededor de los 300 $\mu$ m y los cuales son necesarios para la neo vascularización en los andamios, como se mencionó anteriormente. Puede observarse además la existencia de microporos con tamaños cerca de los 30 $\mu$ m (Fig. 11 (B)), siendo éstos importantes para la adherencia e ingreso de las células; estando de acuerdo con otros reportes donde se indican andamios basados en colágeno regenerativamente activos con una microestructura porosa específica con tamaños de poro entre los 20 - 125 $\mu$ m<sup>(77;78)</sup>.

Se indica además la presencia de las fibras de colágeno laminar de tamaño nanométrico (Fig. 11 (C) (D)), cuyo diámetro fue del orden de los 100nm, concordando con los resultados esperados.



**Figura 11.** Microscopía electrónica de barrido de los andamios impresos a distintas magnificaciones. A: Se indican las mediciones de los tamaños de dos macroporos contiguos. B: Imagen de un microporo. C y D: Estructura y fibras de colágeno laminar nanométricas.

### Ensayo de Citotoxicidad de los andamios

Se analizó el potencial efecto citotóxico del andamio hacia células Vero. Las células fueron incubadas durante 24h en presencia de distintas concentraciones de extracto de colágeno y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. Se calculó el porcentaje de viabilidad de la siguiente manera:  $\%Viabilidad = (DO \text{ células tratadas} / \text{células control}) \times 100$ . Los resultados obtenidos se muestran a continuación (ver Fig. 12 y Tabla7).

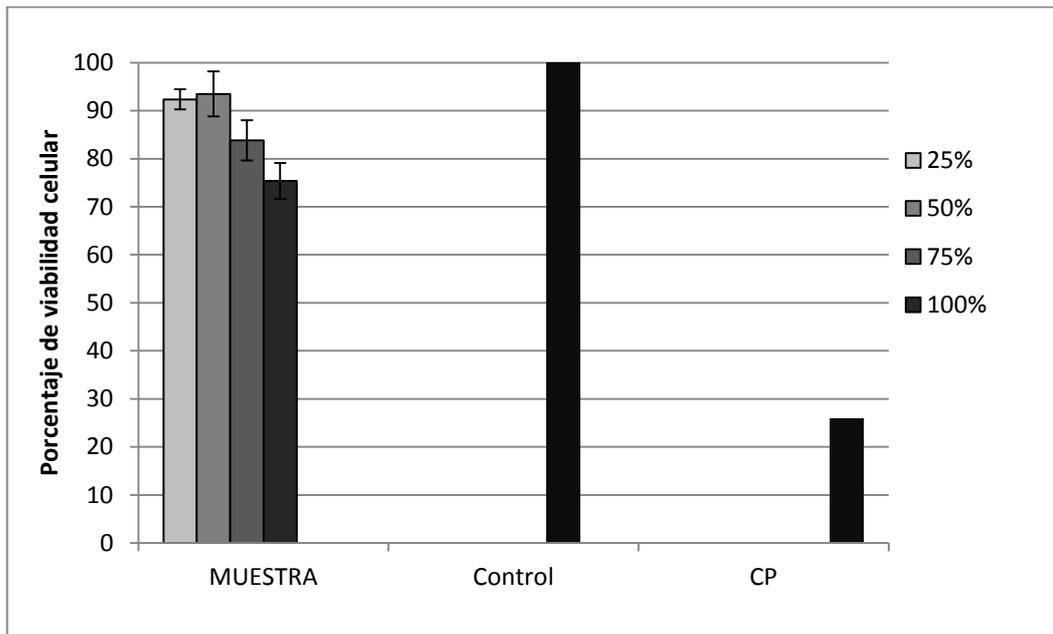


Figura 12. Porcentajes de viabilidad obtenidos para células Vero crecidas en presencia de los extractos de colágeno luego de 24h de cultivo. CP: control positivo.

Bajo las condiciones de ensayo, los andamios de colágeno de piel porcina purificado mediante el protocolo desarrollado no muestran evidencia de citotoxicidad; ya que en todas las concentraciones de extracto ensayadas por triplicado la viabilidad celular fue mayor al valor aceptable del 70% indicado por la Norma ISO 10993.

Tabla 7. Resultados del ensayo de citotoxicidad.

Objeto de ensayo	Viabilidad celular
Muestra	>70 %
Control positivo	<50 %

### Cultivos celulares sobre andamios impresos

El análisis microscópico de las células Vero cultivadas sobre los andamios 3D impresos reveló una distribución uniforme de las células sobre la superficie de las hebras de colágeno, indicando buena adhesión celular en los andamios, la proliferación de las mismas y fácil infiltración en la estructura a través de los poros interconectados. En las Fig. 12 y 13 se muestran las imágenes tomadas tras 7 y 21 días de cultivo respectivamente. En estas tinciones se identifican las células y sus respectivos núcleos coloreados en tono púrpura y el colágeno en tono rosado.

Se observa que las células Vero sembradas ocuparon totalmente los espacios entre las hebras de colágeno impresas, distribuyéndose en la periferia del andamio y en los poros abiertos entre hebras contiguas. En la primera semana de cultivo ya puede apreciarse lo anterior, a pesar de la menor cantidad de células, que se hallan adheridas a la superficie del colágeno y forman una monocapa (Fig. 13 (A) (B)). En los cortes vistos a menor aumento también puede observarse la estructura porosa de los andamios preservada, distinguiéndose las hebras trazadas con la bioimpresora y las canaletas formadas según el diseño previo (Fig. 13 (C) (D)).

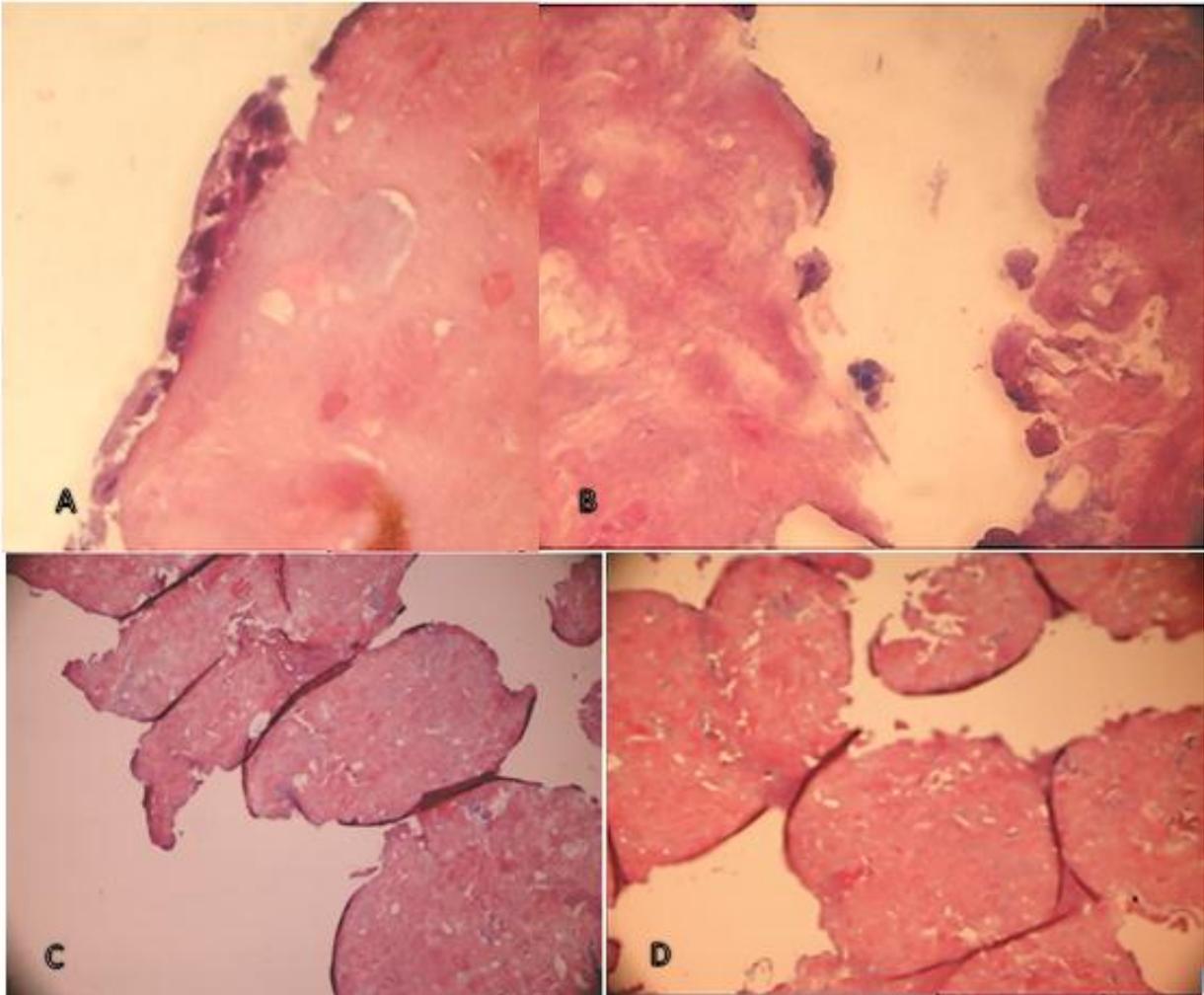


Figura 13. Cultivo celular de 7 días con tinción H&E a diferentes magnificaciones. A: células adheridas al colágeno en la periferia del andamio (60x). B: Células dentro de un poro de la estructura (40x). C y D: Vistas de la estructura porosa impresa en distintos cortes (10x).

Luego de 21 días de cultivo, se observa una capa densa de células cubriendo las hebras, verificando un gran incremento en el número de las mismas, así como también su migración a través de los canales diseñados en la estructura del andamio e infiltración en los poros (Fig. 14 (A) (B)).

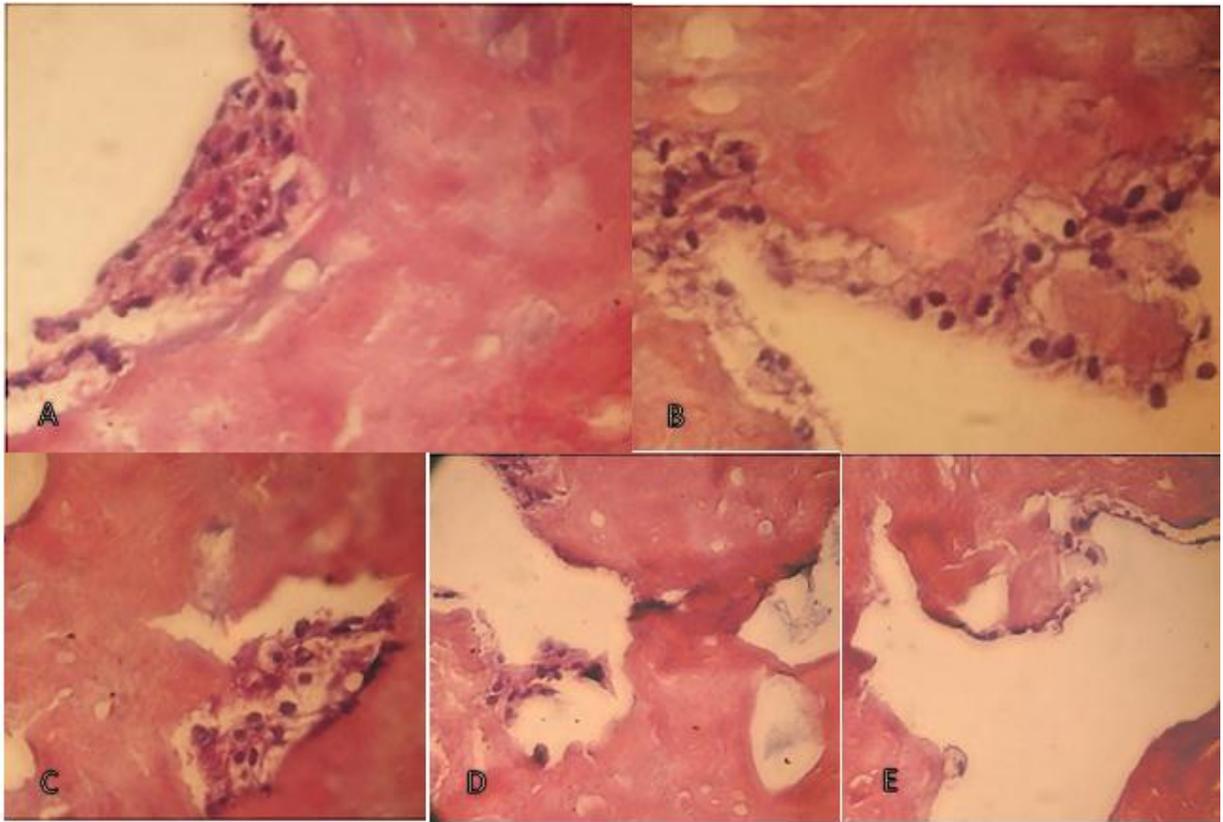


Figura 14. Cultivo celular de 21 días con tinción H&E a diferentes magnificaciones. A y B: cúmulos de células adheridas a las hebras de colágeno del andamio (60x). C: Células ocupando un poro (60x). D y E: Células distribuidas en los poros de la estructura (40x).

## CONCLUSIONES

La metodología de purificación permitió la obtención de colágeno tipo I con alto grado de pureza, determinada electroforéticamente y a través de las cuantificaciones realizadas, adecuado para ser empleado en impresión 3D de andamios.

Uno de los objetivos planteados fue la preparación de una biotinta de colágeno apta para la impresión 3D de una estructura compleja. Determinante clave en este punto es la viscosidad del material, por lo que se hicieron las correspondientes mediciones reológicas, confirmando un comportamiento adecuado del fluido. La alta viscosidad de la biotinta (por su alto contenido de fibras de colágeno) y comportamiento pseudoplástico contribuyeron a la fidelidad de impresión y estabilidad de las hebras extruidas luego de su deposición. La impresión tridimensional a temperatura ambiente del colágeno descrita en el presente estudio permitió la fabricación precisa de andamios 3D para uso biomédico. Las distintas imágenes microscópicas permitieron verificar la estructura porosa interna y arquitectura de los andamios formados con la bioimpresión. Los andamios resultantes exhibieron estabilidad bajo condiciones de cultivo y presentaron microporosidad y macroporos generados por la deposición de hebras, con tamaños de poro en un rango adecuado para varias aplicaciones en ingeniería de tejidos. Los andamios de colágeno estudiados demostraron favorecer la adhesión y migración celular dentro de la estructura, permitiendo que las células permanecieran viables y crecieran en número durante varios días de cultivo; confirmando la idoneidad del colágeno tipo I y revelando que el proceso de purificación del mismo, preparación de la biotinta y fabricación de los andamios por bioimpresión no tuvieron impacto negativo sobre su citocompatibilidad y demostrando su potencial para aplicaciones de ingeniería en tejidos.

El objetivo del presente trabajo fue cumplido y ha sentado las bases para la realización de futuros ensayos sobre los andamios impresos, así como la posibilidad de su aplicación *in vivo* en animales. Para el uso en ingeniería en tejidos deben estudiarse además parámetros como tasa de degradación y propiedades mecánicas; así como también la posibilidad de entrecruzamiento y de combinar el colágeno tipo I con glucosaminoglicanos u otros para mejorar aspectos tales como estabilidad y degradación, hinchamiento de agua y porosidad, de manera que los andamios reproduzcan más exactamente a la MEC biológica.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. **Ikada, Y.** "Scope of Tissue Engineering" en *Tissue Engineering Fundamentals and Applications.*, 1st ed, vol. 8. Mie, Japan: Academic Press, 2006.
2. **Ramalingam, M., Haidar, Z., Ramakrishna, S., Kobayashi, H., Haikel, Y.** Protocols for Biomaterial Scaffold Fabrication. *Integrated materials for Tissue Engineering.* 1st ed., vol. 4, Strasbourg, France: John Wiley and Sons, 2012.
3. *Printing and Prototyping of tissues and scaffolds.* **Derby, B** American Association for the Advancement of Science, vol. 338, pp. 921-926, 2012.
4. *3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications.* **Gu, B .K, Choi, D. J., Park, S. J., Kim, M. S., Kang, C. M., Kim, C. H.** Biomater Res, vol. 20, ed. 12, 2016.
5. **Fratzl, P.** Applications, Biomimetic Collagen Tissues: Collagenous Tissue Engineering and Other. *Collagen Structure and Mechanics.* Springer, USA, 2008.
6. *A three-dimensional hierarchical collagen scaffold fabricated by a combined solid freeform fabrication (SFF) and electrospinning process to enhance mesenchymal stem cell (MSC) proliferation.* **Ahn, S.H., Koh, Y. H., Kim, G.H.** Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 20, ed. 6, pp. 7, May 2010.
7. *Tissue engineering.* **Langer, R., Vacanti, J. P.** Science, 260(5110): 920–926, 1993.
8. *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds.* **Sachlos, E. and Czernuszka, J.T.** Eur. Cell Mater. 5, pp29–40, 2003.
9. *Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size.* **Loh, Q. L., Choong, C.** Tissue Eng. Part B Rev. 19(6): 485–502, 2013.
10. *Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix.* **Badylak, S. F.** Anat. Rec. B New Anat. 287, pp36–41, 2005.
11. *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives.* **Hutmacher, D. W.** J Biomater, vol. 12, ed. 1, pp. 107-124, 2001.
12. **van Blitterswijk, C.A., de Boer J.** Degradation of Biomaterials. *Tissue Engineering Second Edition.* Elsevier Inc, 2015.
13. *Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition.* **Zeltinger, J., Sherwood, J.K., Graham, D.A., Mueller, R., Griffith, L.G.** Tissue Eng7:557–572, 2001.
14. *Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects.* **Li, J., Chen, M., Fan, X., Zhou, H.** J Transl Med, vol. 14, ed. 271, 2016.
15. *Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems.* **Hutmacher, D. W., Sitterger, M. &Risbud, M. V.** Trends Biotechnol, vol. 22, ed. 7, pp. 354- 362, 2004.

16. *Solid freeform fabrication of threedimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.* **Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K.** Biomaterials 24, pp2363–2378, 2003.
17. *Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential.* **Yeong, W. Y., Chua, C. K., Leong, K. F., Chandrasekaran, M.** Trends in Biotechnology 22, pp643-652, 2004.
18. *Three-dimensional bioprinting in tissue engineering in regenerative medicine.* **Gao G, Cui X.** BiotechnolLett, vol. 38, ed. 2, pp. 203-211, 2015.
19. *Porous scaffold design for tissue engineering.* **Hollister, S.J.** Nat Mater, vol. 4, ed. 7, pp. 518-524, 2005.
20. *3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration applications.* **Do, A. V., Khorsand, B., Geary, S. M., Salem, A. K.** Adv Healthcare Mater 2015, 4, 1742-1762.
21. **Ikada, Y.** Basic technologies developed for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Fundamentals.* 1st ed., vol. 8. Mie, Japan: Academic Press, 2006.
22. *Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues.* **An, J., Teoh, J.E.M., Suntuornond, R., Chua, C.K.** Engineering, vol. 1, ed. 2, pp. 261-268, 2015.
23. *Collagen Scaffolds for Tissue Engineering.* **Glowacki, J., Mizuno, S.** Biopolymers, vol. 89, ed. 5, pp. 338-344, 2008.
24. *3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application.* **Li, X., Cui, R., Sun, L., Aifantis, K.E, Fan, Y., Feng, Q., Cui, F., Watari, F.** International Journal of Polymer Science, 2014, 829145.
25. *Designing Biomaterials for 3D Printing.* **Guvendiren, M., Molde, J., Soares, R.M.D., Kohn, J.** ACS BiomaterSci, pp. 1679- 1693, 2016.
26. *3D bioprinting of tissues and organs.* **Murphy, S.V., Atala, A.** Nat Biotechnol, pp. 773-785, 2014.
27. *Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting.* **Zhang X, Zhang Y.** Cell BiochemBiophys, vol. 32, ed. 8, pp. 777-782, 2015.
28. *Organ printing: promises and challenges.* **Mironov, V., Kasyanov, V., Drake, C., Markwald, R.R.** Regenerative Medicine 3, 93–103, 2008.
29. *3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues.* **Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., Kim, D.H.** Biotechnology Advances Vol. 34 (4), pp. 422–434, 2016.
30. *Extrusion Based Rapid Prototyping Technique: An Advanced Platform for Tissue Engineering Scaffold Fabrication.* **Hoque M E, Chuan Y L, Pashby I.** Biopolymers 97, pp 83-93, 2011.
31. *3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels.* **Duan, B., Hockaday, L.A, Kang, K.H., Butcher, J.T.** J. Biomed. Mater.Res. A 101, pp 1255–1264, 2013.
32. *Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting.* **Norotte, C., Marga, F.S., Niklason, L.E., Forgacs, G.** Biomaterials 30, pp5910–5917, 2009.
33. *Direct cell writing of 3D microorgan for in vitro pharmacokinetic model.* **Chang, R., Nam, J., Sun, W.** Tissue Eng. Part C Methods 14, 157–166, 2008.

34. *A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform.* **Xu, F., Celli, J., Rizvi, I., Moon, S., Hasan, T., Demirci, U.** *Biotechnol. J.* 6, pp204–212, 2011.
35. *Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting.* **Skardal, A., Atala, A.** *Ann Biomed Eng*, vol. 43, ed. 3, pp. 730-746, 2015.
36. *Science in three dimensions: the print revolution.* **Jones, N.** *Nature*, vol. 487, ed. 7405, pp. 22-30, 2012.
37. *Shear-thinning hydrogels for biomedical applications.* **Guvendiren, M., Lu, H.D., Burdick, J.A.** *Soft Matter*, 8, pp 260–272, 2012.
38. *Development of a hybrid scaffold with synthetic biomaterials and hydrogel using solid freeform fabrication technology.* **Shim, J.H., Kim, J.Y., Park, M., Park, J., Cho, D.W.** *Biofabrication*, vol. 3, ed. 3, 2011.
39. **Fratzl, P.** *Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. Collagen structure and Mechanics.* Springer, USA, 2008.
40. **van Blitterswijk, C.A., de Boer, J.** *Extracellular Matrix as a bioscaffold for Tissue Engineering. Tissue Engineering.* Elsevier Inc, 2015.
41. *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering.* **Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., Berthod, F.** *Materials*, vol. 3, ed. 3, pp. 1863-1887, 2010.
42. *Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function.* **Badylak, S.F., Freytes, D.O., Gilbert, T.W.** *Acta Biomater*, vol. 5, ed. 1, pp. 1-13, 2015.
43. **Fratzl, P.** *Collagen Fibrillar Structure and Hierarchies. Collagen Structure and Mechanics.* Springer, USA, 2008.
44. *Collagen Structure and Stability.* **Shoulders, M.D., Raines, R.T.** *Annu Rev Biochem*, vol. 78, pp. 929- 958, 2009.
45. *Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales.* **Walters, B. D., Stegemann, J.P.** *Biomater*, vol. 10, ed. 4, pp. 1488-1501, 2013.
46. *Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives.* **Dong, C., Yonggang, L.** *Polymers*, vol. 8, ed. 2, pp. 42, 2016.
47. *Collagen: Animal Sources and Biomedical Application.* **K. S. Silvipriya, K. Krishna Kumar, A. R. Bhat, B. Dinesh Kumar, Anish John, Panayappanlakshmanan.** *App Pharm Sci*, vol. 5, ed. 3, pp. 123- 127, 2015.
48. *Biomedical applications of collagen.* **Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y.** *International Journal of Pharmaceutics* vol. 221, ed. 1-2, pp. 1-22 , 2001.
49. *Nanofabrication and Microfabrication of Functional Materials for Tissue Engineering.* **Park, H., Cannizaro, C., Vunjak-Novakovich, G., Langer, R., Vacanti, C., Farokhzad, O.C.** *Tissue Eng*, vol. 13, ed. 8, pp. 1867-1877, 2007.

50. *Additive manufacturing of collagen scaffolds by three-dimensional plotting of highly viscous dispersions.* **Lode, A., Meyer, M., Brüggemeier, S., Paul, B., Baltze, H., Schröpfer, M., Winkelmann, C., Sonntag, F., Gelinsky, M.** *Biofabrication*, vol. 8, ed. 1, 2016.
51. *Novel collagen scaffold with predefined internal morphology made by solid free form fabrication.* **Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka J T.** *Biomaterials*, vol. 24, ed. 8, pp. 1487-1497, 2003.
52. *Comparison of drying methods in the fabrication of collagen scaffold via indirect rapid prototyping.* **Yeong, W.Y., Chua, C.K., Leong, K.F., Chandrasekaran, M., Lee, M.W.** *J of Biom Mat Res*, vol. 8, ed. 1, pp. 260-266, 2007.
53. *Surface modification of polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering for cartilage tissue engineering.* **Chen, C.H., Lee, M.Y., Shyu, V.B.H., Chen, Y.C., Chen, C.T., Chen, J.P.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 40, 2014.
54. *Printing Collagen 3D Structures.* **Díaz Nocera, A., Salvatierra, N.A., Cid, M. P.** *IFMBE Proceedings* 49, pp. 136-139; 2015.
55. *Physical and Mechanical Properties of Cross-linked Type I Collagen Scaffolds Derived from Bovine, Porcine, and Ovine Tendons.* **Ghodbane S. A, Dunn M. G.** *J Biom Mat Res*, vol. 104, ed. 11, pp. 2685- 2692, 2016.
56. *Modification of Lowry's method for concentration measurement.* **Komsa-Penkova, R., Spirova, R., Bechev, B.** *J Biochem Biophys Methods*, vol. 32, ed. 1, pp. 33-43, 1996.
57. *Protein measurement with the folin phenol reagent.* **Lowry, O.H., Rosborough, N.J., Farr, A.L., Randall R.J.** *J Biol Chem*, vol. 193, ed. 1, pp. 265-275, 1951.
58. *A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal.* **Kliment, C.R., Englert, J. M., Crum, L. P., Oury, T. D.** *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 4, ed. 4, pp. 349- 355, 2011.
59. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* **Laemmli, U.K.** *Nature*, vol. 227, ed. 5259, pp. 680-685, 1970.
60. *Biodegradability and cell-mediated contraction of porous collagen scaffolds: The effect of lysine as a novel crosslinking bridge.* **Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J.** *J Biomed Mater Res A*, vol. 71, ed. 2, pp. 334-342, Nov 2004
61. *ISO 10993-5:2009. Tests for Cytotoxicity- In Vitro Methods. 2009. 34 p.*
62. *ISO 10993- 12: 2012. Biological Evaluation of medical devices- Sample preparation and reference materials. 2012. 28p.*
63. *An Improved Method for the Preparation of Type I Collagen From Skin.* **Pacak, C.A., MacKay, A .A., Cowan, D. B.** *J Vis Exp*, ed. 83, 2014.
64. *Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization.* **Martínez-Ortiz, M.A., Hernández-Fuentes, A.D., Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Vargas-Torres, A., Aguirre-Álvarez, G.** *J Food*, vol. 13, ed. 2, pp. 253- 258, 2015.
65. *Aspects of collagen isolation procedure.* **Mocan, E., Tagadiuc, O., Nacu, V.** *Vols. Clin. Res. Studies*, vol. 2, ed. 320, pp. 3-5, 2011.

66. *Ultraprapid Purification of Collagen Type I for Tissue Engineering Applications.* **Pacak, C.A., Powers, J.M., Cowan, D.B.** Tissue EngPart C Methods, vol. 17, ed. 9, pp. 849-885, 2011.
67. *Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications.* **Rizk, M., Mostafa, N.Y.** OrJ Chem, vol. 32, ed.3, pp. 32-35 , 2016.
68. *Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species.* **Lin, Y. K., Liu, D.C.** Food Chem, vol. 99, ed. 2, pp. 244-251, 2006.
69. *Caracterización Parcial del Colágeno Extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante. .* **Torres-Arreola W, Pacheco- Aguilar R, Sotelo-Mundo R R, Rouzaud-Sández O, Ezquerra- Brauer J M.** Cien Tecn Alim, vol. 6, ed. 2, pp. 101-108, 2008.
70. *Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino.* **Gómez- Lizarraga K, Piña- Barba C., Rodríguez- Fuentes N.** Superficies y vacío, vol. 24 ,ed.4, pp. 137-140, 2011.
71. *Cell effects on the formation of collagen triple helix fibers inside collagen gels or on cell surfaces.* **Liu, C., Mtsusaki, M., Akashi, M.** Polymer Journal 2015, 47, pp. 391-399.
72. *Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering.* **Saska, S., Novaes Teixeira, L., Tambasco de Oliveira, P., Minarelli Gaspar, A.M., Lima Ribeiro, S.J., Messaddeqa, Y., Marchetto, R. J.** Mater. Chem., 22, pp 22102-22112, 2012.
73. *Electrospun Nanostructured Fibers of Collagen- Biomimetic Apatite on Titanium Alloy.* **Iafisco, M., Foltran, I., Sabbatini, S., Tosi, G., Rover, N.** Bioinorganic Chemistry and Applications, ed. 11, 8p, 2012.
74. *Elastic modulus, permeation time and swelling ratio of a new porcine dermal collagen membrane.* **Lu, H.K., Lee, S. Y., Lin, F. P.** J Periodontal Res 33(5): 243-8; 1998.
75. *The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin–collagen intestine tissue engineering scaffolds.* **Shabafrooz, V., Mozafari, M., Kohler, G.A., Assefa, S., Vashae, D., Tayebi, L.** J Biomed Mater Res Part A: 00A, 2013.
76. *Hybrid Scaffolds Composed of Hyaluronic Acid and Collagen for Cartilage Regeneration.* **Kim, H.J., Kim, K.K., Park, I.K., Choi, B.S., Kim, J.H., Kim, M.S.** Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol. 9, No. 2, pp 57-62; 2012.
77. *Emerging rules for inducing organ regeneration.* **Yannas, J.V.** Biomaterials 34:321-30, 2013.
78. *Comparison of various types of collagenous scaffolds applied for embryonic nerve cell culture.* **Drobnik, J., Pietrucha, K., Kudzin, M., Mader, K., Szymánski, J., Szczepanowska, A.** Biologicals 46, pp 74-80, 2017.