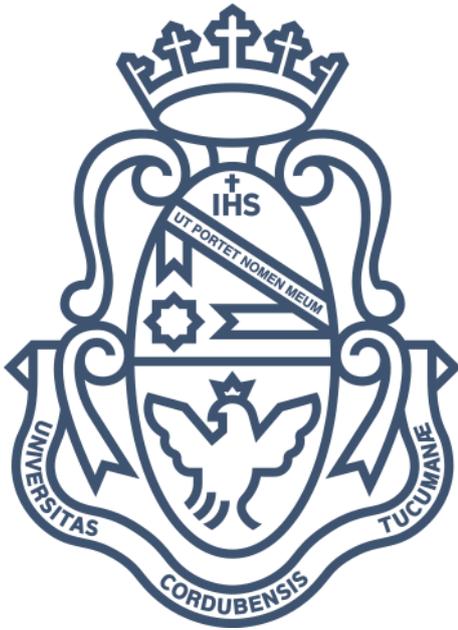


Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Ingeniería Biomédica

Proyecto Integrador

**Caracterización física y
biológica de andamios
impresos 3D de
colágeno obtenidos a
partir de piel porcina
para uso biomédico**



Alumnos:

Barezzi, Franco Gastón

Matrícula: 38.296.112

Gonzalvez, Ana Belén

Matrícula: 38.731.119

Director:

Dra. Cid, Mariana Paula

Co-Asesores:

Dra. Comín, Romina

Dra. Rivarola, María Angélica



Córdoba, Noviembre de 2018

Agradecimientos

En primer lugar, queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a la directora y co-asesoras de este proyecto integrador, Dra. Cid, Mariana Paula; Dra. Comín, Romina; y Dra. Rivarola, María Angélica, por la dedicación y apoyo que nos han brindado en el transcurso de este trabajo, por el respeto a nuestras sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que han facilitado a las mismas. Gracias por la total confianza depositada desde que llegamos al laboratorio.

Asimismo, agradecemos al Dr. Fretes, Ricardo por su predisposición y sugerencias, y el contacto con la Dra. Piegari, Mariana, a quien agradecemos enormemente su orientación, contribución y atención a nuestras consultas, por el material facilitado y las sugerencias recibidas. Gracias por su valiosa amabilidad y tiempo de trabajo.

A nuestros padres, María del Carmen, Patricia, Ricardo y José, por su apoyo y amor incondicional, por los valores inculcados, y habernos permitido obtener una excelente educación en el transcurso de nuestras vidas. Sobre todo, por enseñarnos el valor del trabajo y la perseverancia.

A nuestras familias, quienes nos brindaron seguridad y nos alentaron a seguir en cada paso de nuestra carrera.

A nuestros amigos, por creer y confiar en nosotros, y haber hecho de nuestra etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaremos.

A todos, muchísimas gracias por compartir estos momentos con nosotros.

Ana y Franco

Resumen

La Ingeniería de Tejidos es una disciplina de la biomedicina que, combinando células, materiales y herramientas de la ingeniería, intenta diseñar estructuras biológicas funcionales para sustituir, reparar o regenerar tejidos dañados. Su aplicación genera nuevas alternativas de tratamiento para pacientes con diferentes tipos de patologías, lesiones tisulares u orgánicas.

La ingeniería tisular emplea andamios con una estructura tridimensional, que brindan soporte físico para la creación de un ambiente apto para el desarrollo de funciones celulares como crecimiento, nutrición, migración, proliferación y apoptosis, favoreciendo así la neovascularización y la formación de nuevos tejidos. Estas matrices sostienen a las células vivas necesarias para dar origen a un tejido funcional. Las sustancias utilizadas frecuentemente para la construcción de andamios incluyen materiales poliméricos naturales, tales como el colágeno, debido a su adecuada biocompatibilidad.

Existen distintas formas de fabricación de andamios, pero en los últimos años, la impresión 3D ha surgido como alternativa para su obtención, debido a las ventajas que le otorga a nivel microestructural y mecánico. Cabe destacar que es de vital importancia evaluar la seguridad y la eficacia de los mismos para asegurar su biocompatibilidad y la posibilidad de exportar su utilización en un modelo humano.

En este proyecto integrador se diseñaron e imprimieron por extrusión andamios de colágeno obtenidos de piel porcina, respetando parámetros establecidos por norma ISO 10993, para evaluar su comportamiento físico y biológico mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Los andamios resultantes de la impresión 3D demostraron capacidad para mantener su estructura, morfología, como así también el diámetro de hebras y canales, que fueron de $687,93 \pm 67,44 \mu\text{m}$ y $668,86 \pm 56,76 \mu\text{m}$ respectivamente, en los diferentes procesos y medios fisiológicos. A través de un análisis con microscopía óptica confocal y microscopía electrónica de barrido, se observaron diversas poblaciones de microporos con tamaños entre $7,68$ y $57,55 \mu\text{m}$ y un diámetro mínimo de fibra de $74,11 \text{ nm}$, adecuados para infiltración y proliferación celular como así también para neovascularización.

El porcentaje de solubilización en medio de cultivo a 37°C resultó de $41,55 \pm 3,35\%$, lo cual podría haber generado la reducción significativa en altura de los andamios sometidos a este ensayo. También, se analizó la porosidad e hinchamiento de los mismos, mostrando valores de $91,53 \pm 0,41\%$ y $1102,79 \pm 20,96\%$, respectivamente.

Mediante ensayos de hemocompatibilidad, no se observaron cambios morfológicos significativos de glóbulos blancos en contacto directo con el

material y el porcentaje de hemolisis fue del 0% de glóbulos rojos en contacto indirecto con los andamios.

Los extractos de los andamios impresos no fueron citotóxicos para células Vero, lo cual permitió llevar a cabo el ensayo de adhesión celular *in vitro* e implantación *in vivo*. Mediante tinción con DAPI y microscopía de fluorescencia se observó adherencia e infiltración de células Vero. El ensayo de implantación en tejido subcutáneo de rata no demostró rechazo ni signos clínicos de inflamación. Mediante microscopía óptica se evidenció infiltrado mononuclear y fibroblástico, como así también, angiogénesis y neoformación de vasos en las regiones de implantación de andamios. A los 60 días post implantación, no pudo ser reconocida la estructura del andamio tanto macroscópica como microscópicamente. Esto puede deberse a una reorganización y/o reabsorción del andamio mientras el mismo es invadido por fibroblastos y células.

Estos resultados demostraron que los andamios de colágeno de origen porcino impresos 3D permitieron la invasión celular y de vasos sanguíneos cumpliendo así condiciones necesarias de biocompatibilidad y biodegradación, siendo útiles para aplicaciones médicas en ingeniería de tejidos.

Palabras Claves: Ingeniería de Tejidos; Andamios de colágeno; Impresión 3D; Implantación *in vivo*; Biocompatibilidad.

Abstract

Tissue Engineering is a biomedical discipline, which designs functional biological structures to replace, repair or regenerate damaged tissues, combining cells, materials and engineering tools. Its application generates new treatment alternatives for patients with different types of pathologies, tissue or organic lesions.

Tissue engineering uses scaffolds with a three-dimensional structure, which provide physical support for the creation of an adequate environment for the development of cellular functions such as growth, nutrition, migration, proliferation and apoptosis, in consequence that produce neovascularization and formation of new tissues. These matrix structures hold the living cells necessary to give rise to a functional tissue. The substances used for the construction of scaffolds include natural polymeric materials, such as collagen, due to their adequate biocompatibility.

There are different ways of manufacturing scaffolds, but nowadays, 3D printing has emerged as an alternative to obtain those, due to the advantages it provides at the microstructural and mechanical level. It is important to stand out that is necessary evaluate the safety and efficacy of these structures to ensure their biocompatibility and the possibility of exporting their use in a human model.

In this work, the collagen scaffolds obtained from porcine skin, were designed and printed by extrusion technology, respecting the parameters established by ISO 10993 standard, to evaluate their physical and biological behaviour through *in vitro* and *in vivo* tests.

Scaffolds resulting from 3D printing demonstrated the ability to maintain its structure, morphology and the diameter of the strands and pores, which were $687.93 \pm 67.44 \mu\text{m}$ and $668.86 \pm 56.76 \mu\text{m}$ respectively, in different processes and physiological means. Throughout the analysis with optical confocal microscopy and scanning electron microscopy, it was observed several populations of micropores with sizes between 7.68 and 57.55 μm and a minimum fiber diameter of 74.11 nm, which are suitable for cell infiltration and proliferation, as well as for neovascularization.

The percentage of solubilization in culture medium at 37°C was $41.55 \pm 3.35\%$, which could have generated a significant reduction in the height of the scaffolds presented to this essay. In addition, the porosity and swelling of the scaffolds analyzed, showing values of $91.53 \pm 0.41\%$ and $1102.79 \pm 20.96\%$, respectively.

The hemocompatibility test did not show significant morphological changes in the white blood cells in direct contact with the material and the percentage of hemolysis was 0%.

The extracts of the 3D-printed collagen-based scaffolds were not cytotoxic for Vero cells, which allowed the cell attachment *in vitro* assay and implantation *in vivo*. With the staining with DAPI and the fluorescence microscopy, it was observed adherence and infiltration with the Vero cell line. The implantation trial in rat subcutaneous tissue showed no rejection or clinical signs of inflammation. The observation with optical microscopy allowed observing cellular infiltration and angiogenesis. Then, after 60 days of implantation, the structure of the scaffold could not be recognized either macroscopically or microscopically. This may be due to a reorganization of the scaffold while it is invaded by fibroblasts and mononuclear cells.

These results demonstrated that 3D-printed collagen-based scaffolds allowed cell and vessel invasion complying with necessary conditions of biocompatibility and biodegradation, making them useful for medical applications of tissue regeneration.

Key words: Tissue Engineering; Collagen-based scaffolds; 3-D Printing; Implantation *in vivo*; Biocompatibility.

Contenido

Agradecimientos	1
Resumen	2
Abstract	4
Índice de Figuras	10
Índice de Tablas	12
Índice de Fórmulas	14
1. Introducción	15
1.1 Ingeniería de tejidos	15
1.1.1 Aplicaciones de la IT	16
1.2 Matriz Extracelular	17
1.3 Andamios	18
1.3.1 Categorización de los andamios	19
1.3.2 Requerimientos en la fabricación andamios	19
1.3.2.1 Biocompatibilidad	19
1.3.2.2 Biodegradabilidad	19
1.3.2.3 Propiedades Mecánicas	20
1.3.2.4 Arquitectura del andamio	20
1.3.2.5 Tecnología de fabricación	20
1.3.2.6 Biomateriales	21
1.4 Colágeno	22
1.4.1 Estructura química del colágeno	22
1.4.2 Características biológicas del colágeno	24
1.4.3 Funciones del colágeno	25
1.5 Impresión 3D	26
1.5.1 Bioimpresión basada en extrusión	27
1.6 Biomateriales basados en colágeno: aplicaciones clínicas y usos en IT	28
1.6.1 Andamios de colágeno fabricados con tecnología 3D: una alternativa para optimizar microestructura y reproducibilidad	29
2. Objetivos	33
2.1 Objetivos Generales	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. Materiales y Métodos	34

3.1 Extracción y purificación de colágeno	34
3.2 Preparación de tinta para impresión	38
3.3 Impresión de andamios	38
3.4 Parámetros de Impresión	40
3.5 Evaluación del comportamiento estructural de los andamios al ser sometidos a distintos procesos	41
3.5.1 Liofilización de andamios	41
3.5.2 Inmersión e hidratación de andamios en distintos medios fisiológicos	41
3.5.3 Cultivo celular <i>in vitro</i> sobre los andamios	42
3.6 Medición de las dimensiones de los andamios con el diseño para implantación	43
3.7 Evaluación de los andamios mediante Microscopía Óptica Confocal	43
3.8 Observación de los andamios mediante Microscopía Electrónica de Barrido	44
3.9 Análisis de los andamios con cultivo celular a través de Microscopía Óptica mediante tinción DAPI	44
3.10 Ensayo de solubilización en medio de cultivo a 37°C	45
3.11 Ensayo de hinchamiento	46
3.12 Análisis de porosidad	46
3.13 Ensayo de Citotoxicidad	46
3.14 Ensayo de Hemocompatibilidad	48
3.14.1 Evaluación de Morfología de Glóbulos Blancos	49
3.14.2 Evaluación de Hemólisis <i>in vitro</i> por contacto indirecto	50
3.15 Ensayo <i>in vivo</i> : implantación subcutánea de andamios en modelo animal rata Wistar	51
3.15.1 El modelo animal en investigaciones biomédicas	51
3.15.2 Roedores: implicancias de uso	52
3.15.3 Ensayo relativo a los efectos locales después de la implantación	52
3.15.4 Consideraciones Pre-quirúrgicas	54
3.15.5 Cirugía de prueba: Estudio Piloto	54
3.15.6 Procedimiento quirúrgico	55
3.15.7 Cuidados postoperatorios	60
3.15.8 Registros de temperatura corporal, peso y estado general	60
3.15.9 Eutanasia	62

3.15.10 Histología	62
3.15.11 Microscopía Óptica	63
3.16 Presentación de Resultados y Análisis Estadístico	63
4. Resultados y Discusión	64
4.1 Obtención de tinta e impresión 3D de andamios basados en colágeno de piel porcina	64
4.2 Comportamiento estructural de los andamios al ser sometidos a distintos procesos	64
4.3 Dimensiones de los andamios con el diseño para implantación	66
4.4 Evaluación de los andamios mediante Microscopía Confocal	69
4.5 Observación de los andamios mediante Microscopía Electrónica de Barrido	71
4.6 Ensayo de solubilización en medio de cultivo a 37°C	73
4.7 Análisis del hinchamiento	74
4.8 Ensayo de porosidad	74
4.9 Ensayo de Citotoxicidad	75
4.10 Ensayo de Hemocompatibilidad	76
4.10.1 Evaluación de la Morfología de Glóbulos Blancos	76
4.10.2 Evaluación de Hemólisis <i>in vitro</i> por contacto indirecto	78
4.11 Andamios de colágeno como soportes para la adhesión y crecimiento de células Vero	78
4.12 Ensayo <i>in vivo</i> : implantación subcutánea de andamios en modelo animal rata Wistar	80
4.12.1 Registros de temperatura corporal, peso y estado general de los animales ensayados	80
4.12.2 Cirugía de prueba	82
4.12.3 Implantación de andamios de colágeno	85
4.12.4 Microscopía Óptica: evaluación del tejido circundante al andamio implantado	86
5. Conclusiones	90
6. Bibliografía y Referencias	92
7. Anexos	108
7.1 Informe de Impresión 3D	108
7.2 Informe presentado a CICUAL para realización de ensayo de implantación	109

7.3	Tabla de valoración del dolor desarrollada por NC3Rs	115
7.4	Dimensiones de andamios no liofilizados	116
7.5	Dimensiones de andamios liofilizados	119
7.6	Dimensiones de andamios inmersos en medio de cultivo	121
7.7	Dimensiones de los andamios hidratados con PBS	122
7.8	Dimensiones de los andamios sometidos a cultivo celular	123
7.9	Registros de temperatura corporal, peso y estado general	124

Índice de Figuras

Figura 1. Triada de la Ingeniería en Tejidos.	16
Figura 2. Principales componentes de la matriz extracelular.	18
Figura 3. Fibrilla de colágeno de tipo I.	23
Figura 4. Tropocolágeno en la fibrilla de colágeno.	24
Figura 5. Técnicas de bioimpresión: inyección de tinta, láser y extrusión.	27
Figura 6. Tres tecnologías principales de bioimpresión.	27
Figura 7. Procedimiento de purificación y obtención del colágeno.	36
Figura 8. Aplicación del protocolo de obtención de colágeno.	37
Figura 9. Proceso de extracción y purificación de colágeno.	37
Figura 10. Obtención de tinta para impresión 3D.	38
Figura 11. Diseño de andamio basado en norma ISO 10993.	40
Figura 12. Toma de dimensiones de los andamios.	43
Figura 13. Estructura química del marcador DAPI.	44
Figura 14. Pesado de los andamios.	45
Figura 15. Representación química del MTT.	47
Figura 16. Reducción del MTT a Formazán.	47
Figura 17. Procedimiento quirúrgico en cirugía piloto.	55
Figura 18. Implantación de andamio ó esponja en ratas Wistar.	56
Figura 19. Esquema de implantación de andamios en rata.	57
Figura 20. Intervención del animal en el ensayo de implantación.	58
Figura 21. Regiones de implantación de los andamios.	59
Figura 22. Metodos de implantación de andamios de colágeno.	59
Figura 23. Registro de temperatura y peso de los animales.	60
Figura 24. Tinta resultante y andamios impresos.	64

Figura 25. Andamios sometidos a diferentes tratamientos.	65
Figura 26. Ancho de los andamios sometidos a diferentes procesos.	66
Figura 27. Largo de los andamios en las diferentes etapas de procesado.	67
Figura 28. Alto de los andamios en las diferentes etapas de procesado.	67
Figura 29. Diámetro de las hebras de los andamios.	68
Figura 30. Diámetro de los poros de los andamios.	68
Figura 31. Imágenes obtenidas con microscopía óptica confocal.	70
Figura 32. Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido.	72
Figura 33. Viabilidad de células Vero en ensayo de Citotoxicidad.	75
Figura 34. Microscopía óptica de frotis sanguíneos.	77
Figura 35. Microscopía de fluorescencia de andamios teñidos con DAPI.	79
Figura 36. Pesos de las ratas n°1 y 2 (experimentales) y 6 (control 1)	80
Figura 37. Pesos de las ratas n°4 y 5 (experimentales) y 7 (control 2).	80
Figura 38. Temperatura corporal de las ratas n°1, 2 y 6.	81
Figura 39. Temperatura corporal de las ratas n°4, 5 y 7.	82
Figura 40. Resultados de cirugía de prueba.	83
Figura 41. Resultados macroscópicos de los andamios ensayados.	85
Figura 42. Preparados histológicos del ensayo de implantación.	87

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de andamios para IT según su estructura.	19
Tabla 2. Propiedades, aplicaciones y características del colágeno.	25
Tabla 3. Índice y grado hemolítico según norma ISO 10.993-4.	51
Tabla 4. Valoración postquirúrgica de animales ensayados.	61
Tabla 5. Escala de puntuación del comportamiento animal.	61
Tabla 6. Diámetro de las fibras y microporos de los andamios resultantes.	73
Tabla 7. Porcentaje de solubilización de los andamios.	73
Tabla 8. Porcentaje de hinchamiento de los andamios.	74
Tabla 9. Porcentaje de porosidad de los andamios.	74
Tabla 10. Porcentajes de viabilidad celular en ensayo de Citotoxicidad.	75
Tabla 11. Recuento diferencial de glóbulos blancos.	76
Tabla 12. Índice hemolítico de las muestras ensayadas.	78
Tabla 13. Ancho de los andamios impresos.	116
Tabla 14. Largo de los andamios impresos.	117
Tabla 15. Alto de los andamios impresos.	118
Tabla 16. Ancho de los andamios liofilizados.	119
Tabla 17. Largo de los andamios liofilizados.	119
Tabla 18. Alto de los andamios liofilizados.	120
Tabla 19. Ancho de los andamios inmersos en medio de cultivo.	121
Tabla 20. Largo de los andamios inmersos en medio de cultivo.	121
Tabla 21. Alto de los andamios inmersos en medio de cultivo.	121
Tabla 22. Ancho de los andamios hidratados con PBS.	122
Tabla 23. Largo de los andamios hidratados con PBS.	122
Tabla 24. Alto de los andamios hidratados con PBS.	122
Tabla 25. Ancho de los andamios incubados en cultivo celular.	123
Tabla 26. Largo de los andamios incubados en cultivo celular.	123

Tabla 27. Alto de los andamios incubados en cultivo celular.	123
Tabla 28. Temperatura de los animales ensayados.	124

Índice de Fórmulas

Fórmula 1. Paso de la jeringa utilizado en la impresión 3D.	39
Fórmula 2. Cantidad de hebras a imprimir en sentido transversal.	39
Fórmula 3. Cantidad de hebras a imprimir en sentido longitudinal.	39
Fórmula 4. Porcentaje de hinchamiento.	46
Fórmula 5. Porcentaje de porosidad.	46
Fórmula 6. Porcentaje de viabilidad celular.	48
Fórmula 7. Porcentaje de hemólisis.	49
Fórmula 8. Índice y grado hemolítico de la muestra en análisis.	51

1. Introducción

1.1 Ingeniería de tejidos

El término Ingeniería de tejidos (IT) fue definido en 1988, en una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias, por Salak y Fox como: “la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias de la vida, hacia el conocimiento fundamental de las relaciones entre estructura y función en tejidos de mamíferos normales y patológicos; y el desarrollo de los sustitutos biológicos para recuperar, mantener o mejorar la funcionalidad de los tejidos” [1].

Es importante aclarar que para muchos autores dicho concepto es sinónimo de medicina regenerativa, pero para otros este término se refiere al uso de tecnología con células madres. También se considera que la IT solo representa sustitución de tejidos, y no reparación o regeneración [2].

La IT es un campo de investigación multidisciplinario que involucra varias áreas: biología celular y molecular, ciencias de los materiales, biorreactores, bioingeniería, medicina, etc., que apuntan a mejorar o reemplazar funciones biológicas [3]. Este campo utiliza andamios para proveer un ambiente apropiado para la regeneración de tejidos y órganos [4].

Esta disciplina se desarrolló como una alternativa al trasplante de órganos tradicional, debido a la escasez de estos o al rechazo inmunológico por parte de los pacientes [5]. El objetivo central de esta práctica es colocar sobre andamios, células vivas cultivadas en un laboratorio, para su posterior implantación; de esta manera le permite al cirujano manipular el medioambiente local del tejido, proporcionar una alternativa fisiológica óptima y una recuperación más rápida del paciente [6].

En los últimos años, se han desarrollado múltiples investigaciones que abarcan, entre otros, tejidos como piel, sistema nervioso, sistema osteomuscular, sistema cardiovascular y epitelio corneal. Dentro de estos, los primeros en ser exitosamente reconstruidos con IT fueron la piel y el cartílago [7].

La IT combina tres elementos durante su desarrollo que forman lo que se llama “Tríada de la Ingeniería de Tejidos”, que son:

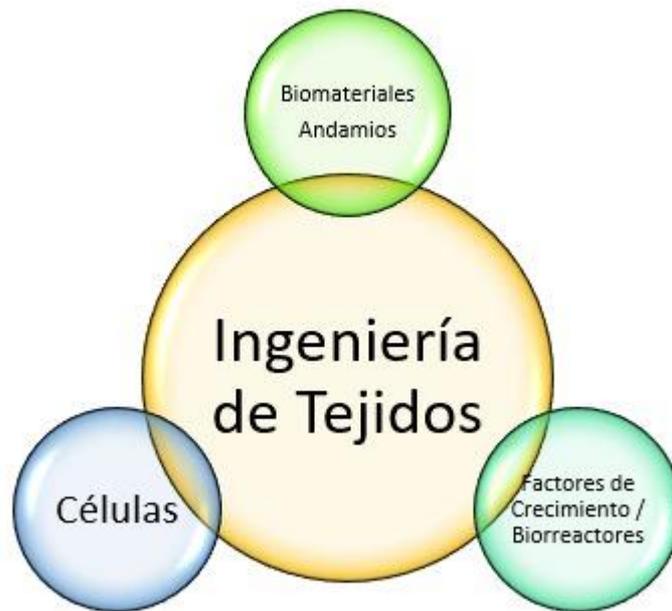


Figura 1. Tríada de los componentes utilizados por la IT.

Como se puede observar en la Figura 1, la tríada está compuesta por células, señales (provistas químicamente por factores de crecimiento o físicamente por un biorreactor) y andamios, que actúan como una plantilla para la formación de tejido permitiendo que las células puedan migrar, adherirse y proliferar [2].

1.1.1 Aplicaciones de la IT

Existen diferentes maneras de trabajar en la IT, de las cuales podemos mencionar las siguientes:

- a) Implantando células, que fueron previamente aisladas o cultivadas, y pueden manipularse de acuerdo a las necesidades específicas del paciente.
- b) Estimulando in situ la regeneración tisular implantando andamios o inyectando sustancia de tejido inductor sobre el tejido lesionado. Para ello se requiere la purificación de las moléculas que inducen el tejido y/o de métodos de entrega apropiados.
- c) Incorporando células y biomoléculas en andamios, luego llevarlos a un biorreactor, para cultivar *in vitro* (en el interior del andamio), logrando un diseño con cierto grado de función antes de su implantación en el cuerpo [3].

Teniendo en cuenta lo explicado anteriormente, se puede clasificar a las aplicaciones de la IT en dos grandes campos:

- ✓ **Aplicaciones terapéuticas:** donde el tejido crece dentro o fuera del paciente y luego se trasplanta.
- ✓ **Aplicaciones diagnósticas:** el tejido se fabrica *in vitro* y se utiliza para evaluar parámetros como toxicidad, patogenicidad, entre otros [8].

Cabe destacar que la necesidad de materiales en IT nació fundamentalmente para el tratamiento de heridas en las cuales hay pérdida de dermis y epidermis [9]. Estos materiales pueden beneficiar a pacientes con quemaduras, úlceras crónicas y aquellos que requieren cirugía reconstructiva [10]. La mayoría de los biomateriales en uso clínico se basan en colágeno natural o extraído.

Los desafíos clínicos se concentran en el uso de biomateriales que combinados con esquemas terapéuticos cumplan con determinados requisitos, como la promoción de la cicatrización, el mantenimiento de una lesión aséptica, la regeneración del tejido epitelial a través del mecanismo de inducción y conducción, el mejoramiento de los métodos de cultivo celular, el aumento de la tasa de neovascularización, el desarrollo de una respuesta segura y que permitan generar andamios que resistan la contracción y la fibrosis [5, 10].

1.2 Matriz Extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional, no celular, presente en todos los tejidos y órganos que estabiliza su estructura física e inicia mecanismos bioquímicos y biomecánicos necesarios para la morfogénesis, diferenciación y homeostasis celular. Se considera un componente extracelular multifuncional fundamental que participa en la morfología, supervivencia, desarrollo, migración y en las relaciones inter e intra celulares de un tejido [11].

La MEC está formada por una sustancia base o amorfa, similar a un gel, compuesto por biomacromoléculas que incluyen moléculas muy diversas, secretadas localmente y ensambladas en una red compleja en íntima asociación con la superficie celular, que resisten las fuerzas de compresión y tensión. El agua contenida en ella permite el intercambio rápido de nutrientes y productos de desecho transportados por el líquido extracelular a medida que se filtra a través de la sustancia base [12].

Esta estructura orgánica está compuesta principalmente por 3 clases de moléculas:

1. **Proteínas estructurales:** como el colágeno y la elastina.
2. **Proteínas especializadas:** entre ellas se destacan fibrina, fibronectina, laminina, entre otras.

- 3. Proteoglicanos:** están compuestos de una proteína central a la cual se unen cadenas largas de unidades de disacáridos repetitivos llamados glicosaminoglicanos (GAGs), formando así compuestos complejos de alto peso molecular [13].

La siguiente figura muestra de manera esquemática la composición estructural de la matriz extracelular, de acuerdo a los elementos mencionados anteriormente:

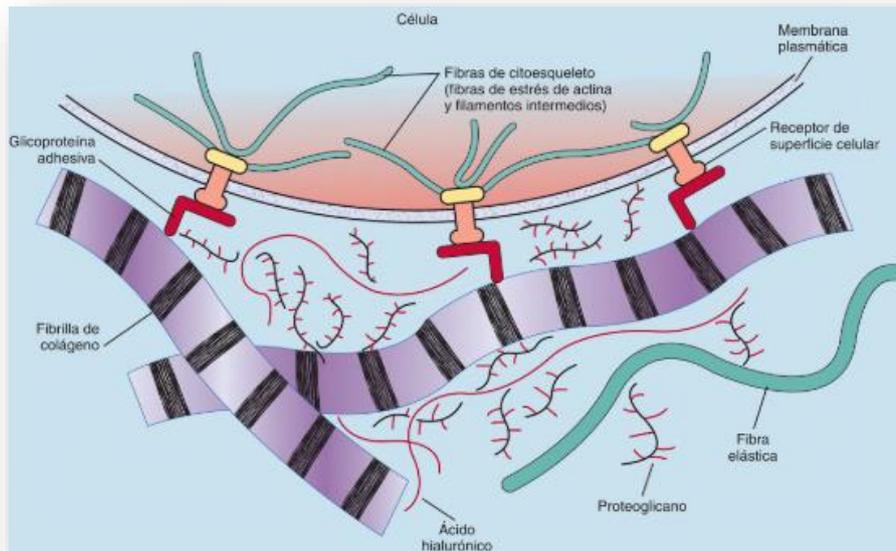


Figura 2. Principales componentes de la matriz extracelular. Las fibras de colágeno y las fibras elásticas son requeridas para resistencia a la tracción y elasticidad, respectivamente. La sustancia base amorfa está formada por proteoglicanos, glicoproteínas adhesivas, y el polisacárido ácido hialurónico. La matriz extracelular está unida al citoesqueleto a través de proteínas de la membrana plasmática [14].

1.3 Andamios

Como se mencionó anteriormente, un andamio es una estructura que provee soporte a células o moléculas y promueve la formación de tejidos.

El objetivo principal del uso de andamios es proporcionar una plantilla temporal, la cual se degrada por completo cuando las células se diferencian en un tejido similar al huésped. Estas estructuras deben tener una arquitectura y resistencia adecuadas para cumplir con sus funciones principales, que son [15]:

- Brindar un sustrato de adhesión para las células que facilite la función, proliferación o diferenciación celular y, a su vez, permitir la infiltración de vasos.
- Proveer soporte mecánico temporal para el crecimiento de tejido nuevo con una orientación de estructura 3D.

- Guiar el desarrollo de tejidos nuevos con una función determinada [16].

1.3.1 Categorización de los andamios

Los andamios para IT se pueden clasificar en tres categorías:

Fibrosos	Porosos	Hidrogeles
La estructura y diámetro de la fibra puede afectar el comportamiento celular, y el tamaño del poro de la matriz regula la organización celular. Pero estos son de difícil control y caracterización [17].	Son muy efectivos en el crecimiento celular para la creación de tejidos funcionales y proveen un área de superficie grande para la adhesión celular.	Estos son geles hechos de cadenas de polímeros que se hinchan en soluciones acuosas, pueden ser naturales o sintéticos, y se fabrican mediante la formación de una red de polímero unido covalentemente [18].
Pueden imitar fácilmente la MEC, ya que esta consiste en proteínas fibrosas en nanoescala [19].	La porosidad e interconectividad de los poros es importante para la infiltración de células huésped y la neovascularización [20].	Son mecánicamente estables, fáciles de deformar y contienen un componente sólido, coloidalmente dispersado con cadenas largas y ramificadas; y un componente líquido dispersante [21]. Funcionan solo como soporte celular, se suelen modificar químicamente para permitir la adhesión de células a su estructura.

Tabla 1. Clasificación de andamios para IT según su estructura: fibrosos, porosos e hidrogeles.

1.3.2 Requerimientos en la fabricación andamios

1.3.2.1 Biocompatibilidad

El primer criterio que debe cumplir un andamio es ser biocompatible, debe ser capaz de permitir la adhesión celular, el funcionamiento normal, la migración de células sobre la superficie y, eventualmente, a través del andamio para comenzar a producir la nueva MEC antes de que se degrade el mismo [4].

1.3.2.2 Biodegradabilidad

El objetivo de la IT en la fabricación de andamios biodegradables, es permitir que las células del cuerpo puedan reemplazar el andamio implantado. Es por ello que debe asegurarse que las células produzcan su propia MEC [22].

Los subproductos de la degradación no deben ser tóxicos y tienen que poder eliminarse del cuerpo sin ocasionar problemas sobre otros órganos. Esto se logra combinando una respuesta inflamatoria con una infusión controlada de células, como por ejemplo de macrófagos. El campo de la inmunología tiene un papel importante en esta área [23, 24].

1.3.2.3 Propiedades Mecánicas

El andamio debe tener propiedades mecánicas consistentes con el sitio anatómico donde será implantado, y desde una perspectiva práctica, debe ser lo suficientemente fuerte para permitirle al cirujano su manipulación durante la implantación. Si bien varía de un tejido a otro, y al usar un biomaterial u otro, se busca un balance entre las propiedades mecánicas y la porosidad para permitir infiltración celular y vascularización, los cuales son claves para el éxito de cualquier andamio [4].

1.3.2.4 Arquitectura del andamio

Los andamios deben tener una estructura interconectada y gran porosidad para asegurar la penetración celular y una adecuada difusión de nutrientes hacia las células que conforman a los mismos y a la MEC. Además, esa estructura debe permitir evacuar los productos de desechos fuera de la misma y los productos de degradación de manera que puedan ser eliminados del cuerpo sin interferir con otros órganos y tejidos [25, 26].

Uno de los problemas importantes es la degradación del centro de los andamios debido a su falta de vascularización; también es importante el tamaño de los poros, ya que estos deben ser lo suficientemente grandes para permitir que las células migren dentro de la estructura pero, a su vez, ser lo suficientemente pequeños para establecer una superficie grande (con densidad de ligando mínima) para permitir la unión eficaz de un número crítico de células al andamio [27, 28]. De acuerdo a investigaciones recientes, se ha demostrado que un tamaño de poro mínimo de 250 μm aproximadamente, favorece el crecimiento de vasos sanguíneos en comparación con poros más pequeños [29]. Además, una gran porosidad no conduce a una mayor vascularización, debido a que la migración y filtración celular podría verse inhibida si existe poca interconectividad entre dichos poros [30].

1.3.2.5 Tecnología de fabricación

Para que un andamio en particular sea clínicamente y comercialmente viable, debe tener un costo efectivo y debe ser posible su fabricación en pequeños lotes de producción en el laboratorio [31]. Un factor importante es poder determinar cómo el producto va a ser entregado y cómo va a estar disponible para los profesionales de la salud.

Los andamios pueden estar producidos de diferentes maneras y de distintos materiales, de acuerdo a los requerimientos de diseño, y para ello se utilizan técnicas convencionales o métodos con procesamientos avanzados [15]. Algunas de las formas de fabricación se basan en la evaporación de solventes, lixiviación de partículas, inversión de fase, autoensamblado molecular, tecnología de fabricación textil, espumado por gas, separación de fases, emulsificación y liofilización, prototipado rápido (con impresión 3D), electrohilado, entre otros [21].

1.3.2.6 Biomateriales

Un biomaterial es definido como “un material que interactúa con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [18].

En la fabricación de andamios se utilizan diversos biomateriales, que son: cerámicos, polímeros sintéticos, polímeros naturales y metales; todos estos poseen ventajas y desventajas, es así que suelen utilizarse andamios compuestos formados por diferentes fases [4]. Entre las características a destacar de estos materiales se pueden mencionar las siguientes:

- ✓ Cerámicos: se caracterizan por tener una alta rigidez mecánica, muy baja elasticidad, y una superficie dura y quebradiza. Desde el punto de vista óseo, poseen excelente biocompatibilidad debido a su similitud química y estructural con la fase mineral del hueso. Los cerámicos son utilizados para la regeneración ósea, ya que pueden desencadenar la diferenciación y proliferación de los osteoblastos [32, 33]. Estos materiales en la IT están limitados en uso, debido a que a pesar de que poseen una alta resistencia a la compresión, su resistencia a la tensión es baja. Además, poseen altas temperaturas de fusión, baja conductividad eléctrica y térmica [21], y se caracterizan por ser difíciles de implantar dado su diseño [34]. Ejemplos de estos son hidroxiapatita y fosfato tricálcico.
- ✓ Polímeros sintéticos: estos materiales tienen mucho éxito ya que pueden ser fabricados con una arquitectura a medida, y las características de degradación se pueden controlar variando el polímero o su composición [35, 36, 37]. Sus desventajas radican en el riesgo de ser rechazados debido a su reducida bioactividad. Ejemplos de polímeros sintéticos son el poliestireno, ácido poli-l-láctico, ácido poliglicólico, y ácido poliláctico glicólico; la degradación de alguno de estos se realiza por hidrólisis, lo cual produce CO₂ que disminuye el pH local y genera la necrosis del tejido [38].

- ✓ Polímeros naturales: a diferencia de los sintéticos, estos son biológicamente activos y promueven una excelente adhesión celular y un buen crecimiento. Además, son biodegradables, permitiendo que las células del huésped, con el tiempo, produzcan su propia MEC y reemplacen al andamio. Sus limitaciones radican en su difícil producción y en propiedades mecánicas que dificultan su uso. Ejemplos de estos son el colágeno, varios proteoglicanos, sustratos basados en alginato y quitosano [21].
- ✓ Metales: estos son empleados por sus buenas propiedades de conductividad eléctrica y térmica, como así también, por sus propiedades mecánicas. A pesar de sus excelentes características, su principal desventaja es la de no cumplir funciones de estructura soporte para interacción con células producto de su baja degradabilidad en ambientes biológicos [21].
- ✓ Andamios compuestos: como se mencionó antes, la fabricación de andamios formados por una sola fase de material conlleva varios inconvenientes, por lo que muchas veces son reemplazados por andamios compuestos por varias fases, incluyendo cerámicos, polímeros sintéticos y/o naturales, como así también, metales, para aumentar sus capacidades biológicas y combinar ventajas de varios materiales [39, 40].

1.4 Colágeno

El colágeno es uno de los materiales más empleados como componente para la fabricación de andamios en la IT. Posee propiedades como biocompatibilidad y biodegradabilidad, por lo que es bien tolerado por el organismo, favorece la infiltración de células e induce la reparación de tejidos [41]. Es la proteína estructural más abundante que se puede encontrar presente en los mamíferos [42].

El colágeno es un péptido de triple hélice [43]. Forma parte de los principales elementos constructivos de la MEC de los tejidos conectivos tales como la piel, los huesos, el cartílago y el tendón [44]. Su función principal es proporcionar soporte estructural y flexibilidad para el tejido en el que está presente, también atrapa muchos factores necesarios para el mantenimiento y la regeneración tisular. La mayoría de este colágeno se encuentra en forma fibrilar insoluble, comúnmente como estructuras largas, esbeltas, cilíndricas y cónicas [44].

1.4.1 Estructura química del colágeno

La unidad estructural básica de una fibra de colágeno responde a una molécula trimérica con una estructura secundaria tridimensional: el

tropocolágeno, que consiste de tres cadenas polipeptídicas α levóginas con 3 residuos por vuelta aproximadamente [45]. Las cadenas α se entrelazan entre sí, formando una superestructura de triple hélice orientada en la dirección de giro hacia la derecha. De esta manera, constituyen una molécula de colágeno fibrilar. Las moléculas pueden ser homotriméricas, si se presentan tres cadenas α idénticas, o heterotriméricas si estas cadenas difieren, de acuerdo al tipo de colágeno [46].

Las secuencias helicoidales triples presentan una estructura típica compuesta por la repetición periódica Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido, pero en su mayoría son prolina e hidroxiprolina [43]. En el siguiente esquema se puede apreciar lo descrito anteriormente:

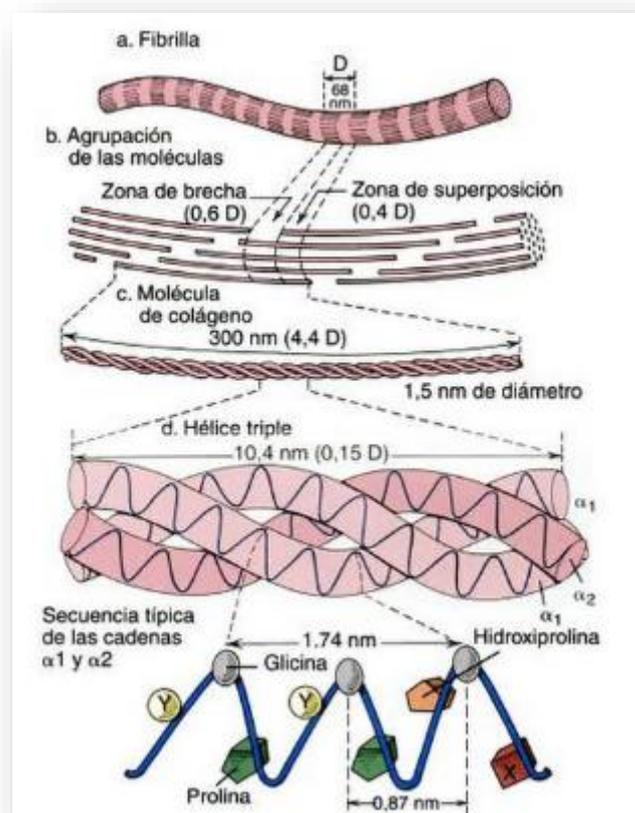


Figura 3. Diagrama que ilustra las características moleculares de una fibrilla de colágeno tipo I en orden de detalle estructural creciente. a) La fibrilla colágena exhibe bandas transversales con una periodicidad (D) de 68 nm (distancia que hay entre las bandas que se repiten). b) Cada fibrilla está compuesta por moléculas de colágeno dispuestas en forma escalonada. c) Cada molécula tiene unos 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro. d) La molécula de colágeno es una hélice triple. e) La hélice triple está compuesta por tres cadenas alfa. Cada tercer aminoácido de la cadena alfa es una glicina. La posición X que sigue a la glicina con frecuencia corresponde a una prolina y la posición Y que precede a la glicina a menudo corresponde a una hidroxiprolina [47].

Actualmente se han clasificado 28 tipos diferentes de colágeno [42]. Todos ellos tienen una triple hélice característica, pero la longitud de la hélice, el tamaño

y la naturaleza de la porción no helicoidal varía de un tipo a otro. Entre estos ejemplares se destacan el colágeno tipo I, II, III, IV, V [48] y el colágeno con una triple hélice discontinua [49].

El colágeno tipo I se encuentra predominantemente en piel, tendón y hueso y es el más utilizado en aplicaciones de la IT [50]. Cabe destacar que las principales fuentes de colágeno reportadas para aplicaciones biomédicas han sido cuero vacuno, intestinos y piel de cerdo, tendón bovino y piel de pescado [51, 52].

Las cadenas que componen a la molécula de este material tienen 300 nm de longitud, 1,5 nm de diámetro y forman 3 subunidades enrolladas, dos cadenas $\alpha_1(I)$ y una cadena $\alpha_2(I)$. El extremo de una molécula se extiende 67 nm más allá de la de su vecino, con espacios de aproximadamente 35 nm entre los extremos de moléculas sucesivas como puede observarse en la Figura 4. Cada cadena consiste de 1050 aminoácidos característicamente enrollados entre sí en una hélice triple con rotación hacia la derecha [53, 42].

Las ventajas que otorga el colágeno como material para la fabricación de matrices se basa principalmente en su compleja estructura jerárquica. De esta manera, es posible su adaptación a cada nivel, otorgándole una variedad de propiedades de acuerdo a su función correspondiente. Muchas de estas propiedades se derivan de la organización estructural dentro de una fibrilla, donde la organización axial y lateral, como así también, la topología de las moléculas de colágeno asegura fuertes interacciones intermoleculares y enlaces cruzados [54]. Además, es una proteína que ofrece gran adhesión celular y contiene múltiples secuencias de péptidos que son organizadas por integrinas receptoras sobre la superficie celular [50].

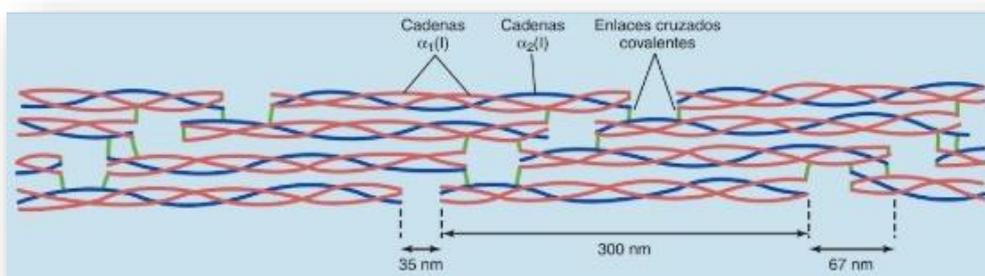


Figura 4. Típico conjunto escalonado de moléculas de tropocolágeno en la fibrilla de colágeno. Los telopéptidos participan en el enlace cruzado covalente [14].

1.4.2 Características biológicas del colágeno

El colágeno es conocido por presentar características biológicas relacionadas a su baja inmunogenicidad comparada con otras proteínas [55]. Se

ha supuesto que la antigenicidad del colágeno es inexistente a causa de la similitud en la secuencia de aminoácidos entre especies [39].

Esta proteína ha sido investigada ampliamente, gracias a sus buenas propiedades biológicas, como adhesión y diferenciación celular, además de su biocompatibilidad. Tiene una estructura relativamente estable debido a la formación de enlaces covalentes cruzados entre sus fibrillas. Sin embargo, presenta las desventajas típicas de los polímeros naturales, tales como la variación entre lotes, así como la restricción para el diseño de dispositivos o elementos con propiedades mecánicas específicas. La naturaleza proteica del colágeno determina su biodegradabilidad [21, 49].

1.4.3 Funciones del colágeno

Su función principal es brindarle al organismo el almacén o matriz de sustento en la que toman forma los órganos y tejidos, siendo además responsable por la firmeza, elasticidad e integridad de las estructuras [44]. Conjuntamente, proporciona protección a la piel al inhibir la absorción de toxinas y agentes patógenos. Además, tiene un papel fundamental en las funciones biológicas de una célula (supervivencia celular, proliferación y diferenciación), ayuda a la reparación de huesos o vasos sanguíneos dañados y mantiene la integridad estructural [49].

En la siguiente tabla se detallan características del colágeno como biomaterial para distintas aplicaciones:

Propiedades	Aplicaciones	Otras características
Mediante la promoción de la reticulación y la autosegregación en su estructura molecular se pueden mejorar las propiedades mecánicas, aumentar la velocidad de degradación, así como otras propiedades como alta afinidad con el agua, baja citotoxicidad, baja antigenicidad, excelentes propiedades biológicas y fisicoquímicas.	Material de soporte "ideal" para estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Producción de andamios con bajo potencial antigénico para las aplicaciones de la piel, los huesos y los tendones, empleando procesos de esterilización para inactivar virus y priones. A partir de andamios electrohilados, se crean apósitos para heridas temporales o permanentes, en la ingeniería de tejido vascular y regeneración <i>ex vivo</i> de reemplazos dérmicos. Crecimiento de tejidos como el hueso y el cartílago.	Se pueden fabricar en diversas formas, tales como geles, películas, láminas, discos, esponjas, granos o materiales compuestos.

Tabla 2. Propiedades, aplicaciones y características del colágeno [21].

1.5 Impresión 3D

La bioimpresión se define como un proceso de transferencia asistido por computadora para modelar y ensamblar materiales biológicos, sean celulares o no, con una organización de apilamiento capa por capa para producir estructuras que simulen diferentes tejidos del organismo con el objetivo de ser utilizadas en medicina regenerativa y otros estudios biológicos [56]. Esta técnica es una forma de prototipado rápido y permite la producción de estructuras o andamiajes ordenados tanto externa como internamente. Dicha forma de producir andamios otorga ventajas vinculadas a la posibilidad de poder fabricar matrices definidas y específicas [57].

Comprende el diseño del modelo del andamio mediante la utilización de un software CAD (Computer-Aided Design), que luego se refleja en la impresión mediante una serie de capas. En correspondencia con cada corte de sección transversal del prototipado rápido, se establece una capa de material que comienza desde la parte inferior y se mueve hacia arriba, una capa por vez, para la creación de los andamios [58].

Presenta ventajas sobre otras técnicas de fabricación ya que permite controlar la arquitectura de la matriz de manera más eficiente. Logra modificar de acuerdo a la función destinada la forma, el tamaño, la interconectividad, las ramificaciones, la geometría y la orientación, para poder ofrecer una estructura similar a la orgánica. Además, presenta la capacidad para controlar propiedades mecánicas, efectos biológicos y degradación cinética de los andamios [59].

Sin embargo, las desventajas que presenta esta técnica están vinculadas con la baja resolución de impresión de los sistemas actuales y la elección del tipo de material polimérico usado [59].

Esta tecnología emergente está cambiando ampliamente el enfoque tradicional de la fabricación de andamios en la IT. 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 andamio a imprimir [60].

Existen distintos métodos de impresión que han intentado solucionar diferentes problemáticas relacionadas con la falta de precisión en la colocación de las celdas, la densidad celular limitada, la necesidad de solventes orgánicos, las dificultades en la integración de la red vascular, como así también, la interconexión insuficiente.

La clasificación de los métodos de bioimpresión pueden observarse en la figura 5. Además, se presenta un resumen esquematizado de las técnicas de bioimpresión, mencionadas anteriormente, en la figura 6:

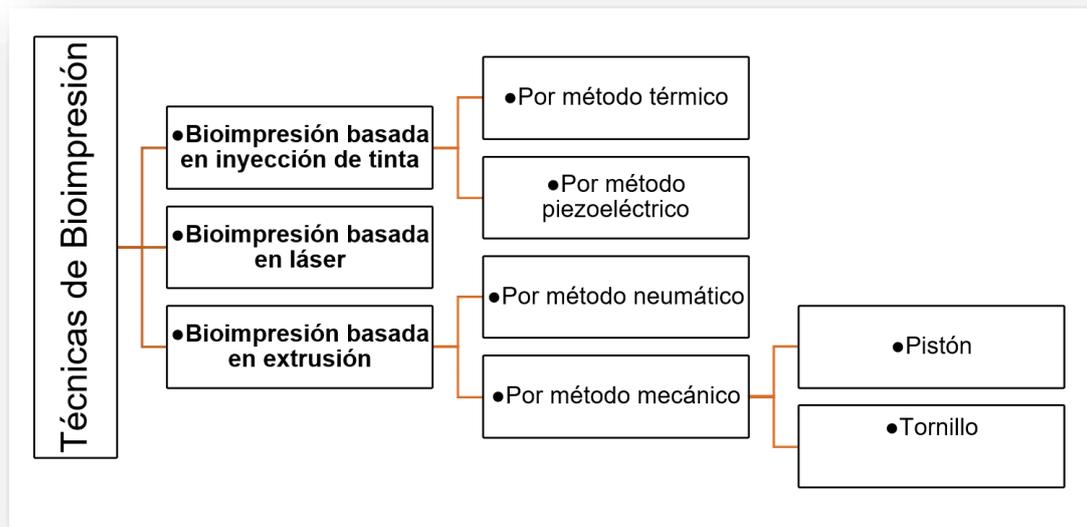


Figura 5. Técnicas de bioimpresión de acuerdo a los métodos utilizados: inyección de tinta, láser y extrusión [57].

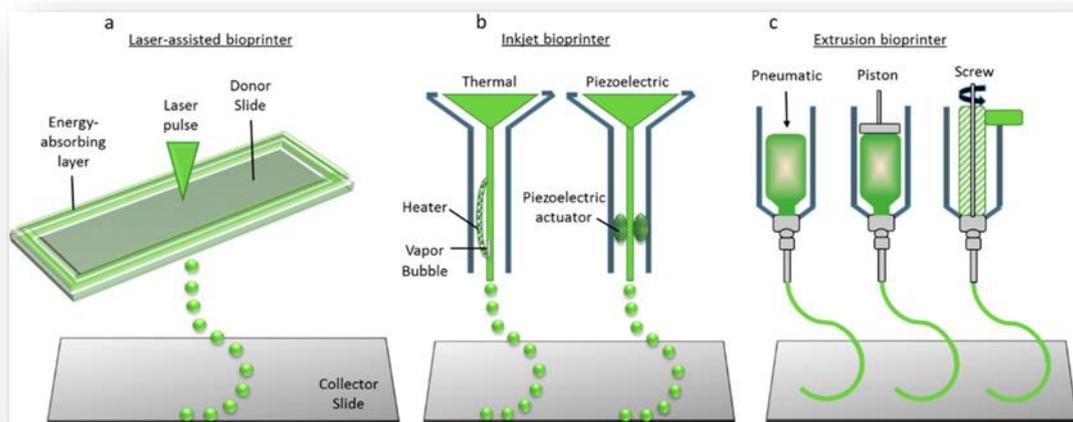


Figura 6. Tres tecnologías principales de bioimpresión: (a) bioimpresión asistida por láser; (b) bioimpresión de inyección de tinta; (c) bioimpresión de extrusión [61].

1.5.1 Bioimpresión basada en extrusión

La bioimpresión basada en extrusión es una combinación de un sistema dispensador de fluidos accionado de modo neumático o mecánico (por pistón o impulsado por tornillo) y un sistema robótico automatizado para la impresión [62].

La tinta se inserta generalmente en jeringas de plástico desechables y es dispensada en el sustrato receptor.

De acuerdo al modo de accionamiento, se identifican características diferentes. La deposición accionada por pistón generalmente proporciona un

control más directo sobre el flujo de la tinta a través de la boquilla. Los sistemas impulsados por tornillo pueden proporcionar un mayor control espacial y son beneficiosos para dispensar biogeles con mayor viscosidad [63]. Sin embargo, pueden generar mayores caídas de presión a lo largo de la boquilla, siendo potencialmente dañinos para el caso de incluir células en la tinta.

Por otro lado, la principal ventaja de un sistema accionado neumáticamente son los diversos tipos y viscosidades de tintas que pueden dispensarse ajustando la presión y el tiempo de activación de la válvula de salida [64]. Esta técnica proporciona una integridad estructural relativamente mejor debido a la deposición continua de filamentos y presenta el beneficio de poder imprimir una amplia gama de materiales.

1.6 Biomateriales basados en colágeno: aplicaciones clínicas y usos en IT

Las matrices basadas en colágeno han tenido un uso generalizado, y existe evidencia considerable que avala su uso clínico [65, 66]. Muchas investigaciones se han reportado sobre el empleo de colágeno, como material para la construcción de andamios, ya sea como proteína nativa o en su forma desnaturalizada [67, 68, 69, 55], en sistemas de liberación de drogas, esponjas para quemaduras y heridas, mini-pellets, tabletas para entrega de proteínas y en nanopartículas para realizar reparto genético [70, 52]. Además, se han utilizado como sutura quirúrgica, agentes hemostáticos, y en IT como matrices para cultivo celular e injertos de reemplazo [43].

Se ha reportado la utilización de andamios de colágeno en cirugías, vasos sanguíneos artificiales y válvulas cardíacas [43], debido a la baja inmunogenicidad, estructura porosa, buena permeabilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan [49]. Es así que todas estas características posicionan al colágeno como un biomaterial prometedor para el empleo en IT.

Sin embargo, se encontraron reportes cuyo objetivo fue modificar determinadas propiedades de los andamios, vinculadas con su resistencia mecánica, sus características de liberación mediante entrecruzamiento o combinación de biopolímeros para optimizar su utilización en determinados contextos clínicos como, por ejemplo, para mejorar su estabilidad estructural tras hidratación.

Se ha utilizado colágeno bovino tipo I para crear andamios porosos como medio de soporte para regenerar los tejidos de la vejiga en un modelo experimental de extrofia vesical [5, 6], y como soporte celular en la inducción del proceso de restauración de tejido miocárdico, mostrando excelentes resultados [6]. Investigaciones sobre andamios de colágeno fabricados a partir de piel de tiburón, permitieron el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos en estudios *in vitro*. Además, se observó que esas células conservaron la orientación

organizada en forma de huso al cultivarse sobre la matriz de colágeno empleada como soporte [71].

Por otro lado, andamios de colágeno con una porosidad mayor al 90% y tamaños de poro entre 100 y 150 μm , se utilizaron como soporte para guiar la regeneración axonal y/o reparación de nervios lesionados del sistema nervioso central y periférico [72], como así también, en aplicaciones en tejidos como tendón [73], ligamento [74], cartílago [75], injertos vasculares [76], hueso [77] y piel [78]. En esta última, se ha destacado el uso de distintas matrices de nanofibras electrohiladas debido a la facilidad para ajustar sus propiedades tales como la humectabilidad, lo cual mejora la adhesión y evitan la acumulación de fluidos en la interfaz tejido-andamio. Éstas ya existen en el mercado y se utilizan principalmente como injertos, favoreciendo la regeneración tisular [21].

Entre los distintos métodos de fabricación, el electrohilado es una técnica que permite el soporte y crecimiento celular. Matthews et. al. [79] y Bowlin et al. [80] mostraron que los colágeno tipo I, II y III podrían formar fibras que son similares o incluso reproducir por completo las propiedades estructurales y biológicas de la MEC de colágeno natural en condiciones óptimas. Adicionalmente, se ha demostrado que la liofilización es otro método útil para la fabricación de andamios de colágeno [81].

1.6.1 Andamios de colágeno fabricados con tecnología 3D: una alternativa para optimizar microestructura y reproducibilidad

Actualmente, la impresión 3D es uno de los métodos más apropiados para producir estructuras tridimensionales destinadas a usos biomédicos, tejidos y órganos. Como se mencionó anteriormente, esta tecnología permite obtener un mayor control de la microestructura, y lograr una alta reproducibilidad de la arquitectura, debido a que mejora de manera importante la capacidad de controlar la distribución, el tamaño, el volumen y la interconectividad entre los poros. De esta manera, es posible diseñar estructuras capaces de imitar las complejas organizaciones de la MEC, y así proveer un microambiente para la adhesión celular y posterior proliferación, distribución y diferenciación, con la capacidad de soportar el crecimiento celular y formación de tejido [82].

Cabe destacar, que son escasos los trabajos encontrados que han elaborado andamios íntegramente de colágeno impresos con tecnología 3D como método de fabricación, debido a la baja viscosidad que presentan las tintas de colágeno puro [83]. Para remediar esto, en los últimos años se han utilizado distintas estrategias para lograr la producción de andamios de colágeno mediante impresión 3D, tales como impresión criogénica [83], entrecruzamiento in situ [70], tintas híbridas [84] y soluciones de colágeno con alta viscosidad [85]. Por otro lado, otros autores han combinado colágeno junto a otros polímeros tales como quitosano [86], agarosa [87], fibrina [84] y ácido hialurónico [88].

También, se utilizaron moldes negativos como un método indirecto de impresión 3D que permitió la fabricación de andamios. Estos demostraron la capacidad de soportar el crecimiento de células mesenquimales humanas *in vitro* por 4 semanas, y no han producido efectos citotóxicos en las células sembradas [89]. El método indirecto de impresión 3D tiene la capacidad de imprimir andamios viables, y puede ser una alternativa útil y económica para fabricar andamios a escala de laboratorio en comparación con la compra de una impresora 3D [90].

Se evidenciaron aplicaciones en tejido óseo con andamios de colágeno tipo I y fosfato de calcio, impresos 3D, creados a bajas temperaturas. Los resultados mostraron el poder osteoconductor de la estructura, y el reemplazo paulatino del andamio por la formación de nuevo tejido. Bon Kang et al. [82] demostraron que se pueden usar dos o más tecnologías de impresión 3D o combinarlas con otro método de fabricación de andamios con el objetivo de superar las limitaciones y crear una estructura 3D multifuncional. Además, destacaron la importancia de desarrollar materiales como tintas que permitan crear directamente dispositivos implantables como andamios biodegradables.

En proyectos integradores anteriores desarrollados en la cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Universidad Nacional de Córdoba); se utilizaron materiales basados en colágeno para la fabricación de andamios utilizando método de impresión 3D con tecnología de extrusión [91]. Se utilizó tejido bovino (tendón de Aquiles) para la extracción del colágeno, que luego fue sometido a un protocolo de purificación. Los resultados obtenidos mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poli(acrilamida) mostraron que las bandas obtenidas correspondieron a las cadenas α_1 , α_2 y β con poca contaminación de otras proteínas pequeñas. Además, las mediciones reológicas de las dispersiones de colágeno (60 mg por ml de PBS) a pH 7 revelaron una alta viscosidad y un comportamiento pseudoplástico. De esta manera, se obtuvo un gel de colágeno apto para la impresión de andamios [92]. Conjuntamente, se desarrolló una impresora 3D simple, versátil y de bajo costo, que permitió la impresión de andamios de colágeno a pH 7. Éstos últimos, presentaron una porosidad superior al 90%, un porcentaje de hinchamiento de 1400% aproximadamente, y no evidenciaron signos de citotoxicidad para línea celular Vero ni para NIH 3 T3. También se observó la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido y su comportamiento luego de dos semanas en cultivo celular a 37° C. De esta manera, se obtuvieron andamios de colágeno impresos 3D que mantuvieron su estructura fibrilar sin necesidad de usar un método adicional como entrecruzamiento, electrohilado, tinta híbrida o bajas temperaturas.

Por otro lado, otro grupo de trabajo de la misma cátedra, presentó un protocolo de extracción y purificación de colágeno tipo I de piel porcina para la obtención de tinta, y por medio de impresión 3D fabricaron andamios de colágeno [93]. Este método simple y económico, involucró una serie de

tratamientos con soluciones ácidas y básicas, que preservaron la integridad de la estructura de las fibras, a diferencia de procedimientos enzimáticos normalmente utilizados que pueden desnaturar la proteína. Mediante el uso de espectrofotometría y electroforesis desnaturante, pudieron caracterizar y cuantificar el colágeno en proceso y mediante un estudio reométrico, determinaron su viscosidad. Con estos parámetros definidos, lograron obtener una tinta que permitió una impresión por extrusión, con una homogeneidad y estructura estable suficiente para la producción de andamios tridimensionales. Éstos demostraron no ser citotóxicos y permitieron el crecimiento y la migración celular.

En la IT es esencial que se mantengan determinadas propiedades mecánicas y biológicas de las estructuras en contacto con tejido para asegurar la adhesión y proliferación celular, y brindar una estructura funcional para el cultivo e implantación. De la misma manera, el grupo de trabajo perteneciente a la cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [92], mejoró mediante un tratamiento dehidrotermal algunas características de los andamios impresos. Aumentó la cantidad de enlaces covalentes luego del tratamiento, como así también, reveló una mayor resistencia a la enzima colagenasa por parte de los andamios de colágeno sometidos a un ensayo de degradación enzimática. Por otro lado, el ensayo de hinchamiento demostró una disminución en la absorción de agua de los andamios entrecruzados, lo cual fue producto de un aumento de la densidad en la red polimérica. Además, por medio de microscopía electrónica de barrido, reveló diferentes poblaciones de tamaños de poros, y no se evidenció citotoxicidad para células NIH 3 T3.

De esta manera, los artículos descritos permiten concluir que los polímeros naturales, como el colágeno, representan una categoría principal de materiales con potencial para el uso en la impresión 3D en la IT, y cómo este método de fabricación se ha convertido en una herramienta prometedora para fabricar andamios con una alta reproducibilidad y precisión, creando así estructuras tridimensionales capaces de imitar características de la MEC.

En este proyecto integrador se llevó a cabo una caracterización física y biológica de los andamios de colágeno tipo I de origen porcino fabricados mediante tecnología de impresión 3D, por método de extrusión. Para ello, se realizaron: análisis de solubilidad, porosidad e hinchamiento del material impreso; evaluación *in vitro* de la citotoxicidad y hemocompatibilidad según norma ISO 10993; evaluación de la adhesión celular a través de microscopía óptica de fluorescencia, mediante tinción con DAPI; y valoración de los efectos locales y respuesta tisular de tejido subcutáneo tras implantación de los andamios en ratas. También, se evaluó la composición física de dichas estructuras (tamaño de hebras y poros) sometidas a diferentes procesos, tales como liofilización, inmersión en medio de cultivo, hidratación con tampón fosfato

salino (PBS) y cultivo celular; mediante lupa, microscopía óptica confocal y microscopía electrónica de barrido.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Generales

En el presente Proyecto Integrador se tiene como objetivo general la impresión de andamios de colágeno de origen porcino mediante tecnología de impresión 3D por método de extrusión, y la caracterización física y biológica de estos mediante diferentes ensayos.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtención de colágeno e impresión de los andamios:
 - Purificar colágeno a partir de piel porcina con protocolo de extracción establecido.
 - Imprimir andamios con tecnología 3D por método de extrusión.
- Caracterización físico-química de los andamios impresos:
 - Evaluar estructura y dimensiones de los andamios, al ser sometidos a distintos procesos: liofilización, inmersión en medio de cultivo, hidratación con PBS y posterior a la siembra de células en su superficie, utilizando lupa con magnificación X10 para verificar y controlar parámetros de diseño.
 - Valorar composición física (porosidad y estructura fibrilar) de los andamios mediante microscopía óptica confocal y microscopía electrónica de barrido.
 - Realizar ensayo de solubilización a los andamios en medio de cultivo a 37°C para evaluar comportamiento de los mismos en condiciones fisiológicas.
 - Analizar porosidad e hinchamiento de los andamios impresos, para evaluar el comportamiento estructural de los mismos.
- Caracterización biológica de los andamios impresos:
 - Caracterizar los andamios mediante ensayos de citotoxicidad según norma ISO 10993-5 y hemocompatibilidad *in vitro* de acuerdo a ISO 10993-4.
 - Evaluar la adhesión celular *in vitro* del material que compone el andamio, utilizando microscopía de fluorescencia y empleando tinción de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).
 - Evaluar efectos locales y respuesta tisular de tejido subcutáneo tras ensayo de implantación *in vivo* de los andamios de acuerdo norma ISO 10993-6 en modelo animal (ratas Wistar).

3. Materiales y Métodos

3.1 Extracción y purificación de colágeno

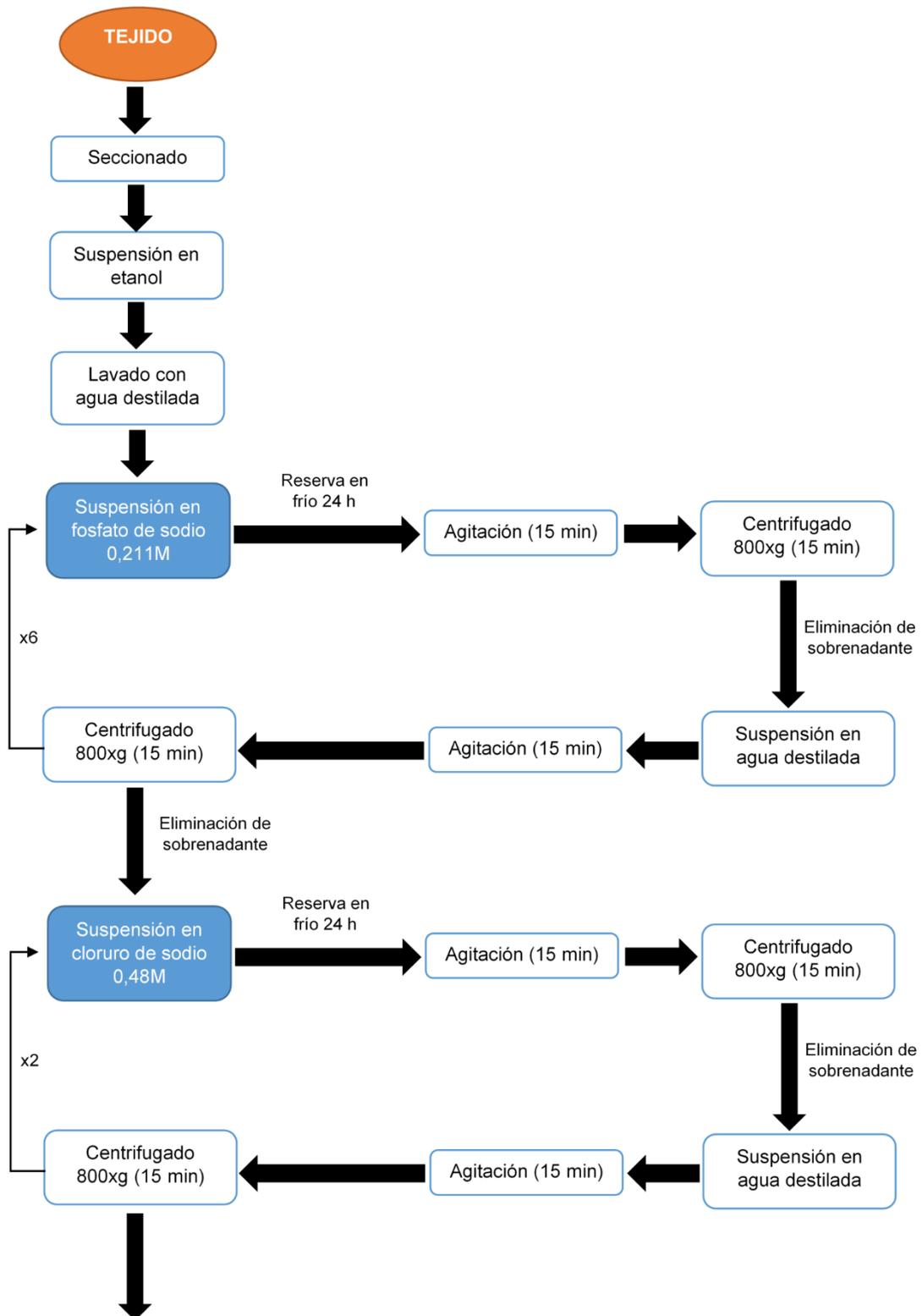
Se llevó a cabo el proceso de extracción y purificación de colágeno de origen natural. Se utilizó un método presentado anteriormente en un proyecto integrador de la misma cátedra [93], que es una modificación del método de Ghodbane et. al. [94].

Primero se seleccionó la materia prima a utilizar; esta puede ser de múltiples orígenes, pero lo recomendable es elegir una sola especie. Se extrajo colágeno de piel porcina, obtenida de un proveedor particular. A pesar de tener gran contenido de grasa, la piel se encontró en buen estado, sin pelos ni suciedades.

Se seccionó dicho tejido en trozos pequeños, utilizando bisturíes, tijeras y pinzas quirúrgicas.

Los trozos de piel porcina se colocaron en un beaker con etanol al 70% para su desinfección, y se preservaron en heladera. Luego de 24 horas se comenzó el proceso de purificación, pero previo a ello se colocaron las muestras en frascos de 50 ml con agua destilada, se extrajo parte del material graso excedente y se procesaron las muestras con un mixer para disminuir el tamaño de los trozos de piel.

Posteriormente, el material se agitó y se centrifugó a 2800 rpm (800xg) por 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron con un conjunto de soluciones siguiendo un procedimiento de 12 tratamientos con Fosfato de sodio 0,211M (6 tratamientos); cloruro de sodio 0,48M (2 tratamientos); buffer de citrato 0,225M con pH 3,7 (2 lavados) y ácido acético 0,175M (2 tratamientos). Cada uno de ellos tuvo una duración de 24 horas, y a continuación, se realizaron 4 lavados con agua bidestilada para eliminar residuos. Una vez terminado el protocolo, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones para eliminar el sobrenadante y se dejó reposar en heladera durante 24 horas. Todo el procedimiento se describe en la siguiente figura:



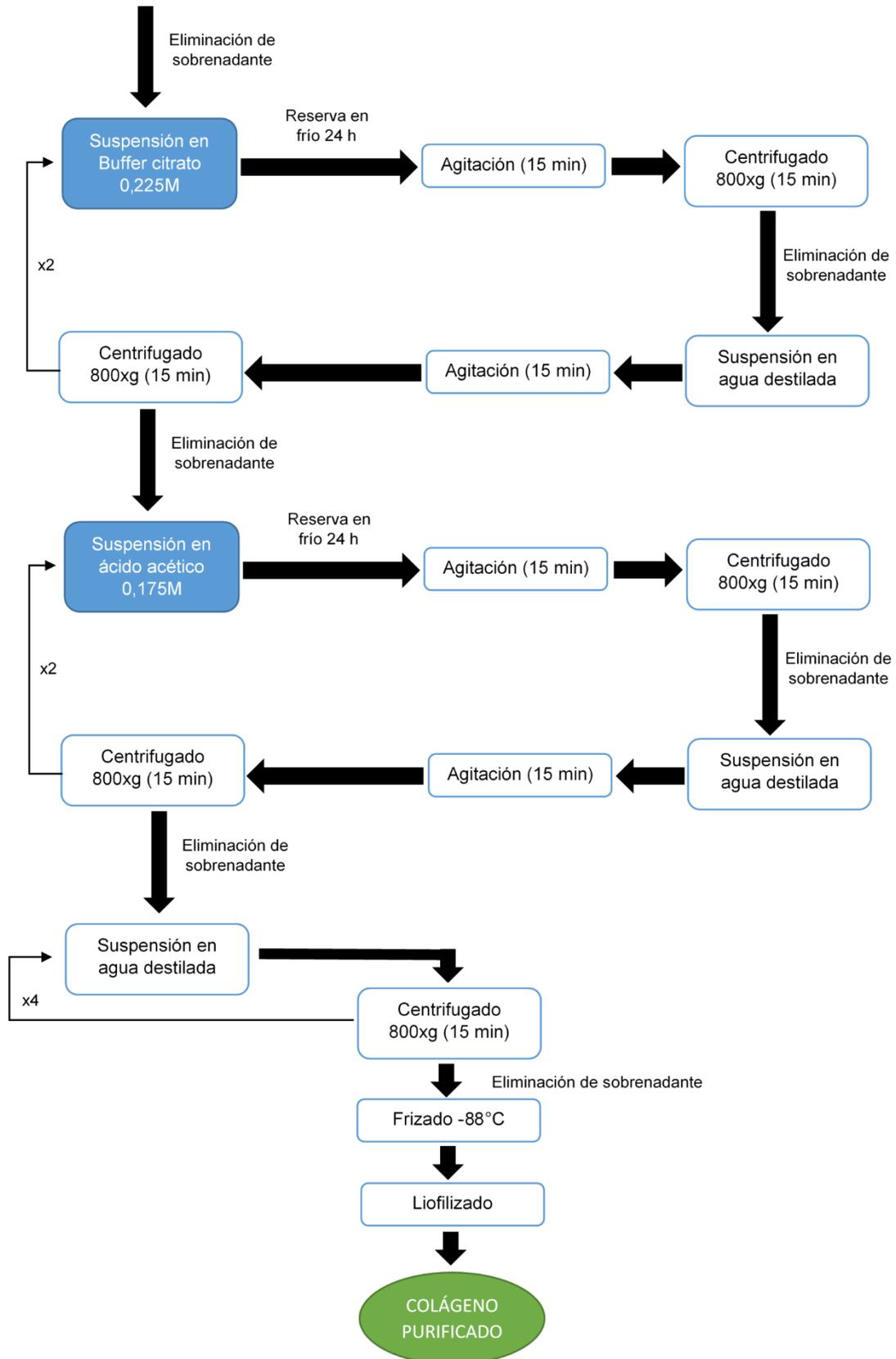


Figura 7. Diagrama en bloques modificado del procedimiento de purificación del tejido porcino y la obtención del colágeno a utilizar en la impresión 3D.

Una vez finalizado el tratamiento con ácidos y sales, se lavaron las muestras con agua destilada. Se conservaron en freezer a -88°C , para su posterior liofilización.



Figura 8. Protocolo de obtención de colágeno. (A) Piel de cerdo sin procesar obtenida de distribuidor comercial. (B) Seccionado de la piel en trozos mediante la utilización de material quirúrgico. (C) Piel seccionada. (D) Preparación de tandas para posterior liofilizado.



Figura 9. Proceso de extracción y purificación de colágeno. (A) Colocación de material con fosfato de sodio 0.211M durante 6 lavados. (B) Muestras en proceso de purificación. (C) Disminución de trozos mediante la utilización de mixer. (D) Agitación de muestra para posterior lavado. (E) Extracción de material graso en la superficie. (F) Aglomeración de trozos de material que muestran una correcta purificación del mismo.

3.2 Preparación de tinta para impresión

Al finalizar la extracción y purificación del colágeno, se procedió a liofilizar el material obtenido. Para ello se utilizó el equipo liofilizador (CHRIST – Alpha 2-4 LD) con el que cuenta la planta piloto del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos) de la ciudad de Córdoba-Argentina, durante un tiempo promedio de 30 horas a -90°C y una presión de vacío de -1 atm .

Continuando con el procedimiento, el material liofilizado se seccionó en trozos lo más finos posibles, utilizando bisturíes y tijeras quirúrgicas para evitar su contaminación. Con el fin de hacer polvo dicho material, se utilizó una procesadora (Atma LM8524E, 400W). Una vez procesado, se tamizó cuatro veces mediante la utilización de dos mallas de red de distintos diámetros de poros (0,7 y 0,5 mm respectivamente), para obtener un tamaño reducido de partículas y así evitar posibles obstrucciones durante el paso por la jeringa extrusora utilizada por la impresora 3D. Se rehidrató con ácido acético y se homogeneizó pasándolo por jeringas de 21G, con el objetivo de conseguir una tinta con una viscosidad e imprimibilidad óptima.

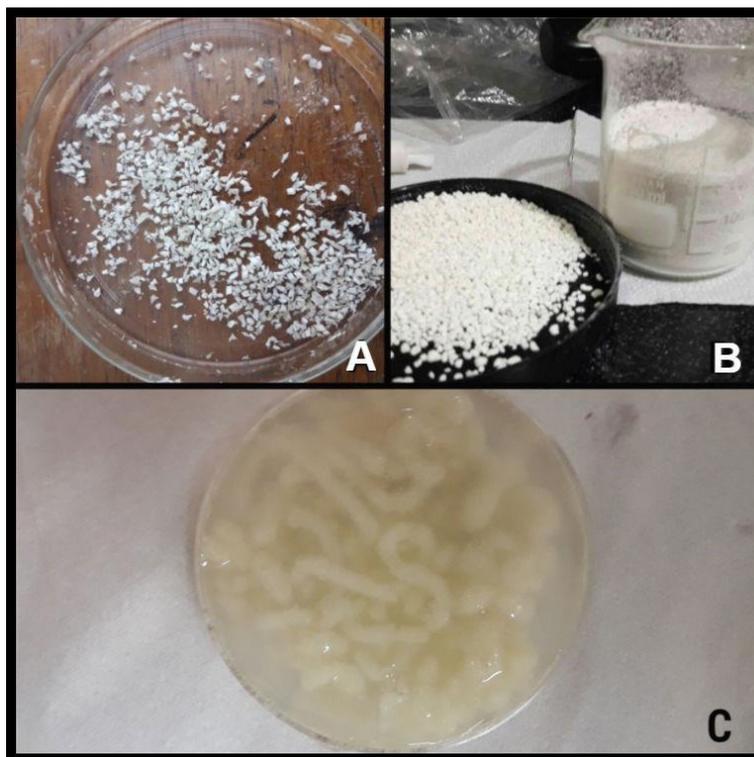


Figura 10. (A) Reducción de tamaño del material liofilizado. (B) Procesado y tamizado de material de colágeno. (C) Hidratación con ácido acético y trasvase por jeringa para comprobar viscosidad de la hebra para posterior impresión.

3.3 Impresión de andamios

De acuerdo a trabajos integradores anteriores [93, 95, 92] y considerando los lineamientos establecidos para el tamaño del implante sugerido por la norma

ISO 10993-6, se diseñó el andamio a utilizar en los ensayos *in vivo* según los siguientes parámetros:

- Tamaño de andamio: 7 mm de largo x 4 mm de ancho x 4 mm de alto.
- Diámetro de hebra (H): 0,7 mm.
- Diámetro de poro (P): 0,6 mm.
- Distancia de paso de la jeringa durante la impresión:

La distancia entre el centro de una hebra y la siguiente equivale al paso de la jeringa durante la impresión y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Paso de la jeringa} = \frac{H}{2} + P + \frac{H}{2} = 1,3 \text{ mm}$$

Fórmula 1. Paso de la jeringa para la impresión, donde H es el diámetro de la hebra y P el diámetro de poro.

Como se estableció el largo del andamio en 7 mm y el paso de la jeringa resultó de 1,3 mm, entonces se pudo calcular la cantidad de hebras a imprimir en sentido transversal de la siguiente manera:

$$\text{Cantidad de hebras en sentido transversal} = \frac{7 \text{ mm}}{1,3 \text{ mm}} = 5,4 \cong 6$$

Fórmula 2. Cantidad de hebras a imprimir en sentido transversal que componen a cada capa del andamio diseñado.

Luego, considerando que el ancho para imprimir se eligió de 4 mm, entonces la cantidad de hebras a imprimir en sentido longitudinal resultó:

$$\text{Cantidad de hebras en sentido longitudinal} = \frac{4 \text{ mm}}{1,3 \text{ mm}} = 3,1 \cong 4$$

Fórmula 3. Cantidad de hebras a imprimir en sentido longitudinal que componen a cada capa del andamio diseñado.

Considerando una altura de 4 mm, sugerida por normativa de ensayos de implantación, y teniendo en cuenta que resultados anteriores de impresión mostraron una altura media de 3 mm con una estructura de 4 capas, se estableció imprimir 8 capas para alcanzar la altura del andamio generado en este proyecto integrador. Se presenta en figura 11, un esquema con los parámetros de impresión y el render que se utilizó para imprimir los andamios.

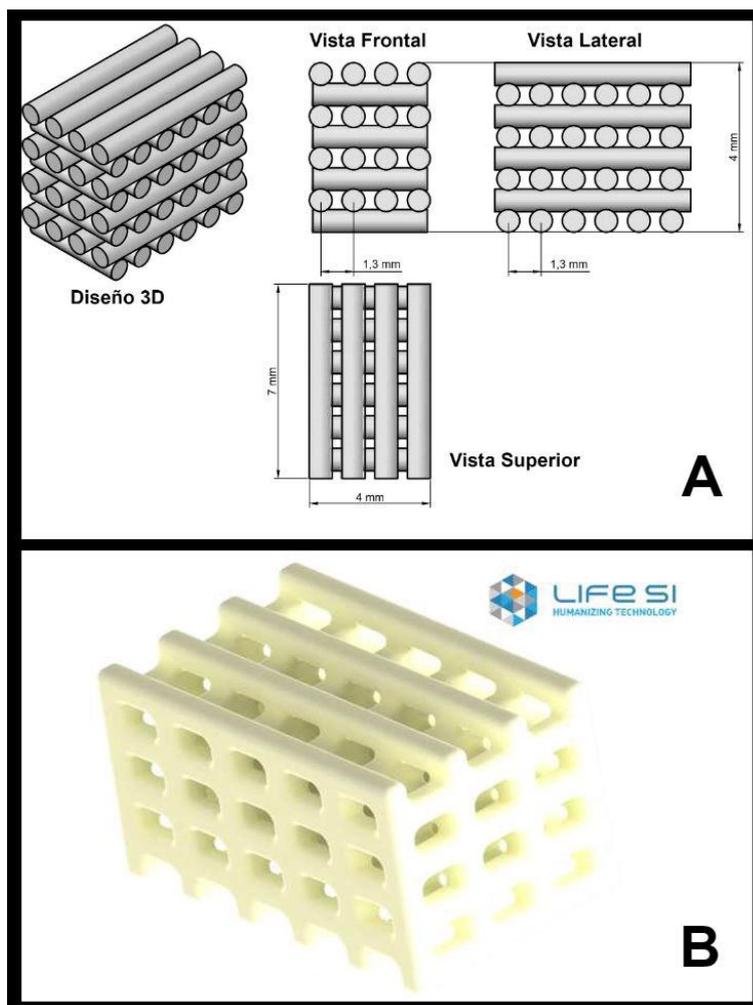


Figura 11. (A) Estructura del nuevo diseño basado en norma ISO 10993-6. (B) Render del diseño de impresión de los andamios provisto por el equipo LifeScience.

3.4 Parámetros de Impresión

Para llevar a cabo la impresión, se utilizó una impresora de extrusión (sistema de impresión 3D para investigación BP03) fabricada por LifeScience (Córdoba - Argentina) con una resolución igual a 500 μm en los ejes X e Y ($0,514 \pm 0,019$ mm diámetro interior de la aguja), y en el eje Z una resolución de 1 mm, para evitar el contacto de la capa inferior con la aguja, cuando se encuentra trabajando en la capa superior. Debido a la elevada viscosidad de la tinta, se aplicó un retraso de tiempo entre una deposición de material y la siguiente, para asegurar una salida efectiva del mismo. Se destaca el patrón de movimiento recorrido por la jeringa en forma de “S” [92]. También cabe mencionar que la empresa cuenta con instalaciones que cumplen con condiciones de asepsia, temperatura ambiental y condiciones de esterilización, la cual se aplicó a los andamios, posterior a su impresión.

Se anexa el informe de impresión 3D con materiales no convencionales otorgado por LifeSI al momento de la impresión en el apartado Anexo 7.1 “Informe de impresión 3D”, donde se especifican los parámetros, el sistema de

impresión, el render, los descartables utilizados durante la impresión y observaciones realizadas.

3.5 Evaluación del comportamiento estructural de los andamios al ser sometidos a distintos procesos

3.5.1 Liofilización de andamios

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. Es el proceso más inocuo para secar productos y es el mejor método para secar compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa. Este método permite la preservación de estructuras inestables en una solución, otorgándoles mayor estabilidad y resistencia. En el caso de los andamios, otorga una distribución de poros extremadamente irregular y un elevado grado de variación en el tamaño de los mismos, pudiendo así obtener estructuras porosas, reproducibles y homogéneas de forma repetida con elevadas interconectividad de poros, porosidad y área de la superficie [96]. Varios autores han reportado el empleo de esta técnica en andamios de colágeno, resaltando la viabilidad del proceso [97, 98, 99].

El proceso de liofilización se realiza en vacío y a baja temperatura y así, por ejemplo, es posible evitar la desnaturalización de las proteínas [100].

En nuestro proyecto integrador, al finalizar la impresión de los andamios, se procedió a liofilizar el material obtenido. Se utilizó el equipo con el que cuenta la planta piloto del ICTA mencionado anteriormente; durante un tiempo promedio de 7 horas con condiciones de temperatura de -90°C y presión de vacío de -1 atm para realizar dicho proceso. Posteriormente, los andamios fueron colocados en freezer a -4°C para su posterior utilización en los distintos ensayos.

3.5.2 Inmersión e hidratación de andamios en distintos medios fisiológicos

Para evaluar cuáles son los cambios que sufren los andamios a nivel estructural ante la inmersión en un determinado medio fisiológico, se los sometió a dos estudios: inmersión en medio de cultivo e hidratación con PBS.

Luego de que los andamios fueron liofilizados, se sometieron dos muestras a un proceso de hidratación con PBS durante 24 horas. El tampón fosfato salino o buffer fosfato salino es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la

del cuerpo humano (isotónico). Se trata de una solución isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; no es tóxica para las células de los mamíferos, y su pH es de 7,4 [101].

Luego se tomaron otras dos muestras y se colocaron en medio de cultivo Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium o "DMEM" (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), la cual es una fórmula modificada que permite el crecimiento celular *in vitro* proporcionando los nutrientes esenciales requeridos por la célula. Se colocaron durante una semana a 37°C para evaluar el comportamiento de las estructuras ante la simulación de condiciones fisiológicas (pH, temperatura y concentración de iones y solutos) a las cuales estarían sometidos en el caso de que estuvieran implantados *in vivo*. Se extrajo el medio de cultivo, y se procedió a llevar mediciones de la estructura resultante mediante la utilización de calibre vernier, lupa X10 y fotos de las mismas.

3.5.3 Cultivo celular *in vitro* sobre los andamios

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, permitiendo el máximo desarrollo de sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. En este proyecto integrador, el cultivo celular fue realizado por el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT, CONICET-UNC). Para ello, los andamios sometidos a cultivo fueron esterilizados en etanol al 70% durante 12 horas, y expuestos a luz ultravioleta por 15 minutos. Posteriormente, cada uno de los andamios fue colocado en una placa de polietileno de 24 pocillos y se sembraron con células epiteliales Vero (densidad 10.000 células/andamio). Dichas células, fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Pasching, Austria), 4mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4mM de Piruvato de sodio (Sigma, St Louis, EE.UU.), 10.000 µl/ml de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomina a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire, siendo este cambiado cada tres días.

El período de cultivo tuvo una duración de 7 días. Se procedió a medir los andamios en contacto con células mediante la utilización de calibre, lupa X10 y fotos de éstos para evaluar una posible contracción de poros y del diámetro de las hebras. Luego, se evaluó la adherencia y la migración celular mediante tinción con DAPI, y microscopía óptica de fluorescencia (como se explica más adelante, sección 3.9).

3.6 Medición de las dimensiones de los andamios con el diseño para implantación

Una vez impresos los andamios, y sometidos a los distintos procesos (sin liofilizar, liofilizado, inmersión en diversos medios fisiológicos y cultivo celular) se procedió a relevar las dimensiones de los mismos para evaluar parámetros de diseño. Se empleó calibre vernier (Silver Shadow) con precisión de 0,05 mm, y se realizaron 3 mediciones para cada una de las muestras analizadas. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar asociado.

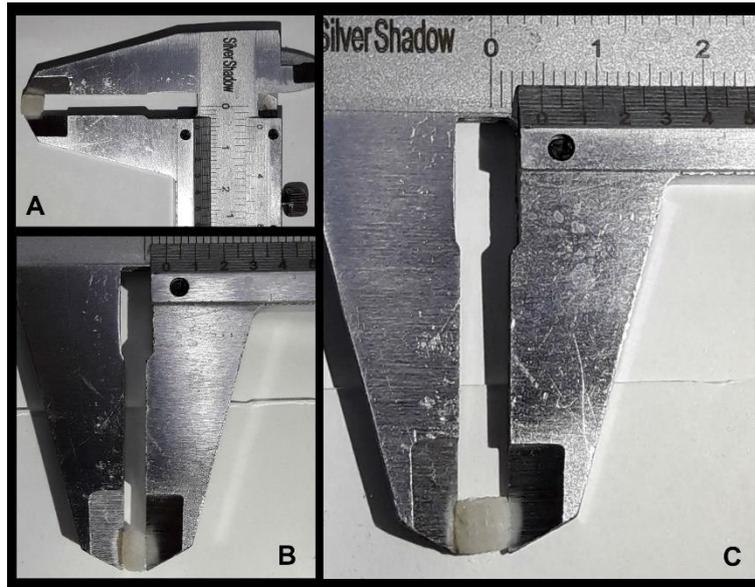


Figura 12. (A, B) Medición de lados del andamio. (C) Medición de alto del andamio.

Mediante el uso de lupa con un aumento de X10 y cámara fotográfica (Samsung, 13 Mpx) se obtuvieron imágenes magnificadas para posterior análisis de las dimensiones de las hebras y poros de los andamios. Se evaluaron 3 imágenes de cada uno mediante software ImageJ (National Institutes of Health, USA). Los resultados se expresaron de acuerdo a parámetros presentados en apartado 3.16 “Presentación de Resultados y Análisis Estadístico”.

3.7 Evaluación de los andamios mediante Microscopía Óptica Confocal

Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis de Rayos X (LAMARX, FAMAFA, UNC) utilizando un microscopio óptico confocal (OLYMPUS LEXT OLS4000) con diferentes magnificaciones. Dicho equipo se encuentra automatizado y utiliza un láser de 405 nm que tiene un diminuto “spot”. Permite capturar imágenes 3D y realizar mediciones de alta resolución de microgeometría de superficies rugosas. Su resolución espacial (plano x-y) está definida por la longitud de onda del láser, y su resolución en el

eje Z alcanza los 10 nm. Dado a sus características, permite analizar superficies blandas como materiales biológicos, es por ello que se elige su utilización.

Se obtuvieron imágenes de los poros y hebras de los andamios establecidos previamente en el diseño de impresión, como así también, una representación tridimensional de una porción de la estructura. Además, se lograron imágenes superficiales que mostraron la porosidad del material empleado para la construcción de los andamios.

3.8 Observación de los andamios mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Este ensayo, al igual que el anterior, fue realizado en el LAMARX, utilizando un microscopio de barrido electrónico (FE-SEM Sigma) a 3KV. Este microscopio de alta resolución junto con su sistema óptico permite obtener un gran campo de visión con magnificaciones desde 12X a 900.000X.

Previo a realizar el ensayo, las muestras fueron metalizadas en vacío con cromo. Con ello, se obtuvieron imágenes de las fibras internas que componen al material biológico y los microporos resultantes. Posteriormente, las imágenes fueron medidas con ImageJ para obtener medición de las dimensiones de dichos microporos y fibras.

3.9 Análisis de los andamios con cultivo celular a través de Microscopía Óptica mediante tinción con DAPI

DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. Su estructura química es la siguiente:

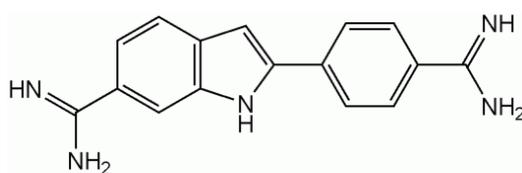


Figura 13. Estructura química del marcador DAPI [102].

Es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia. DAPI no puede pasar a través de la membrana celular, debido a eso, las células deben ser permeabilizadas y/o fijadas para que el colorante pueda entrar en su interior y unirse al ADN. Este se asocia con el surco menor del ADN de doble cadena, con preferencia por los grupos de adenina-timina.

Cuando DAPI se une a ADN bicatenario su máximo de absorción es a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es a 461 nm (azul). Por lo tanto en la microscopía de fluorescencia, el material tratado con

DAPI es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul/cian [102].

En primer lugar, se observó la adhesión de las células Vero a los andamios usando microscopía de fluorescencia con tinción DAPI para visualizar el núcleo celular. Para ello, se cultivaron los andamios con estas células durante 7 días, y posteriormente se lavaron cuidadosamente con PBS. Luego, las células unidas a los andamios se fijaron con solución de paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS, y se incubaron con DAPI a temperatura ambiente durante 10 minutos cada paso. Finalmente, se observaron todos los andamios en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U (Tokio, Japón) con un filtro de fluorescencia (rango 340-360 nm) para DAPI, con el cual se obtuvieron imágenes a un aumento X20.

3.10 Ensayo de solubilización en medio de cultivo a 37°C

Como se mencionó en el apartado 3.5.2 “Inmersión e hidratación de andamios en distintos medios fisiológicos”, se utilizó el procedimiento descrito allí para proseguir con el ensayo de solubilización. Una vez retirado el medio de cultivo, y registradas las mediciones de tamaño de los andamios, se lavaron cuatro veces con agua destilada para extraer residuos del medio de cultivo que afecten los resultados del ensayo. Luego las muestras se dejaron secar 24 horas en estufa, también a 37°C. Seguidamente, se tomó el peso de los mismos 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.



Figura 14. Registro de los pesos de los andamios luego del secado en estufa, con balanza de precisión.

3.11 Ensayo de hinchamiento

La cantidad de agua que puede absorber un determinado material en relación a su peso seco está definida por su capacidad de hinchamiento. La evaluación de esta propiedad se lleva a cabo mediante la realización de un método gravimétrico convencional [103]. Para ello, se procedió a registrar en balanza analítica los pesos secos (P_s) de los andamios sometidos a proceso de liofilización. Posteriormente, se colocaron en reposo durante 24 horas en PBS a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el período de ensayo, se pesaron nuevamente las estructuras, previo escurrimiento de líquido excedente. De esta manera, se determinó el peso húmedo (P_h) y se obtuvo el porcentaje correspondiente. Esta evaluación se llevó a cabo por triplicado en cada andamio sometido a análisis.

A continuación, se presenta la ecuación utilizada para determinar el porcentaje de hinchamiento (%H):

$$\% H = \frac{P_h}{P_s} \times 100$$

Fórmula 4. Ecuación que permite calcular el porcentaje de hinchamiento (%H) a través de la relación porcentual entre el peso húmedo (P_h) y peso seco (P_s) de los andamios ensayados.

3.12 Análisis de porosidad

Este análisis consistió en registrar con balanza analítica los pesos en seco (P_1) de los andamios a sometidos a ensayo. Posteriormente, se colocaron en etanol durante 24 horas y luego de un proceso de secado a temperatura ambiente, se registraron sus pesos (P_2) nuevamente. El porcentaje de porosidad (%P) fue medido utilizando la absorción y evaporación del etanol en el material de acuerdo con la siguiente ecuación [104]:

$$\%P = \frac{(P_2 - P_1)\delta_1}{P_1\delta_2 + (P_2 - P_1)\delta_1} \times 100$$

Fórmula 5. Ecuación que permite calcular el porcentaje de porosidad del andamio inmerso en PBS.

Donde δ_1 y δ_2 representan las densidades del colágeno (1,21 g/ml) y del etanol (0,79 g/ml) respectivamente [78].

3.13 Ensayo de Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se incluyen como primera fase en los estudios de evaluación de biomateriales. Este ensayo permite estudiar el potencial efecto tóxico de un biomaterial sobre un tipo determinado de células [105]. Dicho análisis constituye una vía rápida para obtener información valiosa que contribuye con la bioseguridad del material en análisis.

Este ensayo de citotoxicidad se realizó mediante ensayo de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o "MTT". Se basa en la reducción metabólica del MTT. Este es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su estado insoluble: formazán, formando cristales de color violeta insolubles en agua, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. No obstante, éstos pueden disolverse con isopropanol.

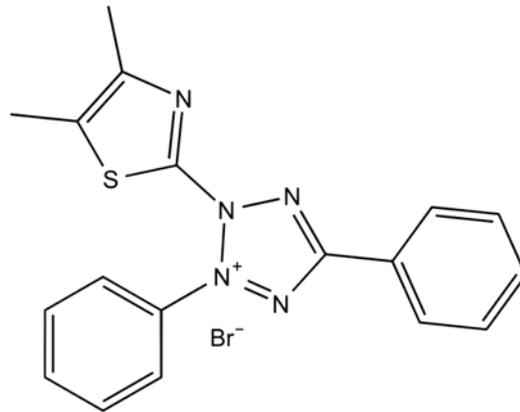


Figura 15. Representación química del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

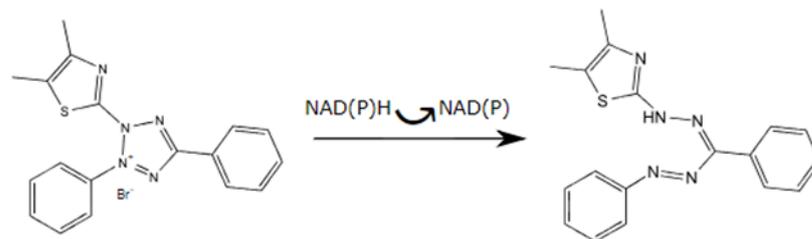


Figura 16. Reducción del MTT a Formazán.

De esta manera, es posible cuantificar la cantidad de MTT reducido gracias a la utilización de un método colorimétrico que permite identificar el cambio de coloración, de amarillo a 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. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición al extracto del constructo a evaluar, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

En nuestro proyecto integrador, se evaluó la viabilidad de células expuestas a extractos de los andamios. Este fue realizado por el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT, CONICET-UNC). Se utilizó el protocolo de evaluación propuesto por la norma ISO 10993-5 [106], empleando extractos de las muestras, de acuerdo a

los lineamientos propuestos según norma ISO 10993-12 [107].

Los extractos se prepararon mediante incubación de los andamios en DMEM durante 72 horas a una temperatura de 37°C, en una relación de 1,25 cm² de material por ml de DMEM. Se utilizaron 4 diluciones de los extractos: 25, 50, 75 y 100%. Diez mil células Vero de origen epitelial sugeridas por la norma fueron colocadas en una placa multipocillo de 96 en medio de cultivo 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 estreptomycin. La placa fue incubada a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas para la formación de una monocapa de células. Posteriormente, dicho medio de cultivo fue retirado y se les adicionó las diferentes diluciones del extracto de cada andamio. Esta práctica se realizó por triplicado.

El control positivo utilizado en este ensayo consistió de una solución de Fenol al 0,2%. Mientras que, el control negativo fue un extracto de polietileno de alta densidad realizado en una relación de 6 cm² de material por ml de DMEM. Ambos fueron realizados por sextuplicado.

Luego de 24 horas el extracto fue retirado de la placa y se observó la morfología celular mediante microscopía convencional para comprobar cambios. A continuación, se determinó la viabilidad celular. A todas las muestras ensayadas se les agregó MTT con una concentración final de 1mg/ml en PBS y fueron incubadas a 37°C durante una hora y media.

Se utilizó un lector de microplacas (MultiskanSpectrum, ThermoScientific) para leer las distintas absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 595 nm y el porcentaje de viabilidad celular se obtuvo como la relación porcentual entre la absorbancia (densidad óptica, DO) de las células tratadas, y la absorbancia de aquellas células crecidas en condiciones óptimas de cultivo (células blanco).

$$\%Viabilidad\ Celular = \frac{\text{absorbancia de las células tratadas}}{\text{absorbancia de las células blanco}} \times 100$$

Fórmula 6. Ecuación que permite calcular el porcentaje de viabilidad celular.

3.14 Ensayo de Hemocompatibilidad

Los ensayos de hemocompatibilidad se utilizan para determinar los efectos producidos por un producto médico o sus componentes, cuando durante su utilización, entran en contacto directo o indirecto con la sangre [108]. Se entiende por hemólisis a la destrucción de los hematíes o glóbulos rojos de la sangre que va acompañada de liberación de hemoglobina [109].

Existen dos maneras para cuantificar dicho evento: por métodos directos ó indirectos. Ambos determinan la hemólisis debida a las interacciones físicas y químicas con los eritrocitos. En el caso de los métodos directos, esta se determina mediante el contacto directo con el material, mientras que en los indirectos, el contacto es a través de un extracto del mismo. La norma ASTM F 756-00 es específica para los ensayos de las propiedades hemolíticas de materiales (principalmente debidas a factores químicos), pero no es suficiente para el ensayo de productos sanitarios completos [110].

En su forma más simple, para suspensiones muy diluidas de eritrocitos en contacto con materiales de ensayo, la hemólisis se registra a menudo como un porcentaje de la hemoglobina que ha sido liberada en el plasma sobrenadante normalizado por la hemoglobina total que existía disponible al comienzo del ensayo, equivalente a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{concentración de hemoglobina libre}}{\text{concentración de hemoglobina total}} \times 100$$

Fórmula 7. Ecuación que se utiliza para calcular el porcentaje de hemólisis.

Si todos los eritrocitos presentes al comienzo del experimento resultan destruidos, existe un 100% de hemólisis [111]. Esto se traduce en una disminución significativa en la cantidad de hematíes, lo cual compromete la capacidad de transportar oxígeno que puede resultar en un daño a nivel de órganos o tejidos.

Los efectos biológicos que se evalúan mediante la realización de este tipo de ensayos corresponden a la verificación de propiedades hemolíticas, de coagulación, trombosis, e inmunológicas (sistema de complemento).

El ensayo de hemocompatibilidad realizado en este proyecto integrador fue llevado a cabo por el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT, CONICET-UNC). Se utilizaron como documentos de referencia, los protocolos de evaluación de morfología de glóbulos blancos por contacto directo y hemólisis *in vitro* por contacto indirecto, propuestos por las normas ISO 10993-4 [110] y ASTM F 756-00.

3.14.1 Evaluación de Morfología de Glóbulos Blancos

Las condiciones de ensayo que se utilizaron para evaluar morfología de glóbulos blancos se estipulan a continuación:

- Tipo de contacto: directo.
- Sangre entera anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con los controles serológicos pertinentes y con consentimiento de los donantes para ser usada en los presentes estudios (Banco de Sangre de la Universidad Nacional de Córdoba)

procesada inmediatamente después de la donación.

- Condiciones del ensayo: 1 mg del objeto de ensayo/ml de sangre se incubó durante 3 horas a 37° C por triplicado (M1, M2, M3).
- Control Positivo: 0,2 g de látex/1 ml de sangre entera se incubó durante 2 horas a 37° C por triplicado (CP1, CP2, CP3).
- Control Negativo: PEHD (Polietileno de alta densidad) 30 micrones en una relación de 6 cm²/ml de sangre entera (espesor < 0,5 mm) se incubó durante 2 horas a 37°C por triplicado (CN1, CN2, CN3).
- Tinción de May Grünwald-Giemsa: de cada tubo (M 1-3, CP 1-3, CN 1-3) se prepararon, tiñeron y contaron bajo microscopio óptico tres frotis sanguíneos. También se realizaron y tiñeron cinco frotis sanguíneos a tiempo cero.

3.14.2 Evaluación de Hemólisis *in vitro* por contacto indirecto

Las condiciones de ensayo que se utilizaron para evaluar hemólisis *in vitro* por contacto indirecto se detallan a continuación:

- Tipo de contacto: indirecto.
- Sangre entera anticoagulada con EDTA con los controles serológicos pertinentes y con consentimiento de los donantes para ser usada en los presentes estudios (Banco de Sangre de la Universidad Nacional de Córdoba) procesada inmediatamente después de la donación.
- Condiciones de extracción: 1 mg del objeto de ensayo/ml de buffer fosfato salino libre de calcio y magnesio (PBS-CMF) se incubó durante 72 horas a 37°C. En el caso del control negativo, el extracto se ejecutó con una relación de 6 cm²/ml de PEHD (espesor < 0,5 mm). Se realizaron tres extractos y cada muestra se efectuó por triplicado.
- Condiciones de ensayo: 7 ml de PBS-CMF y 1 ml de sangre diluida (Hemoglobina 10 mg/ml) por 3 horas a 37°C. Se ensayaron seis muestras de tres objetos de ensayo distintos pertenecientes al mismo lote y a cada una se le cuantificó por triplicado la concentración de hemoglobina.
- Control Positivo: 7 ml de agua bidestilada estéril y 1 ml de sangre diluida se incubaron durante 3 horas a 37°C. Se realizaron tres tubos de control positivo y la cuantificación de hemoglobina se determinó por triplicado en cada tubo. No se pudo contar cien células en los preparados, es así que se realizó el conteo

diferencial de cincuenta y se multiplicó por dos cada subpoblación.

- Control Negativo: Se realizaron tres tubos de control negativo y la cuantificación de hemoglobina se determinó por triplicado en cada tubo.
- Blanco: Incubación de 7 ml de PBS-CMF con 1 ml de sangre diluida durante 3 horas a 37°C. Se realizaron tres tubos de control positivo y la cuantificación de hemoglobina se determinó por triplicado en cada tubo.
- La concentración de hemoglobina se determinó usando el método colorimétrico para cuantificación de hemoglobina como cianuro de hemoglobina (HEMOCIN-B, Brizuela-Lab) en un espectrofotómetro a 540 nm.

El porcentaje de hemolisis se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice hemolítico} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{0,844 A_{\text{sangre diluida}} - A_{\text{blanco}}} - \frac{A_{\text{control negativo}} - A_{\text{blanco}}}{0,844 A_{\text{sangre diluida}} - A_{\text{blanco}}}$$

Fórmula 8. Ecuación que permite obtener el índice hemolítico y determinar el grado hemolítico de la muestra en análisis.

El grado hemolítico se determina según la siguiente tabla:

Índice hemolítico	Grado hemolítico
0-2 %	No hemolítico
2-5 %	Levemente hemolítico
> 5 %	Hemolítico

Tabla 3. Índice hemolítico con su correspondiente grado hemolítico según norma ISO 10.993-4.

3.15 Ensayo *in vivo*: implantación subcutánea de andamios en modelo animal rata Wistar

3.15.1 El modelo animal en investigaciones biomédicas

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Se define como “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos” [112]. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos, materiales y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles [113].

Es necesario destacar que las comisiones de ética de experimentación animal piden el uso de técnicas alternativas, siempre que sea posible, así como

la reducción del número de animales y el refinamiento de los procedimientos de experimentación que minimice el sufrimiento de estos lo máximo posible. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las pautas éticas del Comité Institucional del Cuidado y uso de Animales de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, siguiendo las pautas establecidas por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) para el cuidado y uso de animales de Laboratorio.

3.15.2 Roedores: implicancias de uso

El ratón en la investigación junto con las ratas y otros roedores (cobayos, hámsteres y gerbos), son los mamíferos más utilizados en la investigación biomédica alrededor del mundo [114]. Debido a su pequeño tamaño, fácil manipulación, su disposición y bajo costo de mantenimiento, lo hacen el animal ideal para la investigación [115]. Además de que se puede disponer de una gran cantidad de cepas con características específicas, deficiencias genéticas espontáneas o inducidas que representan un buen número de enfermedades humanas [114].

3.15.3 Ensayo relativo a los efectos locales después de la implantación

La aplicación del ensayo *in vivo* en este proyecto integrador consistió en la implantación subcutánea de los andamios impresos y la evaluación de la respuesta del tejido causada, de manera local, por la muestra de ensayo y por los materiales de control.

El objetivo del ensayo fue evaluar la evolución de la respuesta del tejido desde la implantación de las muestras hasta su integración final o resorción/degradación [116]. Si bien la norma ISO 10993-6 [117] no trata sobre la toxicidad sistémica, carcinogenicidad, teratogenicidad o mutagenicidad; el ensayo proporciona una nueva percepción sobre dichas propiedades. Esta norma establece cuáles son los animales destinados a esta tarea y los sitios de implante.

Actualmente, la implantación subcutánea en modelos de animales pequeños se usa en pruebas preclínicas para evaluar la reactividad inmune y la capacidad de recelularización [118]. Además, permite la observación de una respuesta inflamatoria, y el avance de angiogénesis.

La mayoría de los estudios de implantación reportados emplean esta técnica de implantación en la cual colocan el biomaterial debajo de la piel sin fijación [119].

Particularmente, en nuestro ensayo, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 3 meses de edad siguiendo los lineamientos establecidos por la norma utilizada.

Los animales fueron donados por el Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET - UNC) de la ciudad de Córdoba y se trasladaron al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFyN - UNC), para trabajar bajo la supervisión de la cátedra de Fisiología Humana, que nos brindó las instalaciones para llevar a cabo el ensayo. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales constantes de temperatura ($20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), y ciclo luz - oscuridad (12:12) comenzando la fase de luz a las 7:00 hs, con disponibilidad de agua y comida *ad-libitum*.

El sitio de implantación elegido fue la región subcutánea dorsal, a los lados de la línea media. Se utilizaron 6 animales considerando que la norma establece un mínimo de 3. Los mismos presentaron un peso de 494 ± 14 gramos y una temperatura corporal promedio de $35,9\pm 0,1$ °C. Con respecto a la duración del ensayo, se programó un total de 4 y 8 semanas desde el día de la cirugía respectivamente, realizando la eutanasia de los animales al final de cada período, para comparar la respuesta del tejido en diferentes espacios temporales.

Además de lo mencionado anteriormente, se siguieron los lineamientos estipulados por la norma, la cual especifica las condiciones quirúrgicas necesarias. Entre ellas cabe mencionar:

- Anestesia general.
- Desarrollo de una cirugía que siga buenas condiciones de asepsia y de forma que minimicen el traumatismo en el sitio de implante, esto implica que previo a la cirugía se rasure o afeite la zona donde se coloca el material en análisis.
- Aplicación de desinfectante en la piel expuesta.
- Se debe asegurar que el implante no entre en contacto con el pelo del animal.
- Al finalizar la cirugía se cierra la herida con sutura o grapas quirúrgicas.

Luego de la implantación, se observó y registró el estado de salud de los animales, siguiendo condiciones éticas con respecto al cuidado de los mismos. Esto se realizó con un registro en planillas de signos vitales del animal, como temperatura y peso; y también se registraron valores cualitativos como comportamientos anómalos, inspección visual de edemas, hematomas, etc.

Para poder llevar a cabo una cirugía siguiendo las pautas establecidas por la norma ISO 10993-6 y respetando las normas éticas de manipulación con animales, se presentó ante el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en el Laboratorio) una solicitud de permiso explicando el ensayo a realizar. En el Anexo 7.2 “Informe presentado a CICUAL para realización de ensayo de implantación” se detalla el informe presentado con las condiciones requeridas por dicho ente regulador y la correspondiente resolución aprobada.

3.15.4 Consideraciones Pre-quirúrgicas

Para planificar el procedimiento quirúrgico, nos basamos en los lineamientos dados por la norma ISO 10993-6 [117] y reportes consultados [120]. Se realizó una cirugía de prueba con una de las ratas. En un principio, se planteó realizar dos incisiones en la región dorsal sobre la línea media del animal, para la posterior colocación subcutánea de los andamios a cada lado de dichos cortes.

Durante 15 días previos a cada cirugía, se registraron valores de temperatura corporal rectal de cada animal para obtener una temperatura media antes de la realización del ensayo, para después comparar con los registros de temperatura post implantación del material.

Todos los procedimientos fueron registrados con una cámara Sony Zeiss mediante fotografías y videos.

3.15.5 Cirugía de prueba: Estudio Piloto

El animal utilizado fue una rata macho Wistar de 344 gramos y 72 días de edad. Para respetar condiciones de asepsia, se rasuró y desinfectó el área quirúrgica con Povidona Iodo. Se le aplicó hidrato de cloral al 6% intraperitoneal (0,7 ml/100 gramos de peso corporal) como anestesia. Se realizaron dos incisiones, y se procedió con la implantación de los andamios mediante punto de sutura con Vicryl 4/0. Una vez finalizado el procedimiento, se cerraron las heridas mediante puntos sueltos con Vicryl 5/0. Se administró profilaxis antibiótica y 0,7 ml de analgesia intramuscular (Meloxicam 2 mg/kg de peso corporal cada 24 horas durante los dos primeros días) para el postoperatorio. El proceso quirúrgico total duró un tiempo de dos horas y fue registrado mediante fotografías y videos. El estado clínico del animal fue evaluado y controlado por un período de dos semanas hasta su eutanasia, en la cual se ensayó el procedimiento de extracción y fijación del andamio con el tejido circundante.

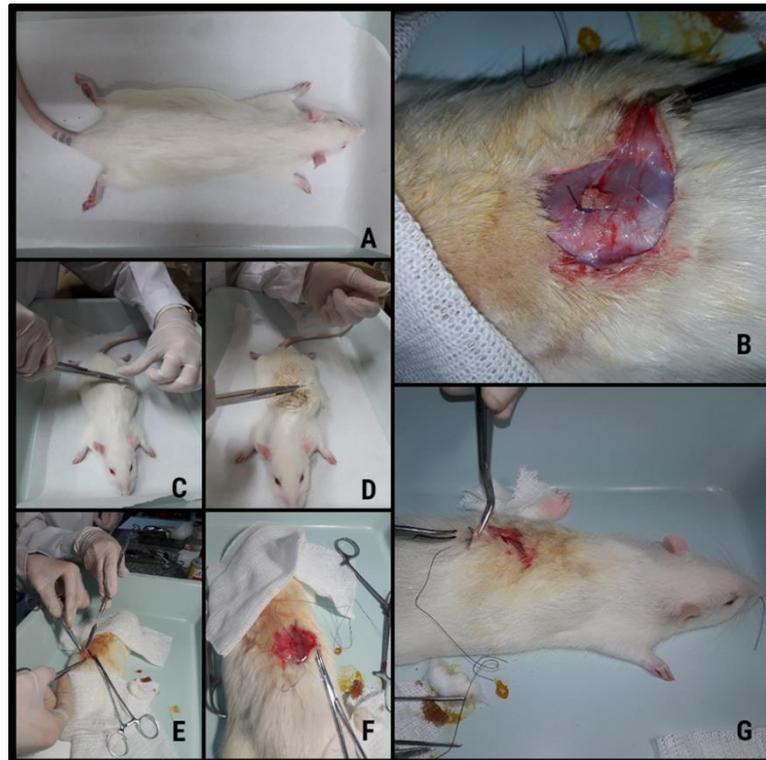


Figura 17. Cirugía piloto. (A) Animal de prueba anestesiado. (C, D) Limpieza y desinfección de la región a intervenir. (E) Cortes en los laterales de la línea media dorsal. (F, B) Colocación del andamio suturado. (G) Sutura de la piel.

3.15.6 Procedimiento quirúrgico

Se seleccionaron 16 andamios (de la tanda impresa con el tamaño sugerido por norma) previamente liofilizados y esterilizados en el laboratorio de la FCEFyN. Los materiales de cirugía utilizados fueron pinzas de disección, tijeras de mayo, bandeja de acero inoxidable, porta agujas mayo, entre otros. Además, se utilizaron gasas, algodón, guantes de látex y alcohol etílico al 96%.



Figura 18. Procedimiento para implantación de andamio o esponja en ratas Wistar.

- 1. Anestesia:** hidrato de cloral al 6% intraperitoneal, 0,7 ml/100g de peso corporal.
- 2. Limpieza y desinfección de la zona a intervenir:** para mantener condiciones de asepsia se rasuró la zona dorsal del animal a ambos lados de la línea media. Para desinfectar en la región de la piel previo a realizar el corte, se utilizó antiséptico/desinfectante Povidona Iodo (Pervinox).
- 3. Implantación:** considerando los resultados obtenidos con la cirugía de prueba, se diseñó el siguiente modelo de implantación:

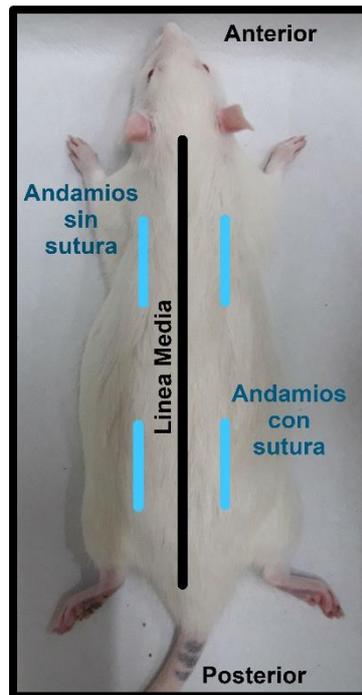


Figura 19. Esquema de implantación de andamios en rata.

Se decidió colocar 4 andamios por animal, situados 2 a cada lado de la línea media dorsal. Los dos situados en el lado derecho fueron suturados con un punto que traspasó el músculo, de manera que quedaron fijados, y el corte que se realizó fue lo suficientemente grande para poder suturar y manipular el andamio. Mientras que los dos del lado izquierdo, fueron colocados sueltos, en un corte con forma de “bolsillo”.

En el caso de las ratas control, el material utilizado como implante fue una esponja de colágeno comercial marca Helistat, obtenida a partir del tendón flexor profundo de los bovinos, conocido como tendón de Aquiles. Es una esponja absorbente suave, blanca, flexible y no friable. Debido a su característica de esponja coherente no friable, la aplicación de esta estructura hemostática en el sitio donde se desea la hemostasia se controla fácilmente [121]. En uno de los animales controles, se realizó una incisión del lado derecho y se colocó la muestra suturada con Vicryl 4/0; y en el restante se hizo una incisión de “bolsillo” del lado izquierdo y se colocó la muestra sin suturar.

4. **Cierre:** los cortes del lado derecho dado que fueron más grandes, requirieron más puntos de sutura que los del lado izquierdo.
5. **Analgesia:** una vez terminada la intervención quirúrgica, se envolvió en una manta al animal, y se le administró 0,7 ml de analgésico Meloxicam. Se lo mantuvo aislado durante unos minutos para su recuperación en proximidad de una estufa a fin de evitar hipotermia causada por la anestesia.

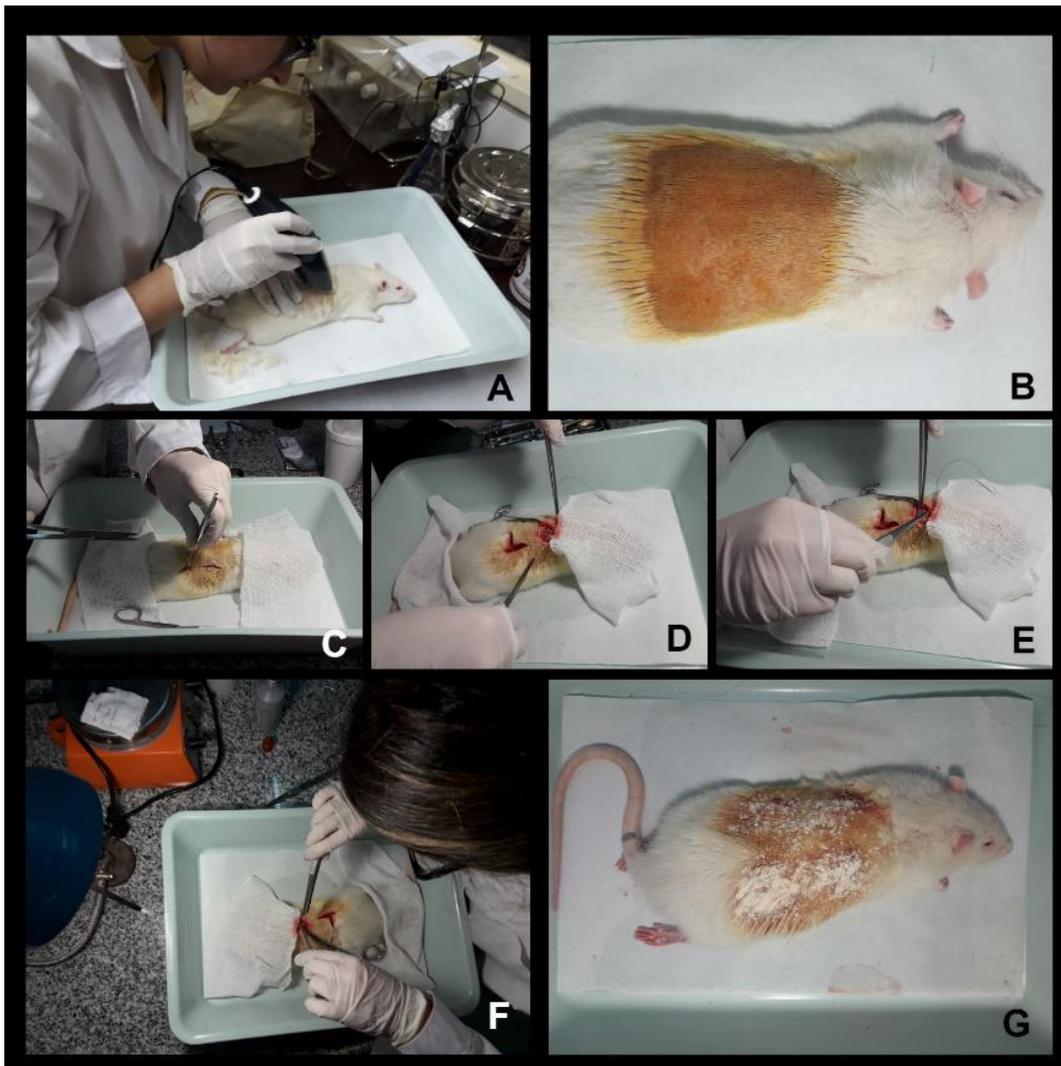


Figura 20. Intervención del animal siguiendo los lineamientos establecidos para la colocación de los andamios. (A, B) Limpieza, rasurado y desinfección. (C, D, E, F) Corte, colocación de andamios y sutura de los mismos. (G) Cierre de piel y uso de antiinflamatorio.

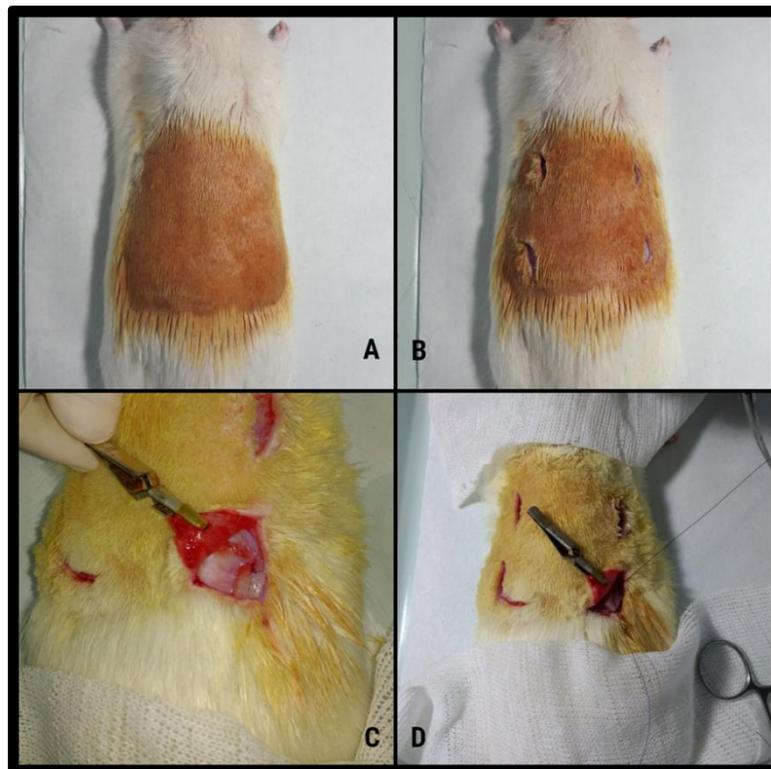


Figura 21. Implantación de andamios de colágeno. (A) Vista superior de la región a intervenir. (B) Vista de los cuatro cortes situados a los costados de la línea media dorsal. (C, D) Andamio suturado.

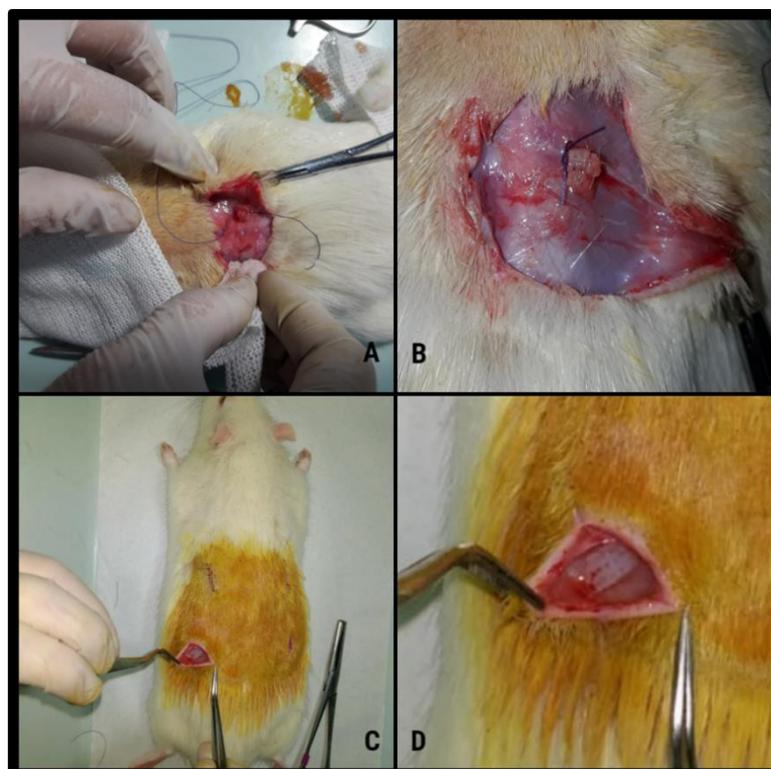


Figura 22. Implantación de andamios de colágeno. (A, B) Vista superior del andamio suturado. (C, D) Vista superior del bolsillo donde se coloca el andamio sin sutura.

3.15.7 Cuidados postoperatorios

Una vez efectuadas las cirugías, los animales fueron retirados para su correcta recuperación. Se envolvieron con paños de tela y fueron colocados en una habitación calefaccionada para mantener la temperatura del animal y contribuir a una rápida recuperación. Se mantuvieron aislados durante un tiempo hasta que cada animal recuperó sus capacidades motrices normales para ser devueltos a su jaula en el bioterio de la FCEFyN.

3.15.8 Registros de temperatura corporal, peso y estado general

Diariamente, luego de la intervención quirúrgica, se realizó una monitorización del estado general de los animales durante el período del ensayo. Se registró información sobre el peso con balanza de precisión (SF-400) y temperatura con termómetro digital impermeable (Dt11a), y se evaluó apariencia, comportamiento espontáneo y provocado (manipulación).

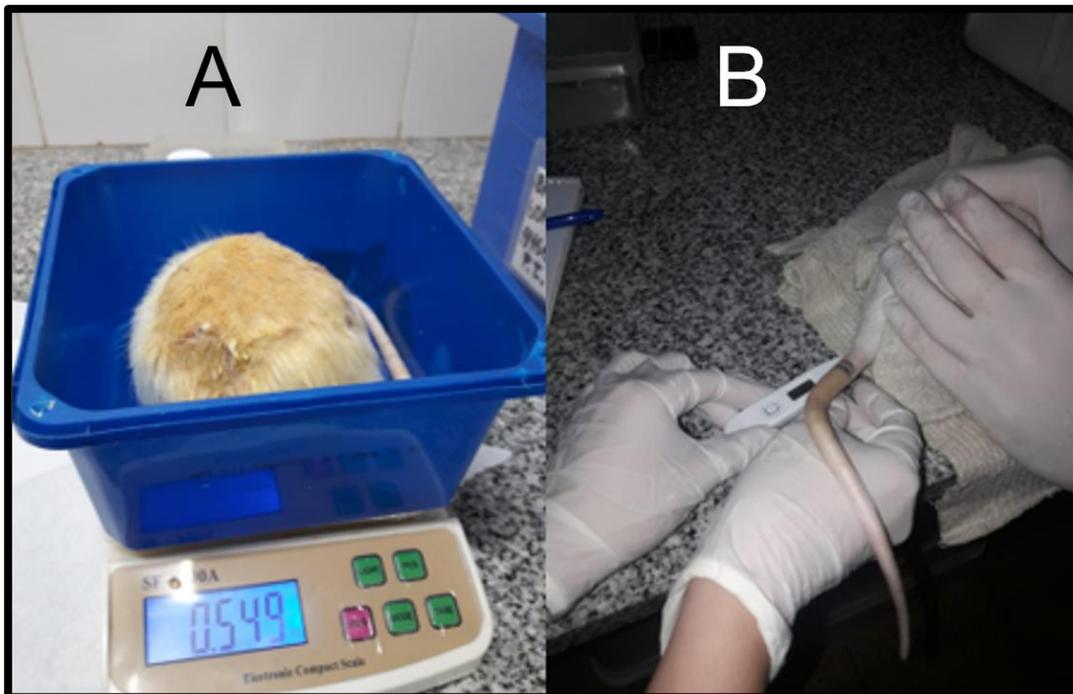


Figura 23. Registro de temperatura y peso de los animales. (A) Medición del peso en gramos del animal. (B) Toma de la temperatura rectal con termómetro digital.

Durante los primeros días, se realizó una valoración post quirúrgica del comportamiento de los animales mediante la utilización de un protocolo de supervisión propuesto por Wolfensonh y Lloyd (1994), modificado de acuerdo a los requerimientos de nuestro proyecto integrador. El mismo se puede apreciar en la siguiente tabla:

Fecha:	Animal:	Puntaje	1	2	4	5	6	7
Apariencia								
Normal	0							
Falta de acicalamiento (pelo en mal estado)	1							
Pelo en mal estado y/o secreciones oculares/nasales	2							
Pelo erizado, postura anormal	3							
Ingestión de agua y alimento/ Pérdida de peso								
Normal	0							
Incierta: pérdida de peso <al 5%	1							
Baja en el consumo: pérdida de peso 5 a 15%	2							
Pérdida de peso mayor al 15%	3							
Comportamiento espontáneo								
Normal, esperado	0							
Cambios menores respecto a lo esperado	1							
Poca movilidad y bajo estado de alerta, aislado del resto	2							
Vocalizaciones, automutilación, muy inquieto o muy deprimido	3							
Comportamiento provocado (manipulación)								
Normal	0							
Leve depresión o respuesta exagerada	1							
Cambio moderado en la respuesta esperada	2							
Reacciona violentamente o muy débil y precomatoso	3							
Ajuste de puntaje								
Si asignó '3' más de una vez, sume un punto extra por cada '3'	0-4							
Total	0-16							

Tabla 4. Valoración postquirúrgica [122].

El protocolo de supervisión tiene como objetivo identificar manifestaciones anómalas, tanto locales, como sistémicas y de comportamiento, que afecten al bienestar físico del animal. Ante la detección de estos eventos, los animales deben ser controlados con el fin de evitar que variables ajenas a los efectos locales producidos por el implante, influyan en los resultados del ensayo *in vivo*. Se puede apreciar en tabla 5 la puntuación utilizada para valorar el comportamiento post operatorio.

Puntaje	Acción recomendada
0-1	Normal
2-6	Monitorear cuidadosamente, considerar analgésicos
7-11	Sufrimiento, proporcionar alivio, observar regularmente. Buscar segunda opinión de cuidador o veterinario a cargo. Considerar eutanasia
12-16	Dolor severo. Eutanasia. Protocolo necesita ser re-evaluado.

Tabla 5. Escala de puntuación del comportamiento animal.

Otra forma de valoración post-quirúrgica utilizada en este proyecto integrador fue "The Rat Grimace Scale", la cual es un método para evaluar la ocurrencia o severidad del dolor experimentado por animales según la puntuación objetiva y ciega de las expresiones faciales. Los observadores asignan un puntaje a la presencia o prominencia de las "unidades faciales de acción" (FAU), por ejemplo, ajuste orbital, bulto nasal, posición de las orejas y cambios en las vibrisas, observando al animal directamente en tiempo real o post hoc desde fotografías o videos. La expresión facial de los animales a veces se conoce como la cara del dolor. En el Anexo 7.3 "Tabla de valoración del dolor desarrollada por NC3Rs" se presenta la tabla de valoración completa presentada por The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research.

3.15.9 Eutanasia

Una vez cumplidos los plazos designados para finalizar los ensayos de implantación (4 y 8 semanas respectivamente desde el día de cirugía), los animales fueron sometidos a eutanasia para extraer de ellos el material implantado.

Para ello, los animales fueron inyectados con hidrato de cloral al 6%, en dosis de eutanasia 0,9 ml/ 100 g de peso corporal del animal. Una vez corroborado el deceso de los animales, se afeitó y esterilizó la zona a intervenir, se diseccionó la piel y se extrajeron los restos de las estructuras implantadas con un borde de tejido local circundante.

De esta manera, se pudieron obtener varias muestras de cada animal que se clasificaron en dos grupos a estudiar [123]:

- Tejido local del animal con los andamios ensayados: cortes transversales y longitudinales.
- Control negativo: tejido local del animal con esponja de colágeno comercial marca Helistat.

Los resultados del ensayo de implantación fueron evaluados luego de la aplicación de un procedimiento para obtener preparados histológicos y la captura de diversas imágenes con microscopía óptica.

3.15.10 Histología

Dichos tejidos fueron fijados con una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 horas, seccionados de manera longitudinal y transversal, y luego fueron colocados en cassetes con su correspondiente identificación y rotulado. Posteriormente, fueron llevados al Laboratorio de Procesamiento Histológico ubicado en el Instituto Oulton de la ciudad de Córdoba, Argentina. Allí fueron procesados de acuerdo a técnicas histológicas y se obtuvieron distintos cortes

tratados con tinción Hematoxilina-Eosina (HE). Dichos resultados se presentan más adelante.

3.15.11 Microscopía Óptica

Los cortes histológicos obtenidos del ensayo de implantación fueron analizados a través del microscopio óptico Leica DM500 perteneciente al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) CONICET, UNC. Se obtuvieron imágenes usando distintas magnificaciones (X4, X10 y X40), las cuales fueron utilizadas para evaluar la respuesta tisular provocada por la implantación de los andamios durante el desarrollo del proyecto.

3.16 Presentación de Resultados y Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar asociado. Los datos que requirieron de análisis estadísticos fueron sometidos a un análisis ANOVA de una vía con el software GraphPad Prism. A continuación, se realizó un test de comparaciones múltiples Newman – Keuls. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ representa una diferencia significativa entre los valores de las medias y permite analizar las diferencias entre distintos métodos. El número de muestras utilizadas se indicó en las figuras y tablas correspondientes.

4. Resultados y Discusión

4.1 Obtención de tinta e impresión 3D de andamios basados en colágeno de piel porcina

En la figura 24, se muestra el resultado de la aplicación del procedimiento no enzimático de extracción y purificación de colágeno insoluble tipo I a partir de piel porcina, a través de una serie de tratamientos con ácidos y sales, tal como se mencionó en el apartado 3.1 “Aplicación del protocolo de extracción y purificación de colágeno”.



Figura 24. Obtención de tinta e impresión 3D de andamios basados en colágeno de piel porcina (A) Tinta obtenida luego del procesado, liofilizado, seccionado, tamizado e hidratación con ácido acético del colágeno extraído y purificado. (B) Andamios de colágeno impresos 3D de manera seriada. (C) Imágenes de andamios de colágeno obtenidas con lupa X10 para procesar con software ImageJ en posterior medición de hebras y poros.

Macroscópicamente, pudo observarse una coloración homogénea, sin presencia de granulaciones ni restos residuales de materiales externos, con una viscosidad e imprimibilidad adecuada. No fue necesario aplicar modificaciones en la tinta ya que durante la impresión se distinguió un excelente comportamiento del material, lo cual permitió que la misma fuera de manera seriada, permitiendo depositar hebras de material siguiendo los lineamientos del diseño CAD planteado. A su vez, presentó la resistencia necesaria para mantener la estructura de los andamios sobre el eje Z.

4.2 Comportamiento estructural de los andamios al ser sometidos a distintos procesos

En la figura 25, se muestran imágenes de los andamios impresos sometidos a diferentes procesos: liofilización, inmersión en medio de cultivo, hidratación con PBS y luego del cultivo durante 7 días con línea celular Vero.

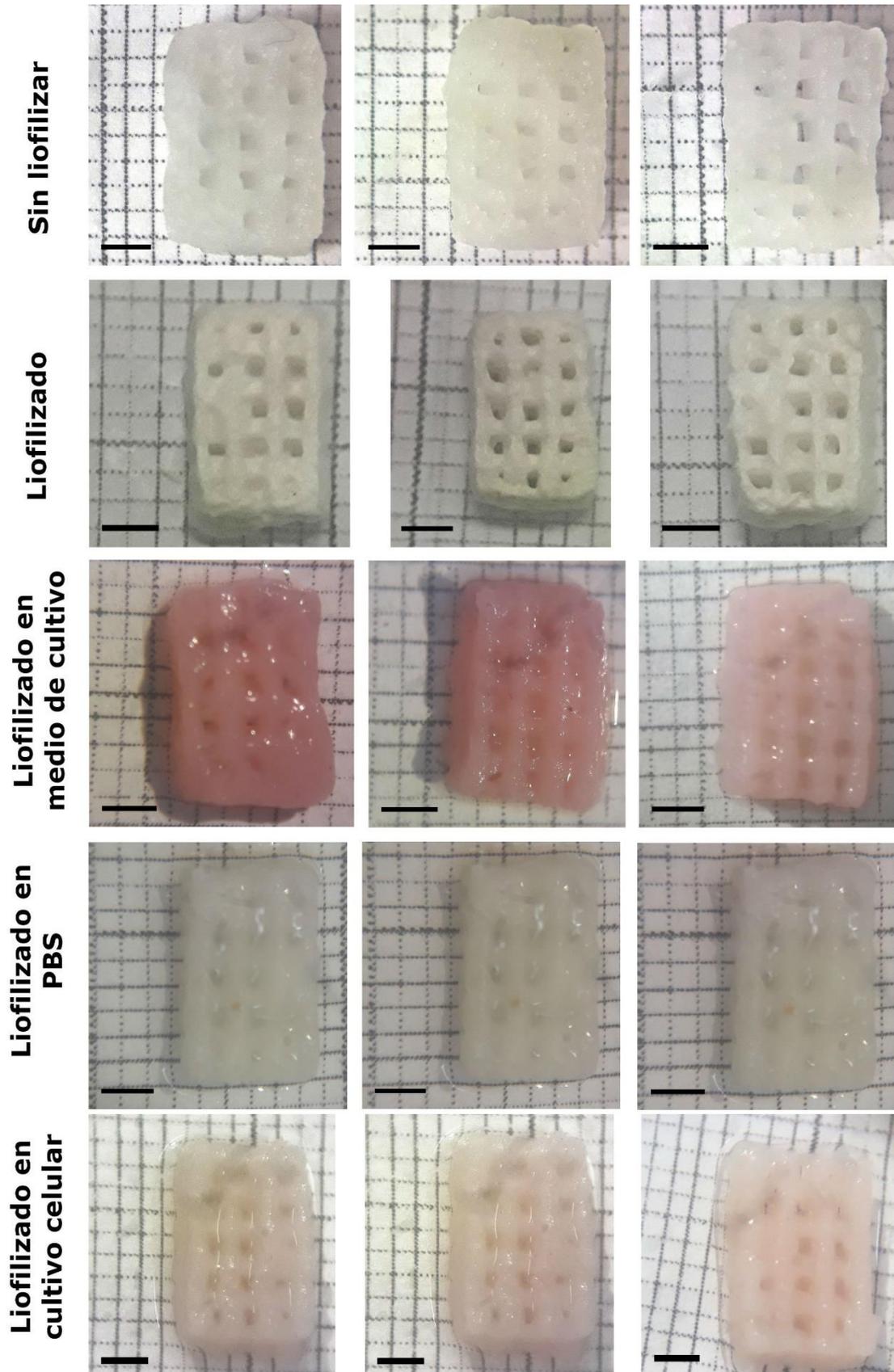


Figura 25. Imágenes de los andamios magnificados con lupa X10, en los diferentes procesos mencionados. Barra: 2 mm.

Macroscópicamente se pudo identificar que el proceso de liofilizado, la inmersión en medio de cultivo, la hidratación en PBS y la incubación con células Vero, no afectaron la morfología de la estructura impresa. Tampoco se evidenciaron cambios estructurales con respecto al diseño CAD implementado, y fue posible la identificación de los macroporos y hebras especialmente diseñados de acuerdo al modelo en forma de rejilla.

Existen varias investigaciones [124, 125, 126] que reportaron al colágeno como un material particularmente difícil para la construcción de finas estructuras, debido a su baja viscosidad y su hidrofiliidad. Es por ello, que concluimos que el proceso de liofilizado permitió mantener la arquitectura del andamio, brindando un tamaño de poro adecuado para la neovascularización y proliferación celular; e incrementó la estabilidad estructural de los mismos, logrando así, una actuación adecuada en los distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados.

4.3 Dimensiones de los andamios con el diseño para implantación

A continuación, se presenta un análisis comparativo de las dimensiones obtenidas de los andamios impresos, antes del proceso de liofilizado, luego de dicho proceso, posterior a la inmersión de los mismos en distintos medios que simulan condiciones fisiológicas y luego de cultivo celular durante 7 días.

La cantidad de muestras utilizadas para las mediciones fueron diferentes en cada uno de los procesos; en el caso de los andamios sin liofilizar se empleó un n=36, los liofilizados un n=11, los que fueron inmersos en medio de cultivo un n=2, los hidratados con PBS un n=3 y los tratados con células cultivadas un n=3.

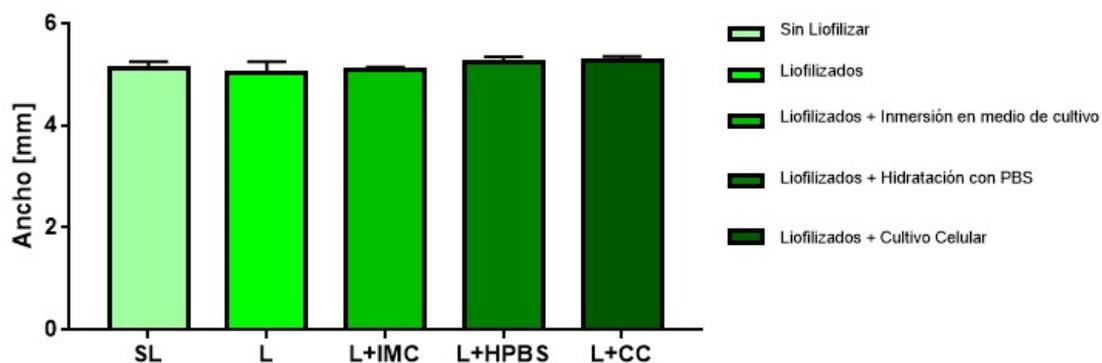


Figura 26. Ancho de los andamios (media ± error estándar asociado) sometidos a diferentes procesos.

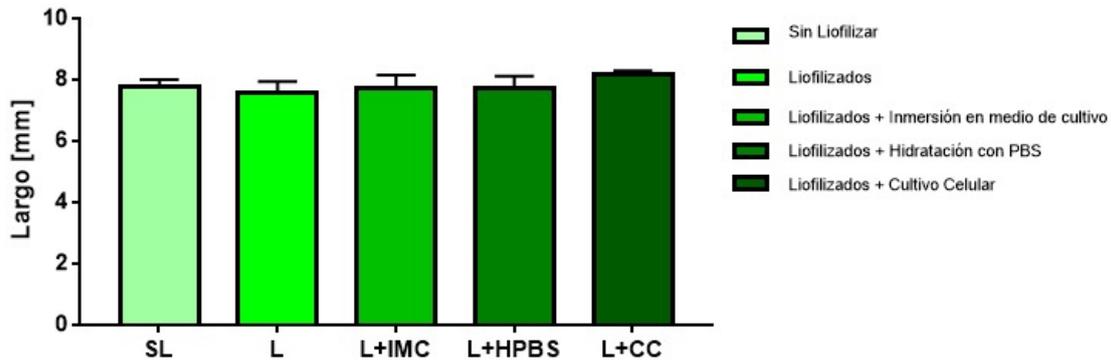


Figura 27. Largo de los andamios (media \pm error estándar asociado) sometidos a diferentes procesos.

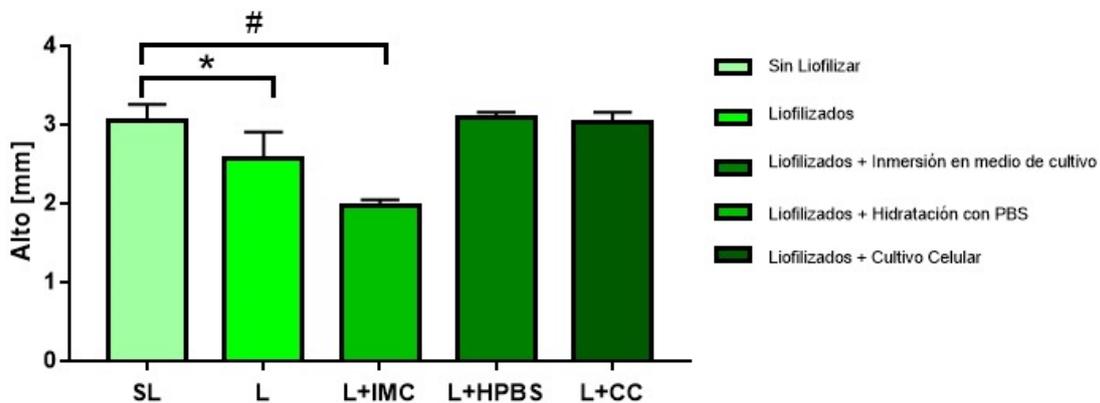


Figura 28. Alto de los andamios (media \pm error estándar asociado) durante las diferentes etapas de procesado. * Andamios de colágeno liofilizados significativamente diferentes ($P < 0.0001$) de los sin liofilizar. # Andamios de colágeno liofilizados e inmersos en medio de cultivo significativamente diferentes ($P < 0.0001$) de los sin liofilizar.

Las mediciones obtenidas indicaron que el ancho y el largo de los andamios ($p > 0,05$) no sufrieron modificaciones significativas durante la aplicación de los diferentes procesos. Sin embargo, como se observa en figura 28, existieron diferencias significativas en el alto ($p < 0,0001$) luego de los procesos de liofilizado e inmersión en medio de cultivo. Inferimos que estos resultados se deben a que el proceso de liofilizado produjo un colapso en la estructura a nivel del eje Z; caracterizado por una contracción meramente relacionada al proceso de secado. A su vez, la reducción de la altura de los andamios inmersos en medio de cultivo podría deberse a una solubilización. Por otro lado, pudo apreciarse que los andamios sometidos al proceso de liofilización, y posteriormente hidratados con PBS o cultivados con línea celular, recuperaron sus dimensiones originales, sin evidenciarse cambios morfológicos.

Respecto a las dimensiones de las hebras y poros que conforman la estructura macroscópica, se obtuvieron mediciones a través del software

ImageJ, y se procedió a analizar los resultados obtenidos. Éstos se pueden apreciar en las figuras 29 y 30:

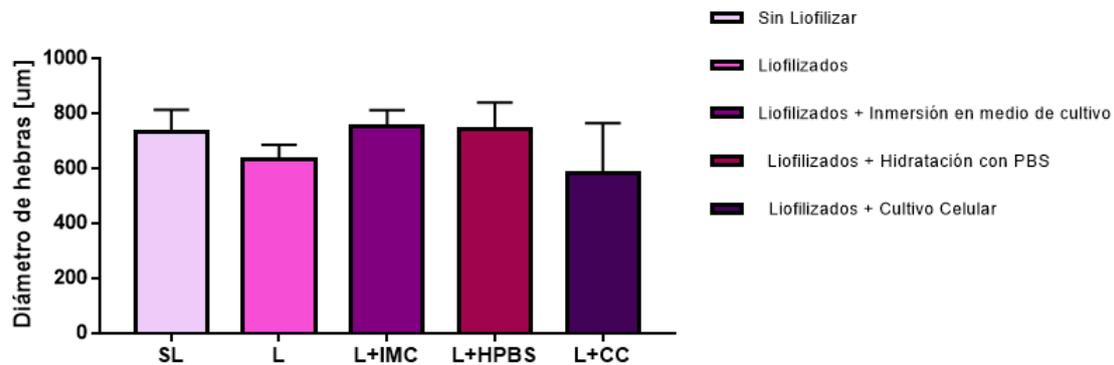


Figura 29. Diámetro de hebras que conforman la estructura del andamio (media \pm error estándar asociado).

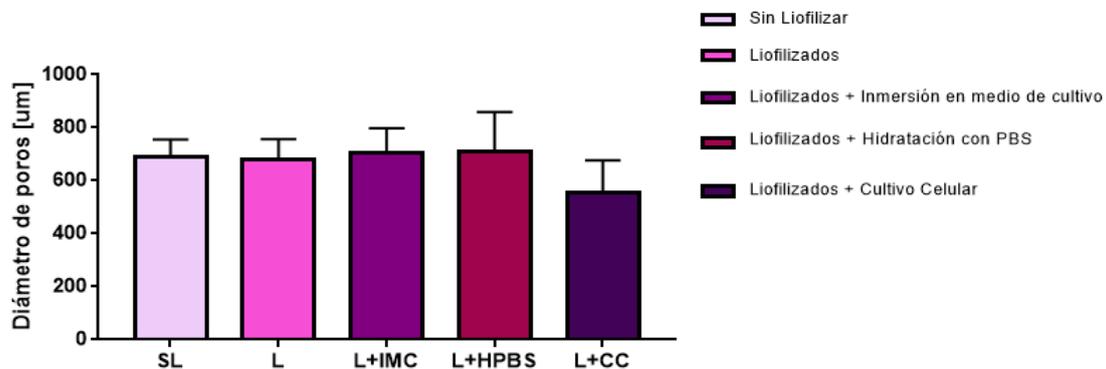


Figura 30. Diámetro de poros que conforman la estructura del andamio (media \pm error estándar asociado).

De acuerdo a resultados obtenidos, se evidenció un diámetro medio de hebras de $687,93 \pm 67,44 \mu\text{m}$ y de poros de $668,86 \pm 56,76 \mu\text{m}$.

Los resultados demostraron que no hubo diferencias de gran magnitud en el tamaño de los macroporos en los andamios impresos sometidos a distintos procesos, como así tampoco, en el caso de las hebras, tal como puede observarse en figuras 30 y 29, respectivamente.

El tamaño medio de poro y la distribución de los mismos son aspectos esenciales en la construcción de andamios para aplicaciones de IT. Si los poros son celdas demasiado pequeñas, las células no pueden migrar hacia el centro de la estructura, lo cual restringe la difusión de nutrientes y eliminación de productos de desecho, perjudicando a una unión eficaz de un número crítico de células [27, 28].

Por el contrario, si son demasiado grandes, hay una disminución en el área de superficie específica que limita la fijación de las células a las celdas [28]. Es importante que los andamios mantengan su estructura porosa, durante un

período de tiempo, para permitir la interacción con el tejido vivo, sin alterar las funciones celulares, y a su vez lograr la integración y posterior degradación en el mismo.

Los valores de diámetro de poro obtenidos se asemejan a resultados de reportes publicados [127, 128, 129]; donde varios autores coinciden que, para lograr vascularización y penetración celular, se necesitan poros con dimensiones mayores a las 300 μm . Sin embargo, la relación entre el tamaño de poro del andamio y la actividad celular es poco conocida y como resultado existen discrepancias dentro de la literatura acerca del tamaño del poro óptimo requerido en la utilización de andamios en distintas aplicaciones de la IT.

Por otro lado, estos resultados evidenciaron una permeabilidad e interconexión entre los poros de los andamios fabricados por impresión 3D. La permeabilidad y la movilidad de fluidos a través de materiales porosos son dos propiedades intrínsecas que describen la relativa facilidad con que los fluidos pueden secretar a través de materiales celulares, lo cual juega un papel significativo en el transporte de nutrientes y residuos dentro de la estructura de los andamios en contacto con los tejidos vivos.

En los apartados Anexos 7.4, 7.5, 7.6, 7.7 y 7.8 se muestran los resultados obtenidos de las mediciones del ancho, largo y alto de los andamios durante los distintos procesos a los que fueron sometidos.

4.4 Evaluación de los andamios mediante Microscopía Confocal

Con el fin de observar a un mayor aumento la estructura superficial de los andamios de colágeno impresos 3D, y realizar una evaluación cualitativa del material y la estructura impresa, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal, las cuales se detallan en la figura 31:

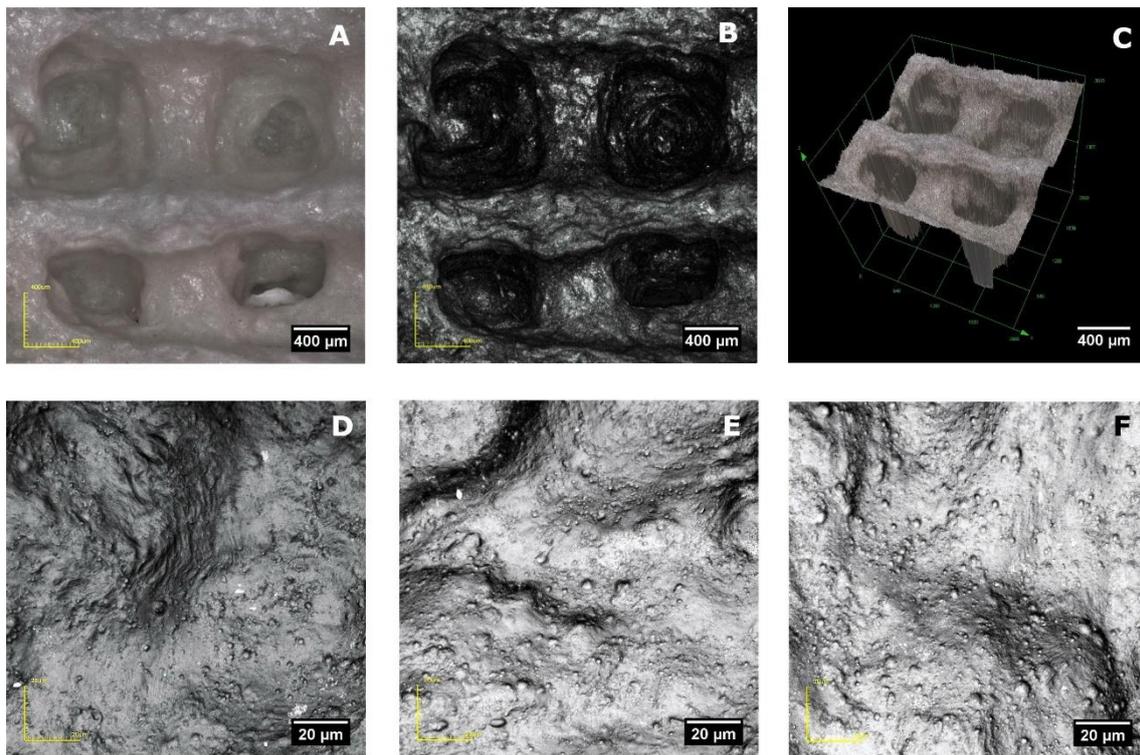


Figura 31. (A) Imagen a color de una región de la superficie del andamio con aumento X108. (B) Imagen láser de la misma región observada con aumento X108. (C) Región observada en 3 dimensiones. (D, E, F) Imágenes láser de diferentes regiones superficiales del andamio con un aumento X2132.

Los resultados obtenidos mostraron a la estructura reticulada con sus macroporos y hebras correspondientes. Fue posible observar su superficie porosa, con una distribución irregular de los poros en diversos tamaños y arreglos, la cual era esperable considerando el método de fabricación de andamios utilizado en este proyecto integrador.

De acuerdo a bibliografía presentada [4], en la fabricación de andamios se deben considerar varios aspectos fundamentales, uno de ellos, es la geometría empleada por la estructura que permita direccionar la regeneración tisular, o la generación de nuevo tejido, así como de sistemas de vascularización y aquellos que permiten el intercambio tanto de fluidos como de nutrientes biológicos y desechos celulares. Para ello, deben asegurarse estructuras porosas, con una interconectividad asegurada en las mismas.

De acuerdo a la valoración realizada, pudimos inferir que los andamios de colágeno impresos 3D desarrollados en este proyecto integrador, mediante bioimpresión por extrusión, presentaron una correspondencia con el diseño de fabricación planteado. Éstos mostraron una distribución, forma y tamaño de poros que nos permitió inferir la posible adhesión, migración e infiltración celular en el interior y superficie de los mismos.

De esta manera, los andamios mostraron características estructurales que se corresponden con los lineamientos de fabricación planteados. Posteriormente, la microestructura resultante fue avalada mediante microscopía electrónica de barrido como se detallará en la próxima sección.

4.5 Observación de los andamios mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Las propiedades de una MEC están asociadas con la estructura. La macroestructura se define como una escala que refleja su geometría externa y en gran porcentaje su estructura interna. Mientras que la microestructura debe promover la estabilidad mecánica y la permeabilidad del material, necesarias para la actividad celular y regeneración del tejido, la macroestructura del material está determinada por la interconectividad de los macroporos [21].

En investigaciones previas [92] se identificaron poblaciones de poros con tamaños entre 50 y 500 μm , y microporos con diámetros inferiores a 10 μm . La microporosidad se define comúnmente como la presencia de poros con diámetros inferiores a 10 μm , y estos microporos a menudo son necesarios para la unión y movilidad de las células, que son cruciales para la penetración del andamio [130, 25].

Es por ello, que se utilizó un microscopio electrónico de barrido SEM para analizar la superficie de los andamios impresos y poder observar los tamaños de fibras y microporos que componen el material en estudio. Estos pueden observarse en la figura 32:

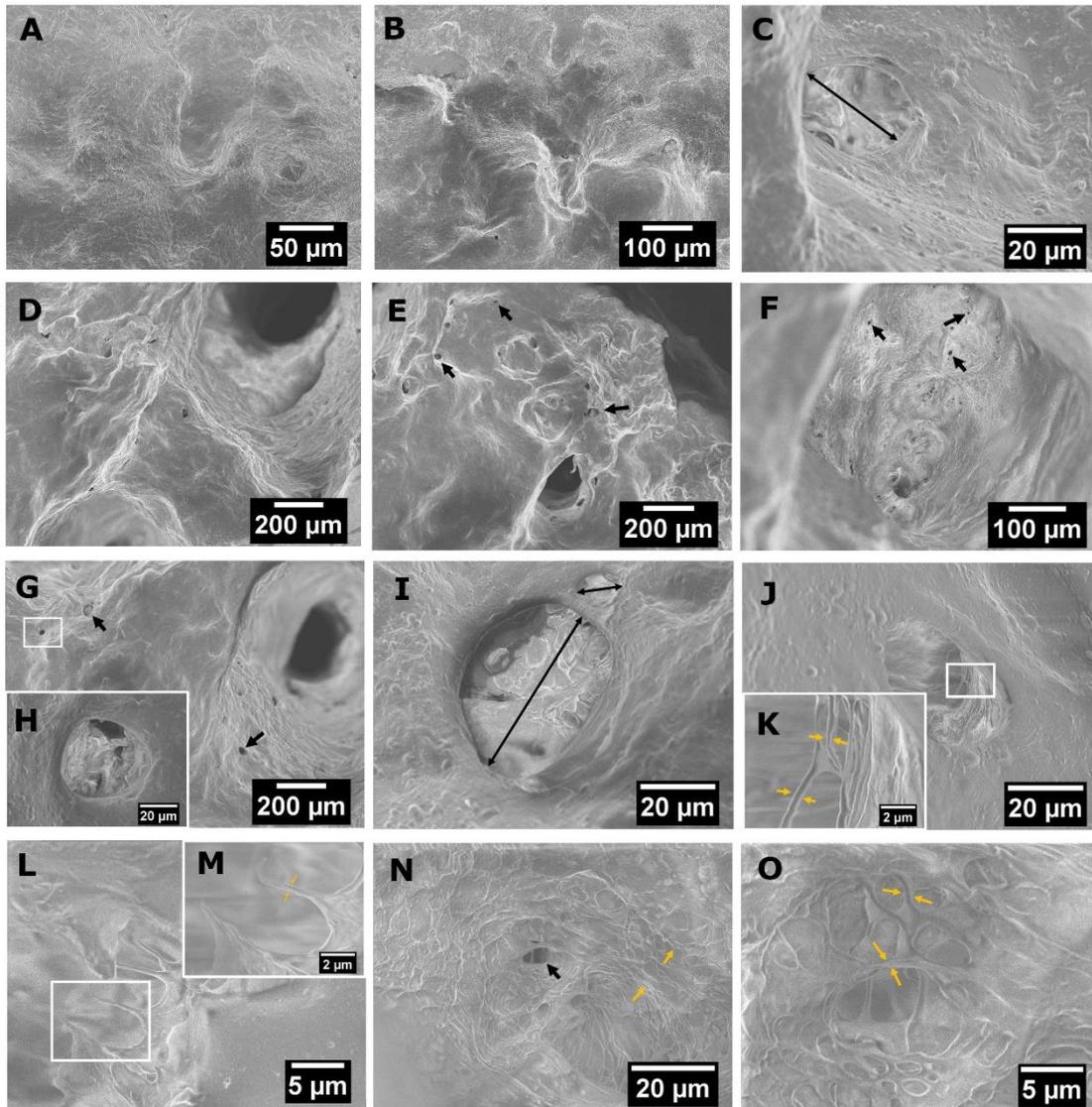


Figura 32. Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido. (A, B) Superficie del andamio, A X392 y B x173. (J, K, L, M, N, O) Representación de población de fibras: J 1,230X, K 11,430X, L 3,490X, M 11,190X, N 1,350X, O 2,880X. (C,D,E,F,G,H,I) Representación de población de microporos: C 1,230X, D 83X, E 83X, F 185 X, G 83X, H 1,230X, I 1,230X. Flechas negras indican poblaciones de microporos. Flechas amarillas indican poblaciones de fibras.

En las imágenes obtenidas a diferentes aumentos, se pudo apreciar la superficie porosa del andamio, la cual presentó un patrón y distribución irregular de poros, y se evidenció su topografía, formada por un “ramillete” de fibras, microporos y poros de mayor tamaño, que corresponden a los diseñados en la impresión 3D. La tabla 6 muestra los valores obtenidos:

	Fibras [nm]		Microporos [μ m]		
Aumento	2,41k a 2,91k X	11,19k a 13,40k X	35,15k a 48,47k X	83 a 185 X	1,23k a 5,65k X
Media	411,01	170,09	81,4	28,1	21,94
Desvío	0,05	0,04	0,03	20,31	15,41
Error Estándar Asociado	0,01	0,01	0,01	3,21	2,86
Mínimo	194,49	74,11	33,53	7,68	44,72
Máximo	600,34	308,36	149,65	57,55	57,55

Tabla 6. Diámetro de las fibras y microporos medidos con el software ImageJ, en diferentes aumentos analizados.

Se han reportado estudios con andamios de colágeno y GAGs usados en regeneración de piel, los cuales mostraron inactividad cuando el diámetro del poro promedio estaba por debajo de 20 μ m o superior a 120 μ m [131].

Los resultados de las mediciones de las fibras y microporos señalaron que el material respondió a los lineamientos previos establecidos para la fabricación de andamios. Referidos a la porosidad, los tamaños de poro obtenidos entre 7,68 y 57,55 μ m permitirían una adhesión celular como así también una infiltración de las mismas al material, dichos valores se asemejan a los obtenidos por Figueroa et. al. [132], quienes fabricaron una tinta que permitió obtener un tamaño de poro entre 20 y 150 μ m.

4.6 Ensayo de solubilización en medio de cultivo a 37°C

Considerando que la utilidad de los andamios en aplicaciones biomédicas consiste en que estos estén en contacto con tejido vivo, se realizó este ensayo para poder evaluar como las condiciones fisiológicas influyen sobre ellos, y además, para conocer la estabilidad de los constructos en fluidos fisiológicos a 37°C.

Para analizar el efecto del medio de cultivo sobre los andamios, se registraron los pesos antes y después de la inmersión. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Andamio	Peso inicial [mg]	Peso final [mg]	% solubilización
1	8,90	5,50	38,20
2	8,80	5,40	44,90
Media	8,85	5,45	41,55
Desvío Estándar	0,07	0,07	4,74
Error Estándar Asociado	0,05	0,05	3,35
Resultado			41,55\pm3,35

Tabla 7. Pesos secos y húmedos de los andamios sometidos a ensayo y el porcentaje de solubilización de los mismos.

Como puede observarse, las estructuras sufrieron una solubilización del 41,55 \pm 3,35% al ser incubados una semana. Resultados obtenidos en proyectos integradores anteriores [95], mostraron valores de solubilización más bajos, pero

los andamios ensayados sólo fueron sometidos a un periodo de ensayo de 72 horas. Esto podría explicar la disminución en altura que sufrieron los andamios durante el ensayo, como fue mencionado en el apartado 4.3 “Dimensiones de los andamios con el diseño para implantación”.

4.7 Análisis del hinchamiento

El porcentaje de hinchamiento o captación de agua es un factor clave en la fabricación de andamios, ya que representa la capacidad de retener los nutrientes para acelerar la infiltración y proliferación celular, así como para transferir los metabolitos a través del andamio, y además puede afectar el proceso de diferenciación celular [133].

Se presentan en tabla 8 los valores obtenidos del análisis de hinchamiento para las muestras sometidas a ensayo:

Andamio	Peso inicial [mg]	Peso final [mg]	% hinchamiento
1	22,21	123,25	1099,94
2	9,29	105,95	1140,50
3	11,71	125,05	1067,92
Media	14,40	118,08	1102,79
Desvío Estándar	6,87	10,55	36,30
Error Estándar Asociado	3,97	6,09	20,96
Resultado			1102,79±20,96

Tabla 8. Medición de los pesos secos e húmedos de los andamios ensayados, y el porcentaje de hinchamiento de los mismos.

Los resultados obtenidos mostraron un porcentaje de hinchamiento medio de $1102,79 \pm 20,96\%$, el cual se encuentra dentro del rango determinado en trabajos previos realizados en el laboratorio [92, 93]. Otros autores han informado porcentajes de hinchamiento para muestras de colágeno con valores entre 1000-1700% [94, 134, 135].

4.8 Ensayo de porosidad

Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 9:

Andamio	Peso inicial [mg]	Peso final [mg]	% porosidad
1	11,10	93,70	91,93
2	11,20	86,30	91,12
Media	11,15	90,00	91,53
Desvío Estándar	0,07	5,23	0,57
Error Estándar Asociado	0,05	3,70	0,41
Resultado			91,53±0,41

Tabla 9. Pesos secos y húmedos de los andamios sometidos a ensayo de porosidad, y el porcentaje resultante de los mismos.

De acuerdo a la bibliografía [136, 137], una porosidad del orden del 90% denota una alta relación superficie/volumen de los andamios, que los vuelve eficaces para un posterior cultivo celular. Chan et al. [127] informaron que andamios de colágeno con una porosidad del 74,4% que permitieron neovascularización.

Los resultados obtenidos en este proyecto integrador evidenciaron una porosidad del $91,53 \pm 0,41\%$, que supera a lo reportado por investigaciones similares [93, 92]. Por lo tanto, se logró obtener un andamio de colágeno con porosidad óptima para la neovascularización e infiltración celular, que pudo evidenciarse en el apartado 4.12 “Ensayo *in vivo*: implantación subcutánea de andamios en modelo animal rata Wistar”.

4.9 Ensayo de Citotoxicidad

Se analizó la citotoxicidad de los andamios hacia células Vero de forma indirecta utilizando extractos de los mismos de acuerdo a normativa correspondiente [106].

Los resultados se muestran en figura 33:

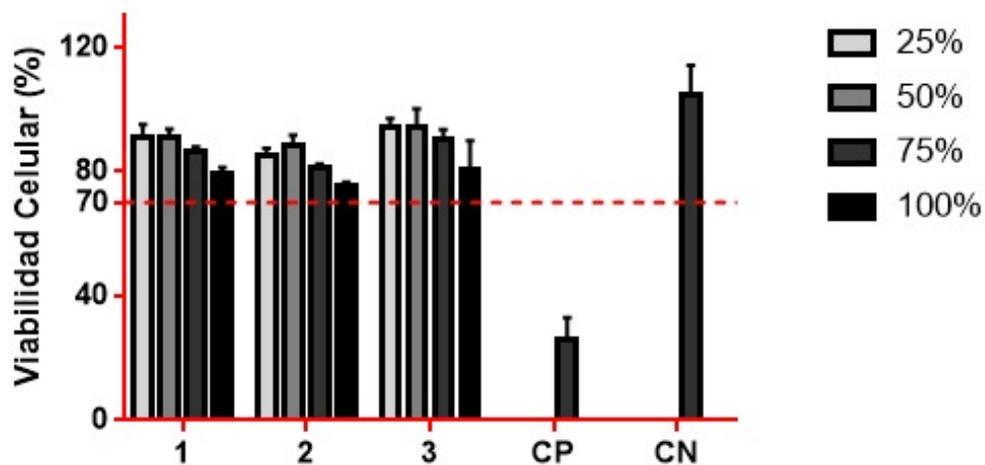


Figura 33. Viabilidad de células Vero crecidas en presencia de los extractos de colágeno luego de 24 horas de cultivo. CN: Control Negativa. CP: Control Positivo.

Objeto de ensayo	Viabilidad Celular
Muestra	>70%
Control Positivo	<50%

Tabla 10. Porcentajes de viabilidad celular que deben presentar la muestra ensayada y el control positivo.

Bajo las condiciones de ensayo establecidas anteriormente, los andamios de colágeno de piel porcina no evidenciaron signos de citotoxicidad, ya que todas las concentraciones de extracto ensayadas por triplicado indicaron una viabilidad celular mayor al 70% según lo estipulado por norma [106].

Los resultados obtenidos validaron la utilización de los andamios para la posterior implantación *in vivo* y realización de otros ensayos.

4.10 Ensayo de Hemocompatibilidad

4.10.1 Evaluación de la Morfología de Glóbulos Blancos

La tabla 11 indica el recuento de las células sanguíneas expuestas a las muestras de colágeno y los controles durante la realización del ensayo:

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Control Negativo	Controles Positivos
Linfocitos	51,33±5,6	42,50±2,64	46,50±3,53	52,33±9,07	8,00±1,00
Neutrófilos	34,00±2,31	31,25±5,03	40,00±1,41	31,33±14,01	0
Monocitos	5,00±2,00	5,00±1,00	5,00±2,00	5,00±3,00	4,00±2,00
Eosinófilos	2,00±1,00	2,12±0,57	2,50±3,53	1,67±1,53	0
Célula no Identificada	3,00±2,00	4,00±2,0	6,00±2,00	5,00±2,00	88,00±2,00

Tabla 11. Recuento diferencial de glóbulos blancos en las muestras de colágeno (muestra 1, 2 y 3), el control negativo y los controles positivos.

En los controles positivos se observaron linfocitos y monocitos con abundantes alteraciones citoplasmáticas y nucleares. Se evidenció un porcentaje alto de células rotas y detritos celulares. Por el contrario, no se observaron cambios morfológicos en las células de las muestras y del control negativo en las poblaciones de linfocitos y monocitos habitualmente encontradas. Sin embargo, se encontró una cantidad de células no identificadas, que por los cambios morfológicos descritos no se pudieron catalogar en las poblaciones analizadas.

En la figura 34, se muestran los frotis de células sanguíneas expuestas al andamio de colágeno y a los controles correspondientes:

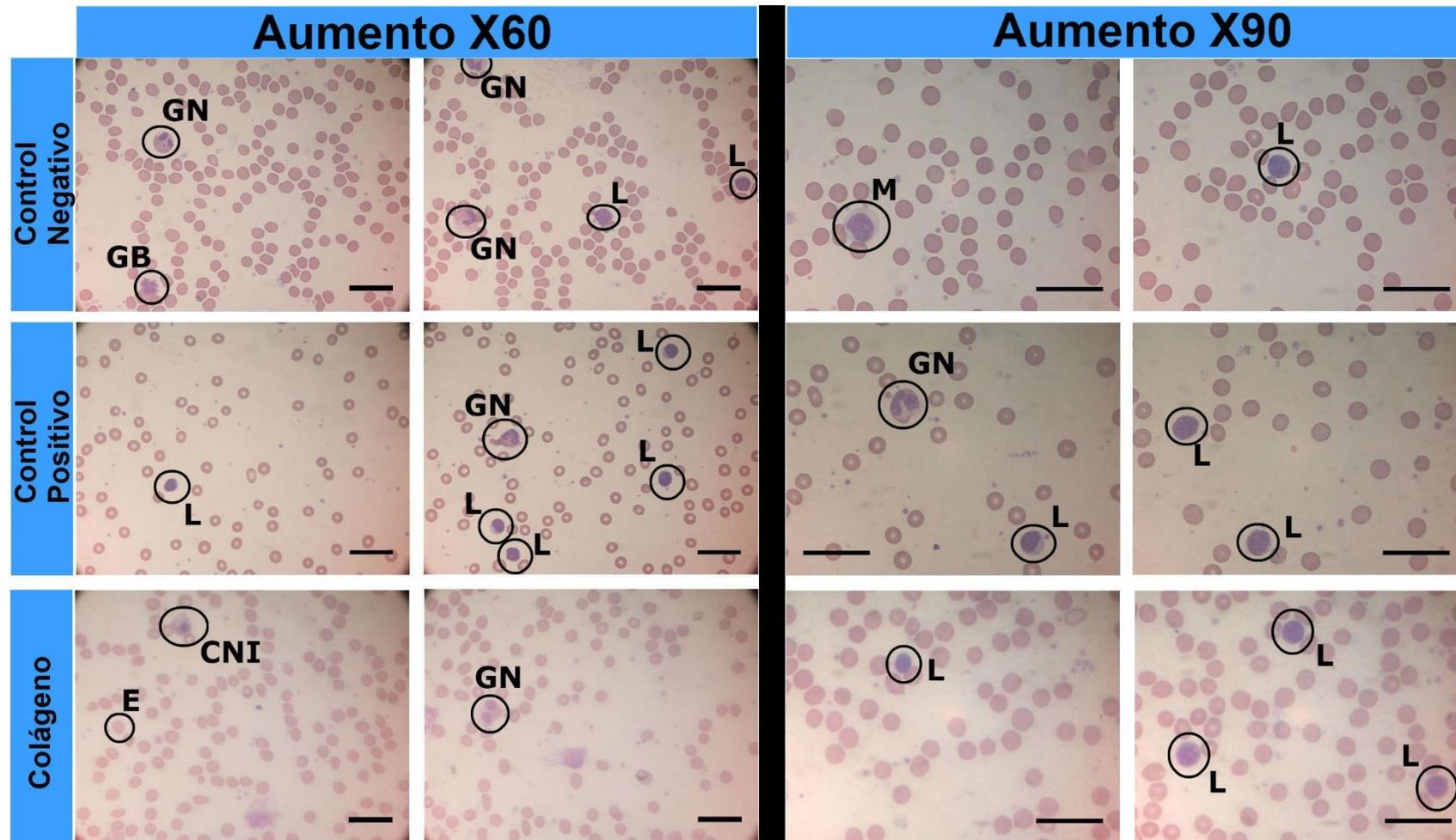


Figura 34. Microscopía óptica de frotis sanguíneos teñidos con Maygrunwald-Giemsa. Donde se resaltan los siguientes tipos celulares: (L) Linfocitos. (GE) Granulocitos Eosinófilos. (GN) Granulocitos Neutrófilos. (GB) Granulocitos Basófilos. (E) Eritrocitos. (M) Monocito. Barra: 15 μ m.

Bajo las condiciones de ensayo mencionadas, el recuento diferencial de los glóbulos blancos en presencia del material fue similar al del control negativo. No se observaron cambios morfológicos significativos de glóbulos blancos en contacto directo con el material.

4.10.2 Evaluación de Hemólisis *in vitro* por contacto indirecto

La tabla 12 muestra los resultados de absorbancias medidas durante el ensayo de hemólisis:

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Control Positivo	Control Negativo	Blanco
Absorbancias Promedio	0,05087	0,04806	0,05041	0,3086	0,0541	0,0513
Desviación Estándar	0,00119	0,0009	0,00598	0,0143	0,0067	0,0009
Error Estándar Asociado	0,00069	0,00052	0,00345	0,0083	0,0039	0,0005
Índice Hemolítico %	0	0	0	100	0	0

Tabla 12. Índice hemolítico de las muestras de colágeno, control positivo y control negativo.

Bajo las condiciones de ensayo mencionadas los extractos de los productos ensayados fueron no hemolíticos, presentando un índice de hemólisis igual a 0%.

4.11 Andamios de colágeno como soportes para la adhesión y crecimiento de células Vero

El colorante fluorescente DAPI pertenece al grupo de los colorantes de indol. Se usa para la tinción de ADN, tinción nuclear, tinción de células vivas, contratinción en tinciones inmunofluorescentes de material humano y botánico, y en citometría de flujo [138].

Se analizó la capacidad de las células Vero para adherirse a la superficie de los compuestos andamios de colágeno a través de microscopía de fluorescencia. La tinción con DAPI muestra que las células Vero fueron capaces de unirse y proliferar sobre la superficie de andamio (Figura 35).

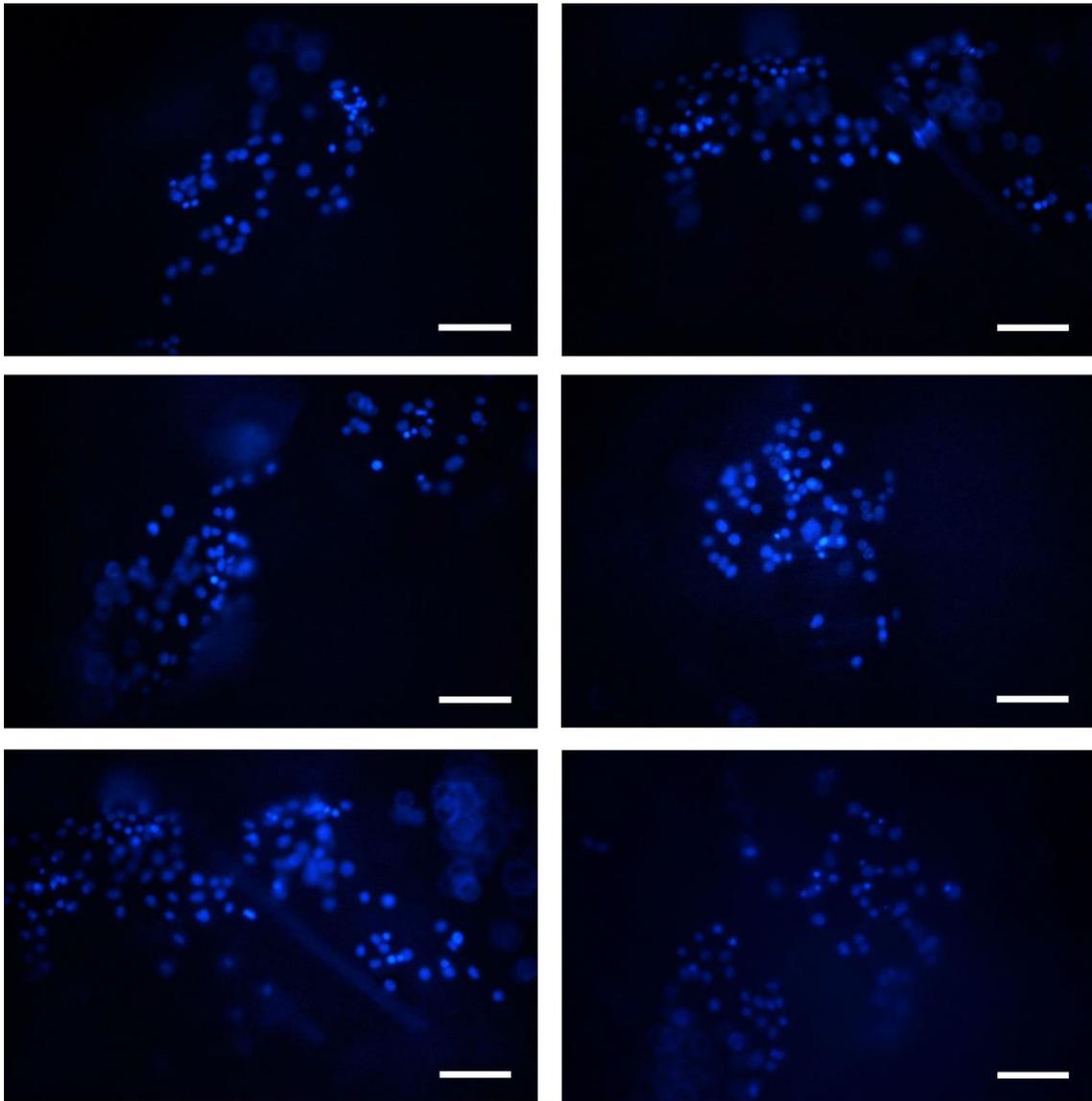


Figura 35. Microscopía de fluorescencia de células Vero luego de 7 días de cultivo sobre la superficie de los andamios teñidos con DAPI. Barra: 100 μ m.

En las imágenes se pudo apreciar conjuntos de núcleos celulares de una coloración azul más clara, debido a que los mismos se encontraron en otros planos. Esto puede ser debido a la porosidad del material y disposición de las fibras que permitieron que ingresaran a la microestructura y pudieran adherirse a las paredes a través de toda la estructura del mismo. Estos resultados mostraron que los andamios de colágeno sirvieron como sustrato para la adhesión y proliferación de células Vero durante el tiempo que duró el ensayo.

4.12 Ensayo *in vivo*: implantación subcutánea de andamios en modelo animal rata Wistar

4.12.1 Registros de temperatura corporal, peso y estado general de los animales ensayados

Se realizó un registro de los parámetros fisiológicos de los animales, como el peso, la temperatura y una inspección visual del estado físico y comportamental de los mismos. Los animales en general pueden perder peso después de la cirugía, pero con analgesia adecuada y la provisión de alimentos, se recuperan rápidamente [114].

Siguiendo los lineamientos establecidos en el apartado 3.15.8 “Registros de temperatura corporal, peso y estado general”, los resultados que se obtuvieron se muestran a continuación:

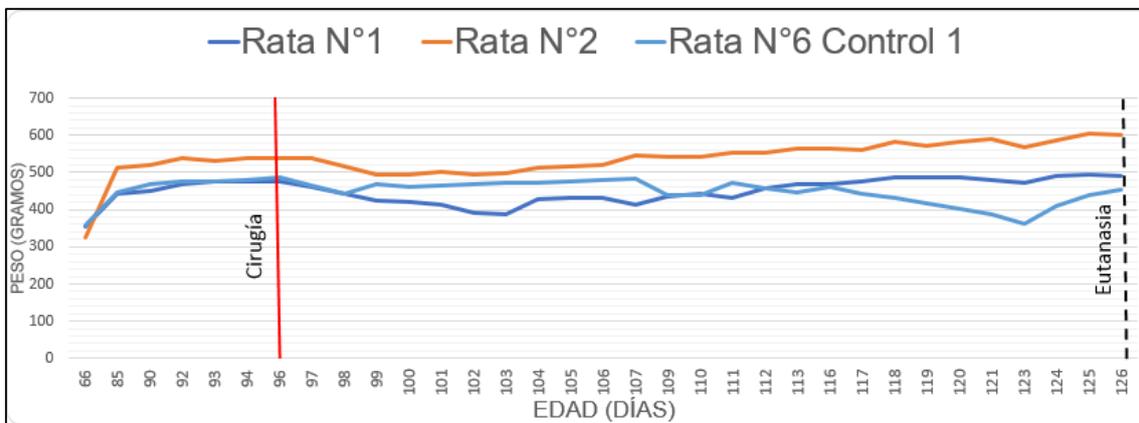


Figura 36. Pesos [g] de las ratas n°1, 2 (experimentales) y 6 (control 1) registradas desde el día de la intervención hasta el día de la eutanasia.

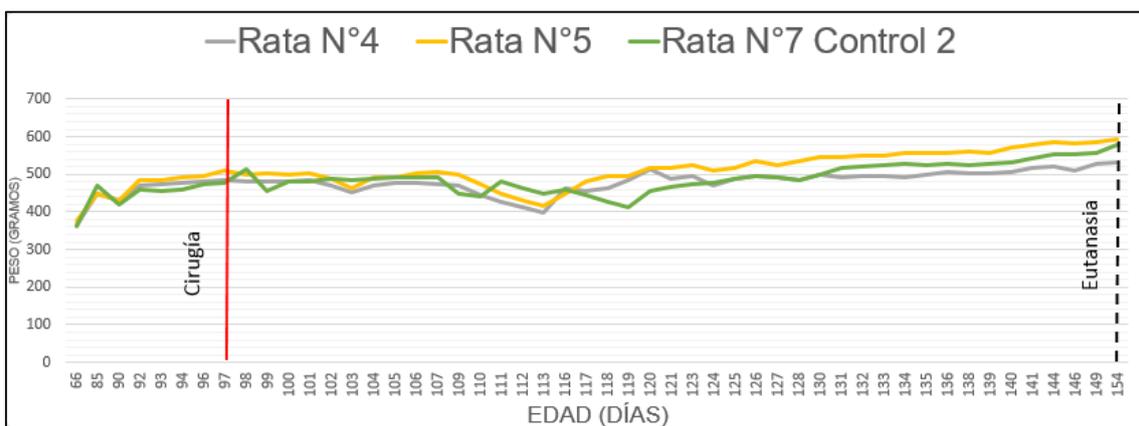


Figura 37. Pesos [g] de las ratas n°4, 5 (experimentales) y 7 (control 2) desde el día de la cirugía hasta su sacrificio.

En las figuras 36 y 37, se evidenció una disminución del peso de los animales luego de la cirugía que no superó el 20%, respecto al día de la intervención, que luego se recuperó llegando al día de la eutanasia con el mismo

o incluso un peso mayor que dicho día. Las medias alcanzadas fueron de 515 ± 43 gramos a las 4 semanas y de 567 ± 18 gramos a las 8 semanas de la intervención, las cuales se encontraron cercanas al rango de valores fisiológicos normales para ratas de experimentación Wistar macho adulto que es de 300 a 500 gramos [139, 140].

Con respecto a la temperatura corporal, todos los animales utilizados presentaron un comportamiento oscilante durante el día, entre un mínimo de $35,0^{\circ}\text{C}$ y un máximo de $38,0^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, sin mostrar diferencias significativas los días posteriores a la cirugía. Los valores registrados no mostraron discrepancias con respecto al rango fisiológico ($35,9^{\circ}\text{C}$ a $37,5^{\circ}\text{C}$) para este tipo de animales [139, 140]. Esto se puede apreciar en las figuras 38 y 39.

Estos dos parámetros permitieron demostrar que la evolución de la recuperación de los animales luego de la intervención fue exitosa y que no se presentaron síntomas de infección o inflamación en ellos, ante la presencia de un material ajeno al cuerpo como la estructura del andamio o esponja control.

Además, como seguimiento postoperatorio, se completaron tablas con parámetros establecidos en el apartado 3.15.8 "Registros de temperatura corporal, peso y estado general", basadas en el protocolo de supervisión postquirúrgico. Estas demostraron que durante las dos primeras semanas siguientes a la intervención los animales obtuvieron una puntuación inferior a los 4 puntos, lo cual se tradujo en ausencia de síntomas de dolor, pero requirió un monitoreo cuidadoso y la posibilidad de considerar analgesia externa.

Estos resultados demostraron que no fue necesario practicar la eutanasia de los animales antes de la finalización del ensayo, ya que el estado de salud general de los animales se mantuvo dentro de parámetros fisiológicos durante el periodo de tiempo evaluado.

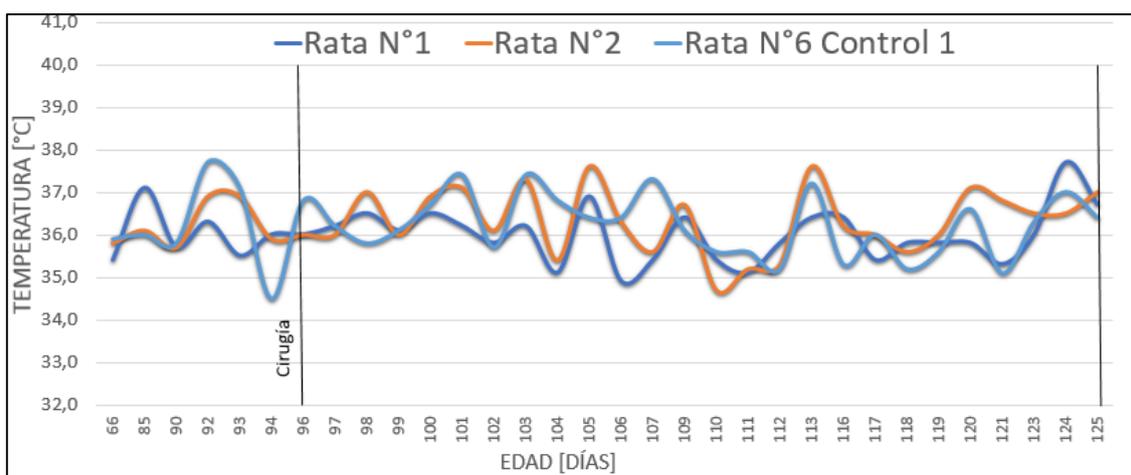


Figura 38. Temperatura corporal [°C] de las ratas n°1, 2 (experimentales) y 6 (control 1) tomados desde los días previos a la cirugía hasta el día de su sacrificio.

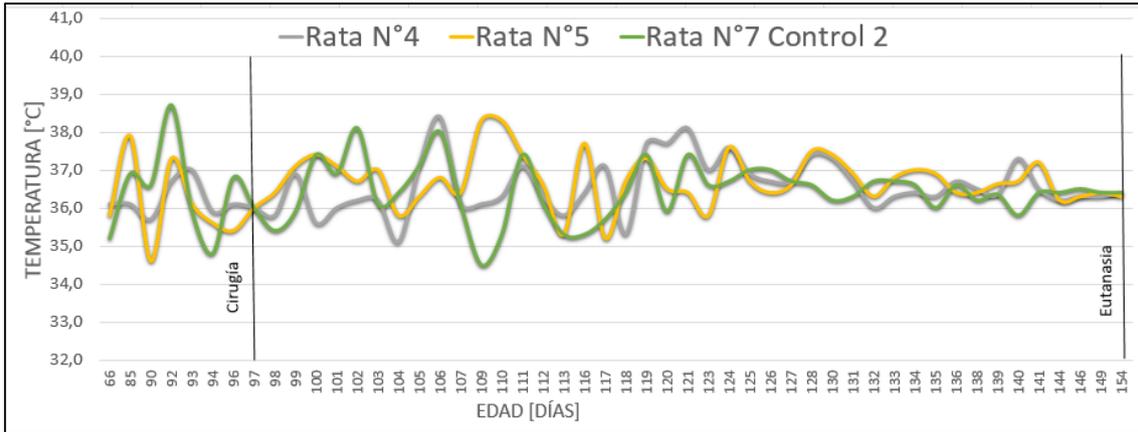


Figura 39. Temperatura corporal [°C] de las ratas n°4, 5 (experimentales) y 7 (control 2) registradas desde los días previos de la intervención hasta el día de la eutanasia.

Los datos referentes a los pesos y temperaturas registradas fueron agrupados en tablas, que se presentan en el apartado Anexos 7.9 “Registros de temperatura corporal, peso y estado general”.

4.12.2 Cirugía de prueba

La cirugía piloto fue planificada con el objetivo de determinar los lineamientos de trabajo para llevar a cabo el ensayo de implantación *in vivo*. Con ella se planificaron los sitios de ensayo, el número de controles negativos a emplear y la cantidad de material a colocar en cada animal intervenido.

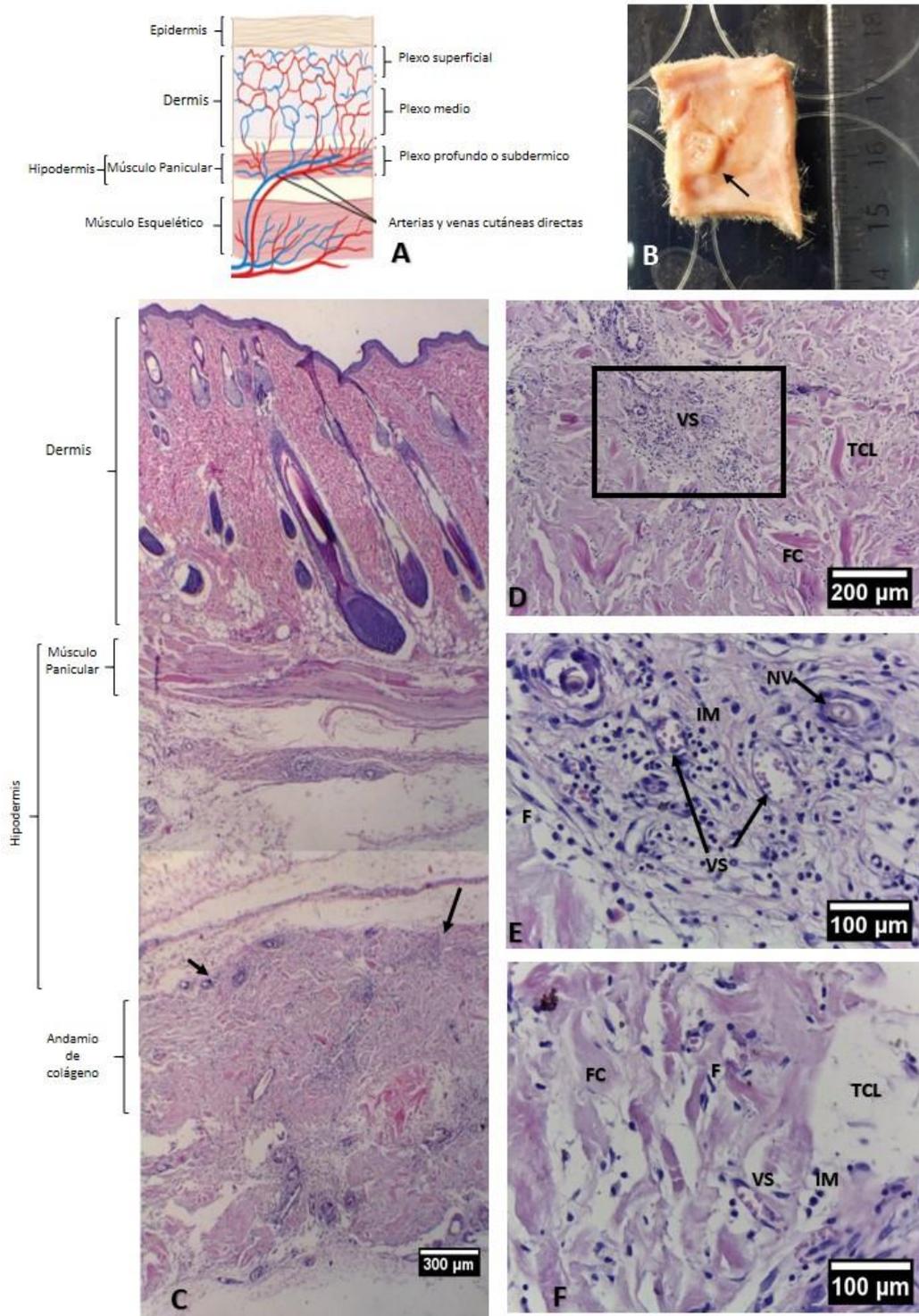


Figura 40. Resultados macroscópicos y cortes histológicos de rata Wistar a los 15 días post implantación del andamio con HE. (A) Esquema de capas que conforman la piel de la rata, puede identificarse el músculo panicular que difiere en distribución con respecto a los humanos [141]. (B) Andamio implantado junto con tejido circundante, se identifica estructura de enrejado con reestructuración. (C) Corte histológico con magnificación 4X de las distintas capas de la piel de la rata, se identifica mediante flechas el andamio de colágeno implantado. (D) Interior del andamio observado con una magnificación X10 (E) Magnificación X40 de la imagen D, interior del andamio (F) Otra región del interior del andamio observada con magnificación X40.

El análisis macroscópico permitió observar la estructura enrejada del andamio de colágeno en el sitio de implantación con una degradación y reestructuración parcial de la misma. No se identificaron signos clínicos de rechazo, como así tampoco, una reacción tisular adversa.

Por otro lado, las imágenes microscópicas de los cortes histológicos transversales, a una baja magnificación, permitieron la identificación de las distintas capas de la piel del animal con sus distintos componentes, la zona de implante del andamio, como así también, el andamio implantado (figura 40.C). En la región de la dermis, se pudo observar estructuras tales como glándulas sebáceas, folículos pilosos, células adiposas, vasos sanguíneos y fibras colágenas. En hipodermis, pudo identificarse de manera clara al músculo panicular, que forma parte de la anatomía de algunos mamíferos, como las ratas y que se ubica entre el tejido adiposo dermal y el tejido conectivo intersticial [141]. La importancia de este músculo para nuestro análisis residió en su utilidad para poder situar los restos del andamio implantado, ya que este fue colocado por debajo del mismo, y se utilizó como referencia de ubicación de los andamios en los distintos preparados histológicos. Además de este músculo, en esta región se identificaron fibras colágenas, vasos en neoformación, un gran infiltrado de fibroblastos y células mononucleares; lo cual le otorgó una marcada coloración basófila.

De acuerdo a la evaluación histológica realizada, a una magnificación media, en la región de hipodermis por debajo del músculo panicular se destacó una zona con una disposición diferente de las fibras colágenas con respecto al resto del tejido, que se identificó como el interior del andamio de colágeno. Sus límites se encontraron poco definidos, pero con una marcada invasión de células fibroblásticas y mononucleares, tal como puede observarse en la imagen D de la figura 40. Conjuntamente, se identificó neoformación de vasos, angiogénesis, y fibras colágenas en la periferia de dicho sector, como así también, en el interior del andamio. Anselme et. al. [142], mostraron en investigaciones anteriores resultados análogos en ratas Wistar sometidas a implantación de esponjas de colágeno durante el mismo período de ensayo.

A pesar de que la norma ISO 10993-6 establece un periodo de ensayo mínimo de 4 semanas, estos resultados nos permitieron verificar la zona de implantación del andamio, como así también, la presencia de una respuesta tisular en un corto periodo de tiempo; la cual nos brindó información acerca de la evolución temporal de la interacción del material ensayado con el tejido vivo.

4.12.3 Implantación de andamios de colágeno

Los resultados obtenidos del ensayo de implantación de andamios se presentan en la figura 41:

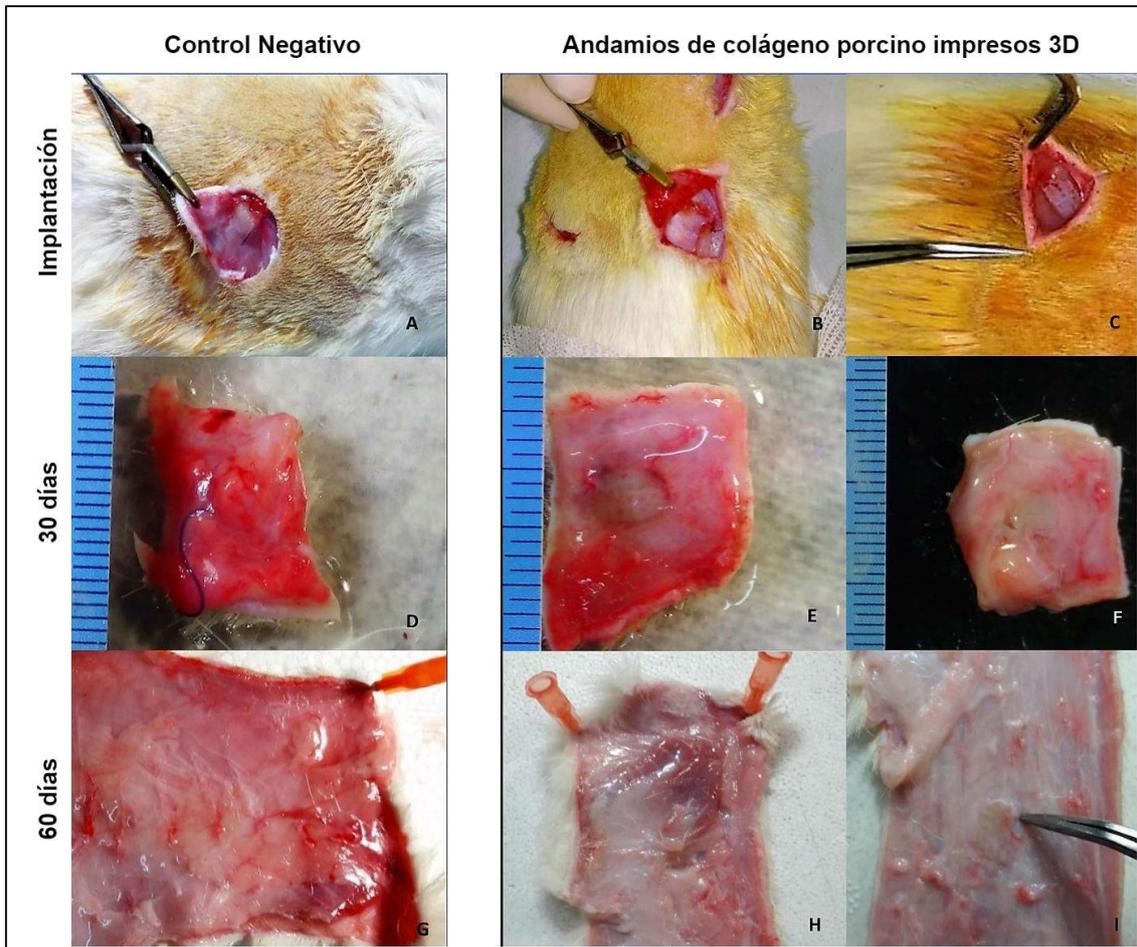


Figura 41. Se muestran las regiones de implantación junto con los andamios y/o esponja control respectiva en los distintos períodos de ensayo. (A) Implantación de la esponja control con método de sutura. (B-C) Implantación de andamios impresos 3D por medio de sutura (izquierda) y por método sin sutura (derecha). (E) Biopsia de tejido circundante con esponja control a los 30 días. (E-F) Biopsias de tejido circundante junto con andamios impresos 3D. (G) Región de tejido donde fue implantada la esponja control luego de 60 días desde el comienzo del ensayo. (H-I) Regiones de tejido donde fueron implantados los andamios impresos. Como puede apreciarse, en la mayoría de las ratas sometidas a ensayo existe una reabsorción completa (izquierda). Sin embargo, se identifica únicamente la presencia de restos de un andamio en otras de las regiones de ensayo.

La observación macroscópica de los tejidos de los animales a los 30 y 60 días post implantación, respectivamente, no evidenció lesiones ni rastros de inflamación en las regiones circundantes a los materiales implantados.

Con respecto a las esponjas control implantadas, a los 30 días se dificultó la observación de las mismas de manera macroscópica y a los 60 días no se pudo verificar la presencia de la misma. Smith et. al [143] notificaron de manera análoga la reabsorción progresiva de este tipo de materiales mediante ensayo de implantación *in vivo*. Allí, demostró que entre los 22 y 28 días, hubo una marcada degeneración de la matriz de colágeno siendo completa a los 46 días.

La visualización de los andamios a los 30 días post implantación evidenció la presencia de la arquitectura reticular de los mismos gracias al leve relieve que los diferenciaron del tejido circundante. Además, su color blanquecino característico permitió su identificación y realización de las biopsias.

Por el contrario, a los 60 días se dificultó identificar el sector donde fue implantado el andamio. En este caso, la reabsorción del material fue completa y macroscópicamente no se evidenciaron signos de rechazo.

Estos resultados nos permitieron establecer semejanzas entre los andamios experimentales y la esponja control, respecto a la interacción de estos con el tejido subcutáneo.

Bajo estas condiciones de ensayo, el tejido analizado mostró una excelente respuesta tisular al entrar en contacto con el material de los andamios, dado la biocompatibilidad que presenta el polímero natural utilizado para su fabricación [144, 16, 42]. No se evidenciaron signos clínicos que explicitan una reacción adversa lo que nos permitió inferir que la estructura cumplió con su función, debido a su integración total con el tejido local.

4.12.4 Microscopía Óptica: evaluación del tejido circundante al andamio implantado

Los resultados obtenidos tras la exploración de los preparados histológicos mediante microscopía óptica se presentan en figura 42:

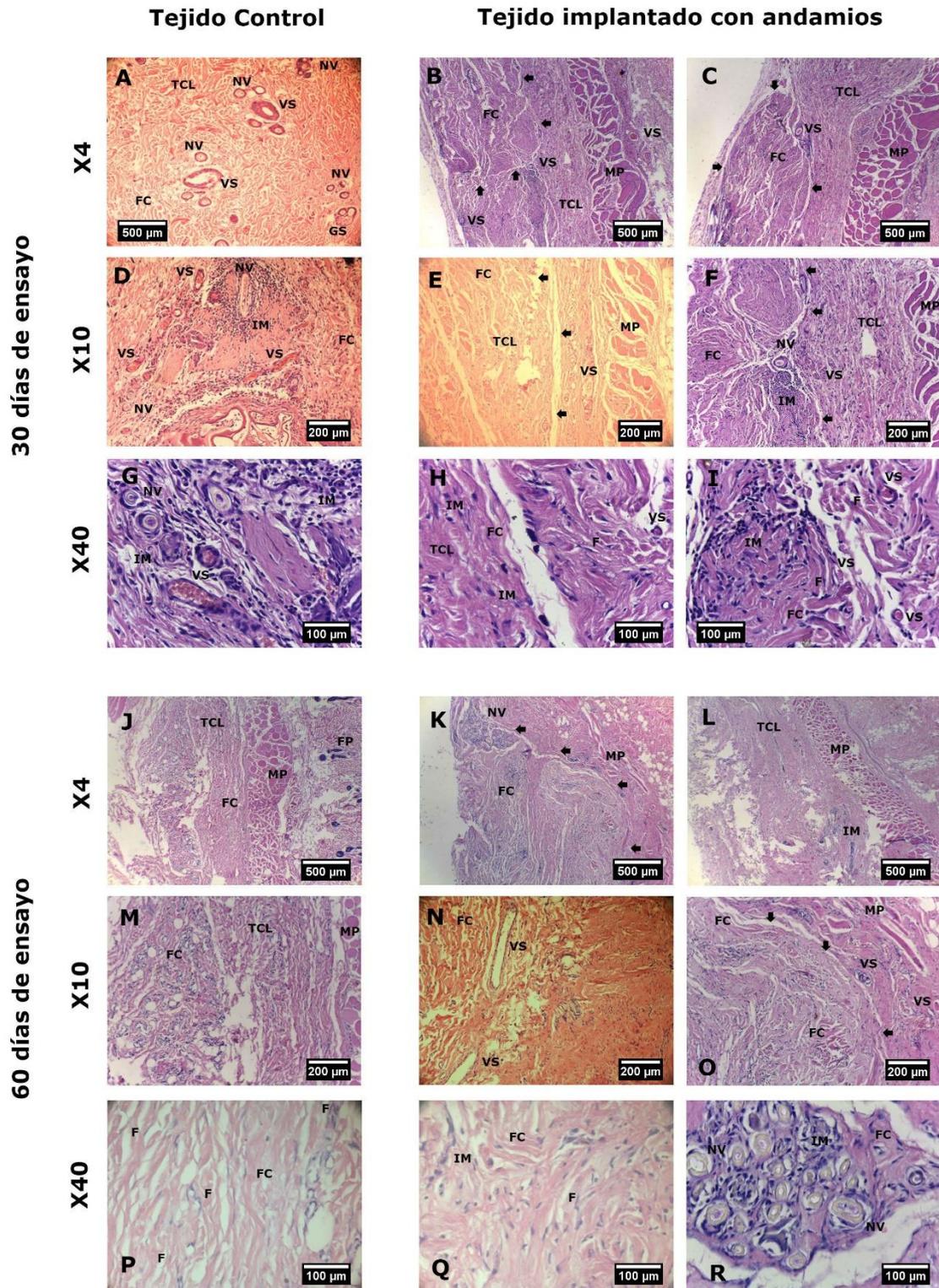


Figura 42. Micrografías ópticas de los preparados histológicos teñidos con HE obtenidos a los 30 y 60 días post implantación, a diferentes aumentos (X4, X10, X40). En ellas se pudieron identificar diversas estructuras que forman parte del tejido analizado y fueron destacadas como: TCL (tejido conectivo laxo), VS (vasos sanguíneos), NV (vasos neoformados), MP (músculo panicular), IM (infiltrado mononuclear), FC (fibras colágenas), FP (folículo piloso), GS (glandula sebacea) y entre flechas negras se destaca el sector donde se identifican restos del andamio implantado.

Las imágenes microscópicas de los tejidos implantados con andamios, luego de 30 y 60 días, observadas a magnificaciones bajas, mostraron algunas de las capas que conforman la piel que fueron mencionadas anteriormente: la dermis y la hipodermis. Esta última a su vez compuesta por una capa de músculo panicular, seguida de una región de fibras colágenas orientadas de manera diferente a la disposición normal de las mismas en tejido subcutáneo (figura 42.B, figura 42.C, figuras 42.E, figura 42.F). Este sector se identificó como parte del andamio implantado, marcado entre flechas negras en las fotomicrografías correspondientes a los 30 días.

Por otro lado, en las fotomicrografías de los tejidos implantados con andamios a magnificaciones más altas, se visualizaron células fibroblásticas, con su característico núcleo color azul oscuro con escaso citoplasma y forma ahusada; y células inflamatorias mononucleares, con núcleos grandes, basófilos y forma redondeada (figura 42.H, figura 42.I). A pesar de haber utilizado un mayor aumento, se dificultó identificar los límites del andamio a los 30 días de ensayo.

No se encontraron diferencias a nivel estructural con respecto al control negativo a los 30 días. En este se identificaron vasos sanguíneos y en neoformación, un infiltrado mononuclear y también la presencia de fibroblastos (figura 42.G). De manera similar a los andamios experimentales, se identificaron dermis e hipodermis, con la presencia del músculo panicular y de fibras colágenas dispuestas de manera irregular (figura 42.J). Sin embargo, se dificultó observar la región de implantación de la esponja.

Los cortes histológicos de los andamios implantados a los 60 días tampoco mostraron diferencias respecto a los cortes del control negativo (figura 42.K, figura 42.L). Además, a mayor aumento, se evidenció un infiltrado de células mononucleares inflamatorias, vasos sanguíneos y vasos en neoformación en el resto del tejido (figura 42.Q, figura 42.R). Investigaciones anteriores han demostrado que implantes de colágeno mostraron una mínima respuesta inflamatoria y antigénica, además fueron reemplazados por colágeno nativo. Se ha encontrado que la producción de nuevo colágeno por parte de los fibroblastos es incrementada cuando estas células se unen a una matriz extracelular, como en el caso de las esponjas de colágeno [145].

Como se indicó en el apartado 3.15.6 “Procedimiento Quirúrgico”, se colocaron 4 andamios por animal (excepto en los controles) la mitad suturados con Vycril 4/0 y la otra mitad sin fijación al tejido. Histológicamente no se encontraron diferencias entre ambos métodos de implantación.

Con las observaciones registradas, se pudo detectar que en todos los animales ensayados, a pesar de la presencia de células inflamatorias no se encontraron evidencias de rechazo por parte del tejido; lo cual demostró que los andamios de colágeno impresos 3D obtenidos de piel porcina produjeron una

respuesta tisular aceptable y con características de biocompatibilidad en tejido subcutáneo de ratas.

5. Conclusiones

En este proyecto integrador, se logró obtener la tinta de colágeno tipo I de origen porcino. Con dicho material se imprimieron, mediante tecnología de impresión 3D por método de extrusión, los andamios diseñados de acuerdo a lineamientos sugeridos por norma ISO 10993-6 para la realización de ensayo de implantación *in vivo*. Una vez impresos, fueron sometidos a diversos tratamientos, tales como liofilización, inmersión en medio de cultivo, hidratación con PBS y colocación en cultivo celular durante 7 días, para verificar el comportamiento estructural en distintas condiciones. Posteriormente, fueron medidos en largo, ancho y alto, y los resultados obtenidos no evidenciaron cambios morfológicos que modifiquen la estructura diseñada. Estos mostraron diferencias significativas en las dimensiones correspondientes a la altura al estar sometidos a procesos de liofilización e inmersión en medio de cultivo. Sin embargo, ésta fue recuperada al ser rehidratados con PBS o sometidos a cultivo celular durante 7 días. La reducción en altura podría explicarse por una contracción meramente relacionada al proceso de secado, que produjo un colapso a nivel del eje Z, esto también podría explicar el resultado obtenido durante el análisis de solubilización realizado en condiciones análogas, lo cual indicó una reducción en el peso del material del $41,55 \pm 3,35\%$ en un período de ensayo de 7 días. Estos resultados nos permiten afirmar que la tinta obtenida se comporta de manera adecuada para la impresión de andamios tridimensionales por método de extrusión, y brinda la posibilidad de realizar estructuras para aplicaciones en IT.

Respecto a las dimensiones superficiales de las hebras y poros de los andamios, los resultados evidenciaron que no hubo diferencias relevantes en el tamaño de los mismos sometidos a distintos procesos. Las mediciones obtenidas mostraron una población de hebras con un diámetro de $687,93 \pm 67,44 \mu\text{m}$, y una población de poros con un diámetro de $668,86 \pm 56,76 \mu\text{m}$, esto se verificó con microscopía óptica confocal. Por otro lado, el análisis microestructural, mediante microscopía electrónica realizada, de los microporos y fibras que caracterizan la estructura interna del andamio, evidenció poblaciones de poros con un tamaño mínimo de $7,68 \mu\text{m}$ y máximo de $57,55 \mu\text{m}$; y un diámetro mínimo de fibra de $74,11 \text{ nm}$. A su vez, el análisis de porosidad resultó del $91,53 \pm 0,41\%$ y el ensayo de hinchamiento resultó en un $1102,79 \pm 20,96\%$, lo que nos permite concluir que los andamios impresos obtenidos presentan una alta porosidad e interconectividad entre poros, con dimensiones acordes a los tamaños requeridos para promover la infiltración, proliferación y adhesión celular como así también angiogénesis en tejidos vivos.

El ensayo de citotoxicidad de los extractos de los andamios no mostró signos de citotoxicidad en células Vero a ninguna de las concentraciones ensayadas. El ensayo de hemólisis de los extractos del andamio y de morfología

de los glóbulos blancos en contacto directo con el andamio, tampoco evidenció hemólisis en los eritrocitos ni cambios en la morfología de los glóbulos blancos. Por otro lado, se observó adhesión celular en la superficie de los andamios mediante tinción con DAPI y microscopía óptica de fluorescencia.

Por último, el ensayo de implantación permitió evidenciar una respuesta tisular adecuada de los andamios impresos al estar en contacto con tejido vivo. Estos fueron incorporados al mismo, generando un proceso de adhesión y proliferación celular, como así también, neoformación de vasos sanguíneos. No se evidenciaron signos clínicos adversos de rechazo local, como así tampoco, signos de fibrosis. Este ensayo biológico junto con los resultados de los ensayos estructurales anteriores, muestran que los andamios de colágeno impresos 3D por método de extrusión podrían utilizarse como alternativa para brindar un soporte estructural biocompatible debido a que son capaces de otorgar microambientes locales altamente estructurados que promueven la regeneración de tejidos.

En un futuro, se plantea complementar la caracterización física de los andamios, mediante la realización de ensayos de tracción y compresión. Considerando que las investigaciones actuales en la IT buscan mejorar las características de este tipo de estructuras [21], se plantea la posibilidad de modificar la composición del andamio combinando el colágeno con otro tipo de biomaterial para mejorar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas con el objeto de preservar su diseño de impresión 3D, principalmente la altura de los andamios, la cual fue afectada al someterlos ante distintos tratamientos.

6. Bibliografía y Referencias

- [1] A. Samadikuchaksaraei, «Scientific and industrial status of tissue engineering biomaterials,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, pp. 2897-2909, 2007.
- [2] J. Vacanti y C. A. Vacanti, «The History and Scope of Tissue Engineering,» *Elsevier Academic Press, Burlington MA, USA*, pp. 3-6, 2007.
- [3] M. Ueda, «Applied Tissue Engineering,» *InTech*, 2011.
- [4] F. O'Brien, «Biomaterials and scaffolds for tissue engineering.,» *Materials Today.*, vol. 14, p. 88–95., 2011.
- [5] R. Langer y J. Vacanti, «Tissue Engineering,» *Science*, pp. 920-926, 1993.
- [6] H. Chen y Y. Hu, «Bioreactors for tissue engineering,» *Biotechnology Letters*, vol. 28(18), pp. 1415-23, 2006.
- [7] L. L. Y. Chiu, Z. Chu y M. Radisic, «Tissue Engineering,» 2011.
- [8] L. G. Griffith, «Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 961, pp. 83-95, 2002.
- [9] D. W. & o. Hart, «Determinants of skeletal muscle catabolism after severe burn,» *Annals of surgery*, vol. 232, nº 4, pp. 455-465, 2000.
- [10] S. MacNeil, «Biomaterials for tissue engineering of skin,» *Materials Today*, vol. 11, nº 5, pp. 26-35, 2008.
- [11] T. Alvaro, R. Salvá y F. Farias-Guerrero, «La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente (Parte 1),» *Revista Española de Patología*, vol. 43, pp. 24-32, 2010.
- [12] C. Frantz, K. Stewart y V. Weaver, «The extracellular matrix at a glance,» *Journal of Cell Science*, vol. 12, pp. 4195-4200, 2010.
- [13] M. W. King, «The medical biochemistry page,» 05 04 2015. [En línea]. Available: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/extracellularmatrix-sp.php>. [Último acceso: 07 2018].
- [14] G. Meisenbeg y W. Simmons, «La matriz extracelular,» de *Principios de Bioquímica Médica*, Cuarta ed., Barcelona, España, Elsevier, 2017, p. 219.
- [15] Y. Wai-Yee, C. Chee-Kai, L. Kah-Fai y C. Margam, «Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential,» *Trends in Biotechnology*, vol. 22(12), pp. 643-652, 2004.

- [16] B. S. Kim, «Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering,» *Trends Biotechnology*, vol. 16, pp. 224-230, 2001.
- [17] T. Ma, Y. Li, S. T. Yang y D. A. Kniss, «Effects of pore size in 3D fibrous matrix on human trophoblast tissue development,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 70(6), pp. 606-18, 2000.
- [18] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen y L. J. E., «Biomaterials Science,» *Academic Press.*, 2004.
- [19] Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai y S. Ramakrishna, «Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds,» *Tissue Engineering*, Vols. %1 de %211(1-2), pp. 101-9, 2005.
- [20] T. M. G. Chu, D. G. Orton, S. J. Hollister, S. E. Feinberg y J. W. Halloran, «Mechanical and *in vivo* performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures,» *Biomaterials*, vol. 23(5), pp. 1283-93, 2002.
- [21] S. Roldán Vasco, *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*, Medellín: Fondo Editorial, 2016.
- [22] J. E. Babensee, J. M. Anderson, L. V. McIntire y A. G. Mikos, «Advanced drug delivery reviews,» *Elsevier*, vol. 33, nº 1-2, pp. 111-139, 1998.
- [23] S. Badylak, B. N. Brown, G. P. McCabe, A. M. Stewart-Akers y J. E. Valentin, «Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component,» *Biomaterials*, vol. 30 (8), pp. 1482-1491, 2009.
- [24] F. G. Lyons, «The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs,» *Biomaterials*, vol. 31(35), pp. 9232-9243, 2010.
- [25] A. J. Garcia y E. A. Phelps, «Update on therapeutic vascularization strategies,» *Future Medicine Ltd*, vol. 4, pp. 65-80, 2009.
- [26] H. C. H. Ko, B. K. Milthorpe y C. D. McFarland, «Engineering thick tissues - The vascularisation problem,» *European Cells and Materials*, vol. 14, pp. 1-18, 2007.
- [27] G. F. Murphy, E. M. Orgill, E. M. Skrabut y I. V. Yannas, «Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin,» *PNAS*, vol. 86 (3), pp. 933-937, 1989.
- [28] L. J. Gibson, B. A. Harley, F. J. O'brien y I. V. Yannas, «The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds,» *Biomaterials*, vol. 26, pp. 433-441, 2005.

- [29] e. a. D. Druecke, «Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds *in vivo*: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy.,» *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 68A, nº 1, pp. 10-18, 2004.
- [30] V. Karageorgiou y D. Kaplan, «Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,» *Biomaterials*, vol. 26, nº 27, p. 5474–549., 2005..
- [31] T. C. Lee y P. F. Niederer, *Basic Engineering for Medics and Biologist*, ESEM primer, 2010.
- [32] L. L. Hench, «Biceramics,» *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 81 (7), pp. 1705-1728, 2005.
- [33] A. M. Ambrosio, J. S. Sahota, Y. Khan y C. T. Laurencin, «A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization,» *Journal Biomedical Mater. Res.*, vol. 58(3), pp. 295-301, 2001.
- [34] M. Wang, «Developing bioactive composite materials for tissue replacement,» *Biomaterials*, vol. 24, pp. 3133-2151, 2003.
- [35] L. Lu, P. S. J., M. D. Lyman, H. L. Lai, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer y A. G. Mikos, «*In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly (DL-lactic-coglycolic acid) foams,» *Biomaterials*, vol. 21 (18), pp. 1837-45, 2000.
- [36] S. H. Oh, S. G. Kang, E. S. Kim, S. H. Cho y J. H. Lee, «Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-coglycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method,» *Biomaterials*, vol. 24 (22), pp. 4011-21, 2003.
- [37] A. S. Rowlands, S. A. Lim, D. Martin y J. J. Cooper-White, «Polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation,» *Biomaterials*, vol. 28(12), pp. 2109-21, 2007.
- [38] L. Huinan, B. S. Elliot y J. W. Thomas, «Less harmful acidic degradation of polu(lactic-co-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition,» *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1 (4), pp. 541-545, 2006.
- [39] W. Friess, «Collagen biomaterial for drug delivery,» *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 45, pp. 113-36, 1998.
- [40] K. Kojima y J. M. Med, «Tissue engineered trachea using sheep nasal septum,» 2004.
- [41] I. M. y. d. C. A. Gaspar, «Collagen based scaffolds for skin tissue engineering,» *Journal of Medicine and Life*, vol. 4, nº 2, pp. 172-177, 2011.

- [42] S. Ricard-Blum, «The Collagen Family,» *Cold Spring Harb Perspect in Biology*, p. 3:a004978, 2011.
- [43] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin y F. Berthod, «Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications,» *Materials*, pp. 1863-1867, 2010.
- [44] P. Fratzl, «Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction,» de *Collagen Structure and Mechanics*, P. Fratzl, Ed., New York (USA), Springer, 2008, pp. 1-12.
- [45] J. Ramshaw, Y. Peng, V. Glattauer, J. Werkmeister y J. Mater, «Collagens as biomaterials,» *Sci. Mater. Med.*, vol. 20, nº 1, pp. S3-S8, 2009.
- [46] D. Hulmes, «Collagen Diversity, Synthesis and Assembly,» de *Collagen Structure and Mechanics*, P. Fratzl, Ed., New York (USA), Springer, 2008, pp. 15-41.
- [47] M. H. Ross y W. Pawlina, «Tejido Conjuntivo,» de *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*, Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana, 2008, p. 166.
- [48] R. Burgeson, «Genetic heterogeneity of collagens,» *J. Investig. Dermatol.*, pp. 25-30, 1982.
- [49] D. Chanjuan y L. Yonggang, «Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives,» *Polymers*, vol. 8, nº 42, pp. 1-20, 2016.
- [50] E. L. e. a. Monzack, «Natural Materials in Tissue Engineering Applications,» de *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: a review of the past and future trends*, Germany, Springer Wien New York, 2011, pp. 212-213.
- [51] S. Browne, D. Zeugolis y A. Pandit, «Collagen: finding a solution for the source,» *Tissue Eng Part A*, vol. 19, nº 13-14, pp. 1491-4, 2013.
- [52] B. An, Y. Lin y B. Brodsky, «Collagen interactions: Drug design and delivery,» *Adv Drug Deliv Rev.*, vol. 1, nº 97, pp. 69-84, 2016.
- [53] K. Silvipriya, K. K. Krishna, A. Bhat, K. B. Dinesh, J. Anish y I. Panayappan, «Collagen: Animal Sources and Biomedical Application,» *J App Pharm Sci*, vol. 5, nº 03, pp. 123-127., 2015.
- [54] T. Wess, «Collagen Fibrillar Structure and Hierarchies,» de *Collagen Structure and Mechanics*, P. Fratzl, Ed., New York (USA), Springer, 2008, pp. 49-53.

- [55] B. Chevallay y D. Herbage, «Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy.,» *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 38, p. 211–218., 2000.
- [56] F. Guillemot, V. Mironov y M. and Nakamura, «“Bioprinting is Coming of Age: Report From the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux,» *Biofabrication*, vol. 2, nº 1, p. 010201., 2010.
- [57] A. B. Dababneh y I. T. Ozbola, «Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review,» *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, pp. 061016-1, Diciembre 2014.
- [58] A.-V. Do, B. Khorsand y S. M. Geary, «3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications,» *Adv Healthc Mater.*, vol. 4, nº 12, p. 1742–1762., Agosto 2015.
- [59] B. Subia, J. Kundu y S. C. Kundu, «Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications,» 1 Marzo 2010. [En línea]. Available: <https://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/biomaterial-scaffold-fabrication-techniques-for-potential-tissue-engineering-applications>.
- [60] S. V. Murpy y A. Atala, «3D Bioprinting of Tissues and Organs,,» *Nature Biotechnology volume*, vol. 32, p. 773–785, 2014.
- [61] V. Sanjairaj, F. Jerry Y H y L. Wen Feng, «3D Printing and 3D Bioprinting in Pediatrics,» *bioengineering*, vol. 4, nº 3, p. 63, 2017.
- [62] V. M. Mironov, «Printing technology to produce living tissue,» *Journal Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 3, nº 5, pp. 701-704, 2003.
- [63] I. Ozbolat y Y. Yu, «Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends,» *IEEE Trans. Biomed. Eng*, pp. 691-699, 2013.
- [64] I. Ozbolat, «Extrusion-Based Bioprinting,» de *3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications*, Londres, Reino Unido, Academic Press, 2016, pp. 93-124.
- [65] J. Y. E. H. J. C. E. C. H. N. Moiemem, «Long-term clinical and histological analysis of Integra dermal regeneration template.,» *Plast Reconstr Surg.* , vol. 127, nº 3, pp. 1149-54., 2011.
- [66] Z. Ghanavati, N. Neisi, V. Bayati y M. Makvandi, «The influence of substrate topography and biomaterial substance on skin wound healing.,» *Anat Cell Biol.*, vol. 48, nº 4, pp. 251-7, 2015.
- [67] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang y Y. Cao, «Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications,» *Pediatr. Res.*, vol. 63, p. 492–496., 2008.

- [68] A. Meimandi-Parizi, A. Oryan y A. Moshiri, «Role of tissue engineered collagen based tridimensional implanton the healing response of the experimentally induced large Achilles tendon defect model in rabbits: A long term study with high clinical relevance,» *J. Biomed. Sci.*, vol. 20, p. 28., 2013.
- [69] S. Sell, P. Wolfe, K. Garg, J. McCool, I. Rodriguez y G. Bowlin, «The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues,» *Polymers*, vol. 2, p. 522–553., 2010.
- [70] V. Lee, G. Singh, J. Trasatti, C. Bjornsson, X. Xu, T. Tran, S. Yoo, G. Dai y P. Karande, «Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting.,» *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 20, nº 6, pp. 473-84, 2014.
- [71] S. Shanmuganathan, N. Shanmugasundaram, N. Adhirajan, T. Ramyaa Lakshmi y M. Babu, «Diseño de una matriz de soporte compuesta de colágeno de piel de tiburón-aloe para ingeniería tisular,» vol. 4, nº 49, pp. 321-340, 2008.
- [72] Y. Lee y T. Arinzeh, «Electrospun nanofibrous materials for neural tissue engineering,» *Polymers*, vol. 3, p. 413–426, 2011.
- [73] A. Gigante, A. Busilacchi, B. Lonzi, S. Cecconi, S. Manzotti, C. Renghini y A. Giuliani, «Purified collagen I oriented membrane for tendon repair: An ex vivo morphological study.,» *J. Orthop. Res.*, vol. 31, p. 738–745, 2013.
- [74] S. Yunoki, H. Hatayama, M. Ebisawa, E. Kondo y K. A. Yasuda, «A novel fabrication method to create a thick collagen bundle composed of uniaxially aligned fibrils: An essential technology for the development of artificial tendon/ligament matrices.,» *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, pp. 3054-3065, 2015.
- [75] X. Zheng, W. Wang, S. Liu, J. Wu, F. Li, L. Cao, X. Liu y X. Mo, «Enhancement of chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells by oriented nanofiber yarn-collagen type I/hyaluronate hybrid.,» *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, p. 1071–1076., 2016.
- [76] S. Lee, J. Liu, S. Oh, S. Soker, A. Atala y J. Yoo, «evelopment of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions,» *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2891-2898, 2008.
- [77] G. Chen, Y. Lv, C. Dong y L. Yang, «Effect of internal structure of collagen/hydroxyapatite scaffold on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.,» *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, pp. 313-323, 2015.
- [78] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou y J. Shen, «Biodegradability and cell-mediated contraction of porous collagen scaffolds: The effect of lysine as

- a novel crosslinking bridge,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 71, nº 2, pp. 334-342, 2004.
- [79] J. Matthews, G. Wnek, D. Simpson y G. Bowlin, «Electrospinning of collagen nanofibers,» *Biomacromolecules*, vol. 3, p. 232–238, 2002.
- [80] K. Shields, M. Beckman, G. Bowlin y J. Wayne, «Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II.,» *Tissue Eng*, vol. 10, p. 1510–1517, 2004.
- [81] G. Offeddu, J. Ashworth, R. Cameron y M. Oyen, «Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications,» *J. Mech. Behav. Biomed. Mater*, vol. 42, p. 19–25., 2015.
- [82] K. G. Bon, J. C. Dong, J. P. Sang, S. K. Min, M. K. Chang y K. Chun-Ho, «3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications,» *Biomaterials Research*, vol. 20, nº 12, pp. 1-8, 2016.
- [83] G. Kim, S. Ahn, H. Yoon, Y. Kimb y W. Chun, «A cryogenic direct-plotting system for fabrication of 3D collagen scaffolds for tissue engineering,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, p. 8817–8823, 2009.
- [84] T. Xu, K. Binder, M. Albanna, D. Dice, W. Zhao, J. Yoo y A. Atala, «Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications.,» *Biofabrication.*, vol. 5, nº 1, 2013.
- [85] A. Lode, M. M. S. Brüggemeier, B. B. H. S. M. Paul, C. Winkelmann, F. Sonntag y M. Gelinsky, «Additive manufacturing of collagen scaffolds by three-dimensional plotting of highly viscous dispersions.,» *Biofabrication*, vol. 8, nº 1, 2016.
- [86] Y. Zhang, X. Cheng, J. Wang, Y. Wang, B. Shi, C. Huang, X. Yang y T. Liu, «Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-,» *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 344, p. 362–369, 2006.
- [87] D. Duarte Campos, A. Blaeser, A. Korsten, S. Neuss, J. Jäkel, M. Vogt y H. Fischer, «The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages,» *Tissue Eng. Part A*, vol. 21, p. 740–756., 2014.
- [88] J. Park, J. Choi, J. Shim, J. Lee, H. Park, S. Kim, J. Doh y D. Cho, «A comparative study on collagen type i and hyaluronic acid dependent cell behavior for osteochondral tissue bioprinting.,» *Biofabrication*, vol. 6, nº 035004, 2014.
- [89] C. Liu, Z. Xia, Z. Han, P. Hulley, J. Triffitt y J. Czernuszka, «Three-dimensional scaffolds: an *in vitro* strategy for the biomimetic modelling of

- in vivo* tumour biology,» *Journal of materials science*, vol. 49, nº 17, p. 5809–5820, 2014.
- [90] A.-V. Do y e. al., «3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications,» *Adv Healthc Mater*, vol. 4, nº 12, pp. 1742-1762, 2015.
- [91] A. Díaz Nocera, N. A. Salvatierra y M. P. Cid, «Printing Collagen 3D Structures,» *IFMBE Proceedings*, vol. 49, pp. 136-139, 2015.
- [92] A. Diaz Nocera, R. Comín, N. A. Salvatierra y M. P. Cid, «Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering,» *Biomedical Microdevices*, pp. 20-26, 2018.
- [93] C. Adragna, S. Jurczyszyn, R. Comín, A. Díaz Nocera, N. A. Salvatierra y M. P. Cid, «Collagen obtaining for 3D printing to create biological substitutes for biomedical applications,» *Revista Argentina de Bioingeniería*, vol. 20 (10), 2017.
- [94] S. A. Ghodbane y M. G. Dunn, «Physical and Mechanical Properties of Cross-linked Type I Collagen Scaffolds Derived from Bovine, Porcine, and Ovine Tendons,» *Biom Mat Res*, vol. 104, nº 11, pp. 2685- 2692, 2016.
- [95] B. N. Bavaresco Elissetche, «Proyecto Integrador: Entrecruzamiento por tratamiendo DHT de andamios de colágeno y ácido hialurónico impresos en 3D,» Córdoba, Argentina, 2017.
- [96] F. O'brien y y. otros., «Andamio de material compuesto de colágeno/hidroxiapatita, y procedimiento para la producción del mismo». Comunidad Europea Patente ES 2 435 192 T3, 14 Agosto 2013.
- [97] K. A. Faraj y y. otros., «Construction of Collagen Scaffolds That Mimic the Three-Dimensional Architecture of Specific Tissues,» *TISSUE ENGINEERING*, vol. 13, nº 10, pp. 2387-2394, 2007.
- [98] F. J. O'Brien, B. Harley y I. V. Yannas, «The effect of pore size on cell adhesion in collagen GAG scaffolds,» *Biomaterials*, vol. 26, nº 4, pp. 433-41, 2005.
- [99] J. Glowaki y S. Mizuno, «Collagen Scaffolds for Tissue Engineering,» *Wiley InterScience*, vol. 89, nº 5, pp. 338-344, 2007.
- [100] G. GUIDOLQUIM, «TÉCNICAS Y OPERACIONES AVANZADAS EN EL LABORATORIO QUÍMICO (TALQ) .,» Centre de Recursos per l'Aprenentage i la Investigació. (CRAI) - Unitat de Docència (UD), 04 Abril 2014. [En línea]. Available: <http://www.ub.edu/talq/es/node/261>. [Último acceso: 2018 Agosto 30].
- [101] U. L. d. G. V. y. H.-F. d. Medicina, «Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS),» *Standard Operating Procedures (SOPs)*, 2008.

- [102] «DAPI Nucleic Acid Stain,» *Invitrogen - Molecular Probes*, 26 10 2013.
- [103] S. Shukla, A. K. Bajpai y J. Bajpai, «Swelling controlled delivery of antibiotic from a hydrophilic macromolecular matrix with hydrophobic moieties,» *Macromolecular Research*, vol. 11, nº 4, pp. 273-282, 2003.
- [104] G. C. you, W. D. yong y S. J. cong, «Fabrication of porous collagen/chitosan scaffolds with controlling microstructure for dermal equivalent,» *Polym. Adv. Technol.*, vol. 14, nº 6, pp. 373-379, 2003.
- [105] C. Castro de Pardo, «Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT,» 2006.
- [106] N. I. 10993-5, «Evaluación Biológica de dispositivos Médicos. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *In vivo*,» 2009.
- [107] 1.-1. Norma ISO, «Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials,» 2009.
- [108] C. d. S. d. A. Laboratorios, «Cslab,» [En línea]. Available: <http://www.cslab.cl/farma/index.php/servicios/ensayo-de-compatibilidad/15-ensayo-de-biocompatibilidad>. [Último acceso: 19 Septiembre 2018].
- [109] C. U. d. Navarra, «Clínica Universidad de Navarra,» [En línea]. Available: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/hemolisis>. [Último acceso: 17 Septiembre 2018].
- [110] N. I. 10993-4, «Biological evaluation of medical devices Part 4: Selection of tests for interactions with blood,» ISO/TC 194 - Biological and clinical evaluation of medical devices, 2002.
- [111] N. U.-E. I. 10993-4, «Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 4: Selección de los ensayos para las interacciones con la sangre.,» 2017.
- [112] G. Von Hoosier, «The age of biology: opportunities and challenges for Laboratory Animal Medicine,» *Scand J Lab Anim Sci*, vol. 26, nº 4, pp. 176-184., 1999.
- [113] J. Zuñiga, M. Tur, S. Milocco y R. Piñeiro, «Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal.,» McGraw-Hill Interamericana, México, 2001.
- [114] C. J. A. N. Hernández, R. A. R. Ojeda y C. V. Vélez, «La correcta selección en el modelo animal,» de *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*, México, Samsara Editorial, 2012, p. 61.

- [115] F. d. M. F. Paredes y y. otros, «Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón,» Centro de Información y Documentación Científica del INS, Lima, Perú, 2008.
- [116] 1.-6. Norma ISO, «Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos. Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación,» 2009.
- [117] N. I. 10.993-6, «Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation,» 2012.
- [118] R. C. Rennert, «Biological therapies for the treatment of cutaneous wounds: phase III and launched therapies,» *Expert Opin Biol. Ther.*, vol. 13, pp. 1523-41, 2013.
- [119] Y. C. Kim, «D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*,» *J. Neuroscience*, vol. 27 (29), pp. 7640-7647, 2007.
- [120] R. Khorramirouz, J. L. Go, C. Noble, S. Jana, E. Maxson, A. Lerman y M. D. Young, «A novel surgical technique for a rat subcutaneous implantation of a tissue engineered scaffold,» *Acta Histochem*, vol. 120, pp. 282-291, 2018.
- [121] A. FDA. [En línea]. Available: http://site.aaawholesalecompany.com/Files/Helistat_by_Integra_Lifesciences.pdf.
- [122] S. Wolfensohn y M. Lloys, «Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare,» *Oxford University Press*, 1994.
- [123] J. A. N. Hernández y y. otros, «Identificación del dolor, su tratamiento y establecimiento del punto final anticipado en la investigación con animales,» de *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*, México, Samsara Editorial, 2012, pp. 65-71.
- [124] H. Schoof, J. Apel y I. Heschel, «Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges,» *Journals of Biomedical Materials*, vol. 58, nº 4, pp. 352-357, 2002.
- [125] F. O'Brien, «Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds,» *Biomaterials*, vol. 25, pp. 1077-1086, 2004.
- [126] Z. Fereshteh, «Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering,» *Materials, Technologies and Applications*, pp. 151-174, 2018.
- [127] E. Chan, S. Kuo, A. Kong, W. Morrison, G. Disting, G. Mitchell, S. Lim y G. Liu, «Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications,» *PLoS One*, vol. 2, nº 11, 2016.

- [128] Y. Kuboki, Q. Jin y H. and Takita, « Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMPinduced,» *J Bone Joint Surg Am*, Vols. %1 de %283-A, nº 1, p. 105, 2001.
- [129] C. Murphy y F. O'Brien, « Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds,» s. *Cell adhesion & migration*, vol. 4, p. 377, 2010.
- [130] K. Wolf, S. Alexander, V. Schacht, L. M. Coussens, U. H. von Andrian, J. van Rheenen y P. Friedl, «Collagen-based cell migration models *in vitro* and *in vivo*,» *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, nº 8, p. 931–941, 2009.
- [131] I. e. a. Yannas, «Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin.,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, nº 3, pp. 933-7, 1989.
- [132] C. Figueroa Hernández, R. Gómez González, J. Prohías Martínez y L. Pascual Expósito, «Desarrollo de matrices de colágeno para la regeneración del tejido del miocardio,» 2016.
- [133] H. Park, X. Guo, J. S. Temenoff, Y. Tabata, A. I. Caplan, F. K. Kasper y A. G. Mikos, «Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells *In Vitro*,» *Biomacromolecules*, vol. 10, nº 3, pp. 541-546, 2009.
- [134] M. Iafisco, I. Foltran, S. Sabbatini, G. Tosi y N. Rover, «Electrospun Nanostructured Fibers of Collagen- Biomimetic Apatite on Titanium Alloy,» *Bioinorganic Chemistry and Applications*, vol. 8, nº 11, 2011.
- [135] H. Lu, S. Y. Lee y F. P. J. Lin, «Elastic modulus, permeation time and swelling ratio of a new porcine dermal collagen membrane,» *Periodontal Res*, vol. 33, nº 5, pp. 243-8, 1998.
- [136] S. C. Rodrigues, C. L. Salgado, A. Sahu, M. P. Garcia, M. H. Fernandes y F. J. Monteiro, «Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications,» *Biomed. Mater. Res.*, vol. 101, nº 4, pp. 1080-1094, 2013.
- [137] V. Kaplan y D. Karageorgiou, «Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,» *Biomaterials*, vol. 26, nº 27, pp. 5474-5491, 2005.
- [138] E. M. Corporation, *Microscopía 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI)*, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, 2016.

- [139] R. Kathleen, A. Pritchett-Corning, G. Girod, P. E. Avellaneda, S. C. Fritz y M. J. Brown., «Manual de signos clínicos en roedores y conejos,» Charles River Laboratories 1a Edición., 2011.
- [140] B. U.-C. M. H. y J. Fottz, «Condition scoring a rapid and accurate method for assessing health status in mice.,» *Lab. Anim. Sci.*, 1999.
- [141] N. Naldaiz-Gastesi, O. A. Bahri, A. Lopez de Munain, K. J. A. McCullagh y A. Izeta, «The panniculus carnosus muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields,» *Journal of Anatomy*, 2018.
- [142] K. Anselme, C. Bacques, G. Charriere, D. J. Hartmann, D. Herbage y R. Garrone, «Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural, and immunological study,» *Journal of Biomedical Materials Research*, 1990.
- [143] K. J. Smith, H. G. Skelton, T. L. Barrett, M. Welch y J. Beard, «Histologic and immunohistochemical features in biopsy sites in which bovine collagen matrix was used for hemostasis,» *Journal of the American Academy of Dermatology*, p. 434–4, 1996.
- [144] S. Eisner, T. Chi-Yang, P. Yu-Hwa, L. Yu-Te, H. Haw-Ming, T. Nai-Chia, F. Sheng-wei y C. Wei-Jen, «*In Vitro* and *In Vivo* Study of a Novel Porcine Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration,» *Materials*, 2016.
- [145] F. Grinnell, «Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices,» *Trends in Cell Biology*, vol. 13, nº 5, p. 264–269, 2003.
- [146] C. V. Fabres, «Future's technology: tissue engineering and stem cells in reproductive medicine.,» *Revista Médica Clínica Las Condes*, pp. 488-493., 2010.
- [147] V. Rosa, «What and where are the stem cells for Dentistry?,» *Singapore Dent J.*, pp. 13-18, 2013.
- [148] A. e. a. Shapira, «Advanced micro- and nanofabrication technologies for tissue engineering,» *Biofabrication*, vol. 6, nº 2, 2014.
- [149] Q. Loh y C. Choong, «Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size.,» *Tissue Eng. Part B Rev.*, p. 485–502., 2013.
- [150] J. S. Mao, L. G. Zhao, Y. J. Yin y K. De Yao, «Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds,» *Biomaterials*, pp. 1067-1074, 2003.
- [151] K. P. -. B. C. & R. -. F. N. Gómez-Lizárraga, «Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino.,» *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, pp. 137-140., 2011.

- [152] F. J. O'Brien, «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,» *Materialstoday*, vol. 14, nº 3, 2011.
- [153] H. Patel, M. Bonde y G. Srinivasan, «Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering,» *Trends Biomaterials for Artificial Organs*, vol. 25(1), pp. 20-29, 2011.
- [154] K. e. a. Leong, «Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.,» *Biomaterials*, vol. 24, p. 2363–2378, 2013.
- [155] G. Meisenberg y W. Simmons, «Capítulo 14: La Matriz Extracelular,» de *Principios de Bioquímica Médica*, Barcelona, España, Elsevier, 2018, pp. 218-234.
- [156] D. Chanjuan y L. Yonggang, «Application of Collagen Scaffold in Tissue,» 4 Febrero 2016. [En línea]. Available: <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/2/42>.
- [157] I. V. Yannas, *Natural Materials*, San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004.
- [158] R. Burgeson y M. Nimni, «Collagen types. Molecular structure and tissue distribution.,» *Clin Orthop Relat Res*, pp. 250-72., 1992.
- [159] W.-Y. Yeong, C. Chee-Kai, L. Kah-Fai y M. Chandrasekaran, «Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential,» *TRENDS in Biotechnology*, vol. 22, nº 12, pp. 643-652, Diciembre 2004.
- [160] J. Rouwkema, N. Rivron y C. Van Blitterswijk, «Vascularization in tissue engineering,» *Trends Biotechnol.*, vol. 26, nº 8, p. 434–441, 2008.
- [161] W. C. Wilson Jr y T. Boland, «Cell and organ printing 1: Protein and cell printers,» *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, vol. 272A, nº 2, pp. 475-573, Junio 2003.
- [162] T. Boland, T. X. B. Damon y X. Cui, «Application of inkjet printing to tissue engineering,» *Biotechnology Journal*, vol. 1, nº 9, pp. 910-917, Septiembre 2006.
- [163] P. Le Hue, «Progress and Trends in Inkjet Printing Technology,» *J. Imaging Sci. Technol.*, vol. 42, nº 1, pp. 49-62, 1998.
- [164] J. C. Stachowiak, D. L. Richmond, T. H. Li, F. Brochard-Wyarte y D. A. Fletcher, «Inkjet formation of unilamellar lipid vesicles for cell-like encapsulation,» *Lab on a chip*, vol. 9, nº 14, pp. 2003-2009, 2009.

- [165] D. Although, «"Bioprinting Techniques" in Bioprinting: Principles and Applications,» *World Scientific*, pp. 63-116, 2015.
- [166] I. T. Ozbolat, «Laser - based bioprinting,» de *3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications*, Londres, Reino Unido, Elsevier Science, 2016, pp. 165-193.
- [167] A. Díaz Nocera, R. Comín, N. Salvatierra y M. P. Cid, «Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering,» *Biomedical Microdevices*, pp. 20-26, 2018.
- [168] M. Johnson, «Laboratory Mice and Rats,» *Materials and Methods*, p. 2:11, 2012.
- [169] C. y. Tecnología, «Impresión 4D: tecnología al servicio de la salud,» Portal de Noticias de la Ciudad de Córdoba, Córdoba, 2018.
- [170] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa y D. Kumar, «Polymeric scaffolds in tissue engineering application: review,» *Int J Polym Sci*, p. 2011:290602, 2011.
- [171] A. Atala, «Tissue engineering of reproductive tissues and organs,» *Fertil Steril.*, p. 98:21–9, 2012.
- [172] S. Forbes y N. Rosenthal, «Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy,» *Nat Med*, vol. 20, p. 857–69, 2014.
- [173] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen y X. Jing, «Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application,» *Prog Polym Sci.*, vol. 37, p. 237–80, 2012;.
- [174] B. Chevallay y D. Herbage, «Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy,» *Med. Biol. Eng. Comput*, vol. 38, p. 211–218, 2000.
- [175] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu y C. Han, «Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering,» *Biomaterials*, vol. 24, p. 4833–4841., 2003.
- [176] T. Xu, K. Binder, M. Albanna, D. Dice, W. Zhao, J. Yoo y A. Atala, «Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications.,» *Biofabrication*, vol. 5, p. 015001, 2012.
- [177] G. Meisenbeg y W. Simmons, «La matriz extracelular,» de *Principios de Bioquímica Médica*, Cuarta ed., Barcelona, España, Elsevier, 2017, p. 221.
- [178] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin y F. Berthod, «Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications,» *Materials*, vol. 3, pp. 1864-1887, 2010.

- [179] N. Plainsboro, «Helistat absorbable collagen hemostatic sponge:product information,» *Golla-Tec, Inc* , 1991..
- [180] C. M. Agrawal y R. B. Ray, «Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 55(2), pp. 141-50, 2001.
- [181] G. Bon Kang, J. C. Dong, J. P. Sang, S. K. Min, M. K. Chang y K. Chun-Ho, «3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications,» *Biomaterials Research*, 2016.
- [182] C. Doillon, C. Whyne y R. Berg, «Fibroblast-collagen sponge interactions and the spatial deposition of newly synthesized collagen fibers *in vitro* and *in vivo*,» *Scanning Electron Microsc*, vol. 3, pp. 1313-1320, 1984.
- [183] Gogolewski., «Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHB/VA),» *J. Biomed. Mater Res*, vol. 27 (9), pp. 1135-48, 1993.
- [184] U. M. Krishnan, S. Sethuraman y A. Subramanian, «Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration,» *Journal of Biomedical Science*, vol. 16, p. 108, 2009.
- [185] L. Leipziger, B. Glushko y B. Di Bernardo, «Dermal wound repair; role of collagen matrix implants and synthetic polymer dressings,» *J Am Acad Dermatol*, vol. 12, pp. 409-419, 1985.
- [186] M. Megías y P.-., P. M. A. Molist, «Atlas de Histología Vegetal y Animal,» junio 2016. [En línea]. Available: <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>.
- [187] D. J. Modulevsky, «Biocompatibility of Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials,» *PLoS One*, vol. 11, 2016.
- [188] E. Solheim, O. Anfinsen, H. Holmsen y E. Sudmann, «Effect of local hemostatics on platelet aggregation,» *Eur Surg Res*, vol. 23, pp. 45-50, 1991.
- [189] W. Torres-Arreola, R. Pacheco-Aguilar, R. R. Sotelo-Mundo, O. Rouzaud-Sández y J. M. Ezquerro-Brauer, «Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante,» *CYTA - Journal of Food*, vol. 6, nº 2, pp. 101-108, 2009.
- [190] I. Yoshihiro, K. Toru, K. Go, M. Hiroshi, S. Taro y K. Shohta, «Oriented Collagen Scaffolds for Tissue Engineering,» *Materials*, 2012.
- [191] K. Zheng, «Understanding technology adoption in clinical care: clinician adoption behavior of a point-of-care reminder system,» *Int. J. Med. Inf.*, Vols. %1 de %274 (7-8), pp. 535-543, 2005.

- [192] F. O'Brien, B. Harley, M. Waller, I. Yannas, L. Gibson y P. Prendergas, «The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering,» *Technol Health Care*, vol. 15, pp. 3-17, 2007.

7. Anexos

7.1 Informe de Impresión 3D

Informe de Impresión 3D con Materiales No Convencionales



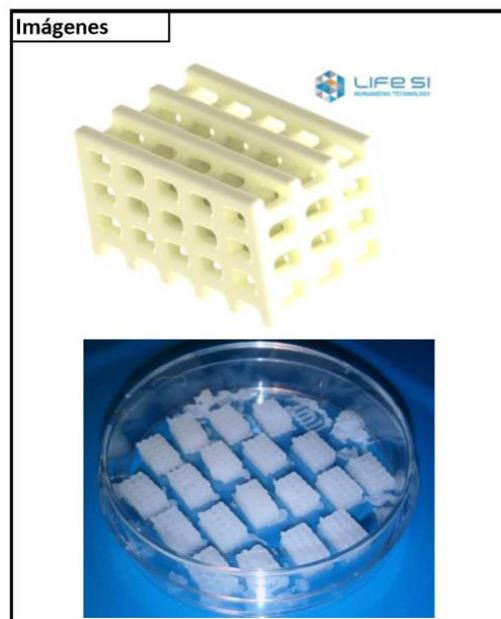
		Código	0002-09-18
		Fecha	03/09/2018
Cliente:	Franco Barezzi	Contacto:	Franco Barezzi
Dirección:	Dto. De Qca. Biológica - FCEFyN-UNC	Tel. de Contacto:	+5492302467560
		Mail de Contacto:	francogastonbarezzi@gmail.com
Material	Gel de Colágeno		

Pre-Procesamiento del Material			
Adición de:			
Agua Dest.		Cantidad	
PBS		Cantidad	
Etanol		Cantidad	
Otro			
Secado:			
Temp.		Tiempo	
Rehidratación:			
Agua Dest.		Cantidad	
PBS		Cantidad	
Etanol		Cantidad	
Otro			

Post-Procesamiento de la Pieza			
Adición de:			
Agua Dest.		Cantidad	
PBS		Cantidad	
Etanol		Cantidad	
Otro			
Secado:			
Temp.		Tiempo	
Rehidratación:			
Agua Dest.		Cantidad	
PBS		Cantidad	
Etanol		Cantidad	
Otro			

Observaciones
Excelente comportamiento del material. Se pudo imprimir de manera seriada sin necesidad de modificaciones en el mismo.

Impresión			
Sistema			
3D-Res			
3Donor			
BP03	X		
Parámetros			
Mat 1st Layer		5	
Mat		2	
Slow		7000	
LH		0.4	
DBD		0.04	
Condiciones			
Temp. Amb.	X		
Temp. Cont.			Temp.
Descartables			
Contenedor		Petri Plástica de 40mm	
Jeringa		3mL	
Aguja		21G	




Aden Díaz Nocera
Firma del Responsable Técnico

7.2 Informe presentado a CICUAL para realización de ensayo de implantación



CICUAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

INFORME PARA EVALUACION DE ACTIVIDADES DE INVESTIGACION, DOCENCIA O SERVICIOS DE TERCEROS QUE INVOLUCREN LA UTILIZACION DE ANIMALES DENTRO DEL AMBITO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA (Resolución 196-HCD-2015)

Ingreso:	Egreso:
----------	---------

El presente formulario reviste carácter de DECLARACION JURADA y tiene por objeto agilizar la presentación de los datos necesarios para la evaluación de su proyecto por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), quien podrá efectuar sugerencias al investigador o docente. Los datos presentados son de carácter confidencial y serán utilizados solo para el mencionado fin.

USO DE LOS ANIMALES: <input type="checkbox"/> Investigación
1. TÍTULO DE: PROYECTO INTEGRADOR DE LA CARRERA DE GRADO DE INGENIERÍA BIOMÉDICA Caracterización física y biológica de andamios impresos 3D de colágeno obtenidos a partir de piel porcina para uso biomédico
2. OBJETIVOS DE LOS ITEMS ANTERIORES (Describir de forma resumida los objetivos que se persiguen): <input type="checkbox"/> Obtención de colágeno a partir de piel porcina, impresión 3D y evaluación de estructura física (porosidad y estructura fibrilar) de los mismos mediante microscopia óptica confocal. <input type="checkbox"/> Caracterización in vitro de andamios de colágeno utilizando ensayos de citotoxicidad y hemocompatibilidad. <input type="checkbox"/> Caracterización in vivo de scaffolds de colágeno, obtenidos de piel porcina e impresos con tecnología 3D, mediante ensayos de pirogenicidad (toxicidad aguda), irritación e implantación. El objetivo de los métodos de ensayo es caracterizar el historial y la evolución de la respuesta del tejido después de la implantación del andamio incluyendo la integración final o la resorción/degradación del constructo.
3. DATOS DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE Asesor de Proyecto Integrador: Nombre: CID, Mariana Paula Cargo: Profesor Asistente/ Investigador Asistente (CONICET) Dirección Personal o Laboral: FCEFyN-UNC-Depto. de Química, Vélez Sarsfield 2000. Te: 0351- 153613972



CICUAL

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Co-asesor de Proyecto Integrador:

Nombre: COMIN, Romina

Cargo: Profesor Asistente/ Investigador Asistente (CONICET)

Dirección Personal o Laboral: FCEFyN-UNC-Depto. de Química, Vélez Sarsfield 2000.

Te: 0351-153540537

Co-asesor de Proyecto Integrador:

Nombre: RIVAROLA, María Angélica

Cargo: Investigador Adjunto (CONICET), INICSA (CONICET-UNC)

Dirección Personal o Laboral: Av. Vélez Sarsfield 299, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Universidad Nacional de Córdoba

Te: (351) 4332100 int 239

3. NOMBRE DE LA FACULTAD/INSTITUTO/DEPARTAMENTO AL QUE PERTENECE EL INVESTIGADOR/DOCENTE:

Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFyN)

- Dpto. de Química, FCEFyN.
- Dpto. de Fisiología Humana, FCEFyN.
- Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (CONICET-UNC). – Universidad Nacional de Córdoba.

4. ENTIDAD QUE FINANCIA O ACREDITA EL PROYECTO (EN CASO QUE LA HUBIERA):

Apoyo Económico Externo a la Facultad: Ninguno.

Apoyo desde los diferentes laboratorios involucrados en provisión de materiales necesarios.

5. DURACIÓN DEL PROYECTO (la CICUAL otorgará su aval, cuando corresponda, por la duración total del proyecto de investigación):

Dentro de los distintos ensayos que se realizarán dentro del Proyecto Integrador, el ensayo in vivo, que involucra el uso de animales tiene una duración programada de 6 semanas.

7. PERSONAS IMPLICADAS EN EL MANEJO DE ANIMALES

NOMBRE Y APELLIDO	INVESTIGADOR/BECARIO/CARGO DOCENTE	ROL EN EL PROYECTO
RIVAROLA, María Angélica	Investigador Adjunto (CONICET), INICSA (CONICET-UNC)	Asesora
BAREZZI, Franco Gastón.	Investigador	Tesista
GONZALVEZ, Ana Belén	Investigador	Tesista



CICUAL

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

8. JUSTIFIQUE EL USO DE ANIMALES EN SU ACTIVIDAD.

Justificamos el uso de animales en esta actividad debido a que la muestra de ensayo que se implantará en el sitio y en la especie animal apropiada tiene como objetivo evaluar la seguridad biológica del material en estudio de acuerdo a normativa ISO 10993-6 (Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación).

9. JUSTIFIQUE EL NÚMERO DE ANIMALES A UTILIZAR DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL Y/O ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Desde el Instituto Ferreyra se trasladaron 8 ratas Wistar, al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Dicho número fue elegido considerando la cantidad de andamios de colágeno impresos 3D disponibles para la realización de los ensayos in vivo.

10. ESPECIE/S QUE SE EMPLEARAN EN EL TRABAJO. Indicar raza, cruza, variedad o cepa, sexo y edad.

Se utilizarán 6 ratas macho derivadas de la cepa Wistar de dos meses de edad.

11. ORIGEN DE LOS ANIMALES. En caso de especies silvestres indique si posee los permisos correspondientes de captura.

Los animales serán suministrados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Mercedes y Martín Ferreyra" según condiciones establecidas.

12. Identifique y describa brevemente las instalaciones donde serán albergados (Cátedra, laboratorio, bioterio, etc.)

Durante todo el procedimiento los animales serán mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, en condiciones ambientales controladas: a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, y ciclo luz - oscuridad (12:12) comenzando la fase de luz a las 7:00 hs, con disponibilidad de agua y comida *ad-libitum*.

Condiciones de alojamiento de los animales

Individuos por jaula: 2

Tipo de jaula: Box

Dimensiones de jaula:

Tipo de agua de bebida: agua corriente

Cama o lecho:

Ventilación:

Temperatura: $22 \pm 1^\circ\text{C}$

Iluminación: ciclo luz-oscuridad (12:12)

Rutina de limpieza y tratamiento de los Desechos: limpieza de jaulas día de por medio o ante alguna notoria suciedad.

Aclaraciones:



CICUAL

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

13. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES A REALIZAR SOBRE LOS ANIMALES. Describir brevemente dichos experimentos (límite máximo 300 palabras)

El procedimiento experimental que se desarrollará sobre los animales será evaluar los efectos locales producidos tras el implante del constructo de colágeno mediante una comparación de la respuesta del tejido causada por una muestra de ensayo y la causada por los materiales de control utilizados, cuyas características de aceptabilidad clínica y biocompatibilidad han sido establecidas.

El objetivo de los métodos de ensayo es caracterizar el historial y la evolución de la respuesta del tejido después de la implantación de los scaffolds incluyendo la integración final o la resorción/degradación del material.

14. Medidas previstas para evitar y/o aliviar el dolor o disminuir el estrés, o facilitar la sujeción (en caso de medidas farmacológicas indicar droga, dosis, vía y frecuencia de administración)

Los animales serán anestesiados con hidrato de cloral 6% (07 ml/100g peso corporal intraperitoneal.). Se administrará profilaxis antibiótica y analgesia (Meloxicam) para el postoperatorio intramuscular.

15. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Los animales serán anestesiados con hidrato de cloral 6% (0,7 ml/100g peso corporal intraperitoneal). Una vez inducida la anestesia se procederá preparar la zona a intervenir (región dorsal) mediante rasurado (afeitado) y lavado con solución antiséptica de yodo povidona (Pervinox).

Se realizarán 4 incisiones, en cada una de ellas se implantará un andamio de Colágeno porcino, obtenido por protocolo de extracción e impreso con tecnología 3D, que posee una estructura enrejada de 8 capas superpuestas y de dimensiones 7x4x4 mm. Dos de los andamios serán anclados al tejido muscular mediante un punto de sutura de Vicryl 4/0, los dos restantes serán implantados directamente sin anclaje.

Una vez finalizado el procedimiento se procederá cerrar las heridas (suturar la piel) mediante puntos sueltos de Vicryl 5/0. Se administrará profilaxis antibiótica y analgesia (Meloxicam) para el postoperatorio.

Terminada la intervención (operación de implante) se esperará a la recuperación anestésica de los animales y se procederá a la evaluación de los mismos según se detalla en la tabla que contiene el protocolo de supervisión diaria de animales, confeccionada según lineamientos establecidos en las guías sobre el uso y cuidado de los animales de experimentación.

16. EUTANASIA

- **Eutanasia programada** (Indique método y/o producto, vía y dosis):

Luego de 4 y 6 semanas respectivamente, de acuerdo a los animales seleccionados, los sujetos experimentales serán eutanasiados. Para este fin los mismos serán sedados con Hidrato de Cloral 6% (0.6ml/100g de peso corporal) y posteriormente decapitados con una guillotina para animales pequeños. El procedimiento será realizado siempre por una persona técnicamente competente y con experiencia, asegurando el uso de una guillotina adecuada y en buen estado. Una vez sedados los animales se sujetarán



CICUAL

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

de una forma segura y se introducirá la cabeza hasta exponer la región cervical a la zona de corte de la guillotina. Cabe destacar que la decapitación se realizará en una habitación separada del resto de las ratas y el instrumental será cuidadosamente limpiado entre cada animal.

Posteriormente, se realizará una incisión longitudinal sobre el dorso y se procederá a la extracción de los implantes (los andamios) con el tejido circundante, aproximadamente de 5 milímetros de diámetro.

17. DESTINO FINAL DE LOS ANIMALES:

¿Los animales serán sacrificados al finalizar la práctica? Si

Indique destino final:

18. ¿Los procedimientos involucran riesgos potenciales para el personal afectado, alumnos o el medioambiente? Si es así indique cuales son y las medidas de control a implementar para minimizar los riesgos.

No.

19. Indique otra información de interés para la evaluación de la CICUAL.

Todas las informaciones consignadas son ciertas a mi entender y saber.

En a los días de de 20...

Firma del Director de proyecto

Firma del responsable

Aclaración y DNI

Aclaración y DNI



CICUAL

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Ingreso:	4 de Julio del 2018.	
Proyecto:	Caracterización física y biológica de andamios impresos 3D de colágeno obtenidos a partir de piel porcina para uso biomédico.	
Responsable	Dra. María Angélica Rivarola.	
Dictamen CICUAL	Este Comité realizó observaciones en la primera versión enviada, las cuales fueron tenidas en cuenta por los investigadores en la versión final del protocolo. El proyecto cumple con las normativas dictadas por este CICUAL en relación al manejo y tratamiento de animales de laboratorio. Se usarán ratas Wistar, las cuales serán mantenidas en el bioterio de la FCEFyN-UNC. De esta manera los procedimientos descriptos siguen las normativas internacionales y nacionales vigentes.	
N° de Acta 20/2018 CICUAL		Fecha: 21 de Noviembre de 2018

De acuerdo al Reglamento vigente Resol. 571-HCD-2014

Firma integrantes CICUAL presentes:

Dra. M. Defagó

Dra. A. Hued

Dra. J. Kembro

7.3 Tabla de valoración del dolor desarrollada por NC3Rs



**NC
3Rs**

National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals in Research

The Rat Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in rats.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Rat Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
<p>Orbital tightening</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) ▪ A wrinkle may be visible around the eye 			
<p>Nose/cheek flattening</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Flattening and elongation of the bridge of the nose ▪ Flattening of the cheeks (potentially sunken look) 			
<p>Ear changes</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ears curl inwards and are angled forward to form a 'pointed' shape ▪ Space between the ears increases 			
<p>Whisker change</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Whiskers stiffen and angle along the face ▪ Whiskers may 'clump' together ▪ Whiskers lose their natural 'downward' curve 			

Read the original paper:
Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JCS, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 7: 55. doi:10.1186/1744-8069-7-55

For guidance on using the Rat Grimace Scale, research papers that underpin this technique, and for grimace scales in other species, visit: www.nc3rs.org.uk/grimacescales.
To request copies of this poster, please email: enquiries@nc3rs.org.uk
The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at: www.nc3rs.org.uk/resources
Images kindly provided by Dr Jeffrey Mogil, McGill University

7.4 Dimensiones de andamios no liofilizados

Ancho [mm]							
Andamio	Medición n°1	Medición n°2	Medición n°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	5	5	5,1	5,03	0,06	0,03	5,03±0,03
2	4,8	5,2	5,2	5,07	0,23	0,13	5,07±0,13
3	5	5,2	5,2	5,13	0,12	0,07	5,13±0,07
4	5	5	5,2	5,07	0,12	0,07	5,07±0,07
5	4,9	5,1	5,2	5,07	0,15	0,09	5,07±0,09
6	4,4	5,2	5,2	4,93	0,46	0,27	4,93±0,27
7	5,3	5,4	5,3	5,33	0,06	0,03	5,33±0,05
8	5,3	5,2	5,1	5,2	0,1	0,06	5,20±0,06
9	5	5	5,2	5,07	0,12	0,07	5,07±0,07
10	5,4	5,3	5,3	5,33	0,06	0,03	5,33±0,05
11	5,5	5,5	5,3	5,43	0,12	0,07	5,43±0,07
12	4,6	5,2	5,2	5	0,35	0,2	5,00±0,20
13	4,7	5	5,4	5,03	0,35	0,2	5,03±0,20
14	5,1	5,4	5,1	5,2	0,17	0,1	5,20±0,10
15	4,8	5,3	5,2	5,1	0,26	0,15	5,10±0,15
16	4	5,2	5,2	4,8	0,69	0,4	4,80±0,40
17	5	5	5,8	5,27	0,46	0,27	5,27±0,27
18	4,4	5,2	5,2	4,93	0,46	0,27	4,93±0,27
19	4,7	5,2	5,3	5,07	0,32	0,19	5,07±0,19
20	5	5,3	5,4	5,23	0,21	0,12	5,23±0,12
21	4,1	5,2	5,2	4,83	0,64	0,37	4,83±0,37
22	4,9	5,3	5,3	5,17	0,23	0,13	5,17±0,13
23	5	5,1	5,2	5,1	0,1	0,06	5,10±0,06
24	4,8	5,1	5,2	5,03	0,21	0,12	5,03±0,12
25	4,1	5,3	5,3	4,9	0,69	0,4	4,90±0,40
26	4,9	5,1	5,2	5,07	0,15	0,09	5,07±0,09
27	5,1	5,3	5,3	5,23	0,12	0,07	5,23±0,07
28	5,1	5,3	5,1	5,17	0,12	0,07	5,17±0,07
29	5	5,2	5,3	5,17	0,15	0,09	5,17±0,09
30	5	5,2	5,2	5,13	0,12	0,07	5,13±0,07
31	5,1	5,2	5,4	5,23	0,15	0,09	5,23±0,09
32	4,8	5,1	5,1	5	0,17	0,1	5,00±0,10
33	4,8	5,3	5,4	5,17	0,32	0,19	5,17±0,19
34	5,1	5,3	5,3	5,23	0,12	0,07	5,23±0,07
35	4,9	5,3	5,5	5,23	0,31	0,18	5,23±0,18
36	4,6	5,2	5,2	5	0,35	0,2	5,00±0,20
Total				5,11	0,14	0,02	5,11±0,02

Tabla 13. Mediciones del ancho [mm] de los andamios impresos expresados como media ± error asociado.

Largo [mm]							
Andamio	Medición n°1	Medición n°2	Medición n°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	6,9	8	8	7,63	0,64	0,37	7,63±0,37
2	6,7	8	8	7,57	0,75	0,43	7,57±0,43
3	7,7	8,1	8	7,93	0,21	0,12	7,93±0,12
4	7,6	8,2	8,1	7,97	0,32	0,19	7,97±0,19
5	6,9	8,1	8	7,67	0,67	0,38	7,67±0,38
6	6,7	7,3	8	7,33	0,65	0,38	7,33±0,38
7	7	8,2	8,1	7,77	0,67	0,38	7,77±0,38
8	6,8	8	7,8	7,53	0,64	0,37	7,53±0,37
9	7,8	7,5	7,8	7,7	0,17	0,1	7,70±0,10
10	7	7,7	8,2	7,63	0,6	0,35	7,63±0,35
11	8	8,2	8,2	8,13	0,12	0,07	8,13±0,07
12	6,8	7,7	8	7,5	0,62	0,36	7,50±0,36
13	7,6	8	8,3	7,97	0,35	0,2	7,97±0,20
14	7	8,2	8,3	7,83	0,72	0,42	7,83±0,42
15	7,9	8	8,1	8	0,1	0,06	8,00±0,06
16	7,2	8,1	8	7,77	0,49	0,28	7,77±0,28
17	7,8	8	8,4	8,07	0,31	0,18	8,07±0,18
18	7,1	8,2	8,2	7,83	0,64	0,37	7,83±0,37
19	7,6	8,2	8,3	8,03	0,38	0,22	8,03±0,22
20	8	8,1	8,4	8,17	0,21	0,12	8,17±0,12
21	7	8,1	8	7,7	0,61	0,35	7,70±0,35
22	7,1	7,8	8	7,63	0,47	0,27	7,63±0,27
23	6,7	8,1	8,1	7,63	0,81	0,47	7,63±0,47
24	7	7,3	8	7,43	0,51	0,3	7,43±0,30
25	7,2	8	8,1	7,77	0,49	0,28	7,77±0,28
26	7	8	8,2	7,73	0,64	0,37	7,73±0,37
27	8	8,2	8,3	8,17	0,15	0,09	8,17±0,09
28	7,7	8	8,3	8	0,3	0,17	8,00±0,17
29	8	8,2	8	8,07	0,12	0,07	8,07±0,07
30	7	7,5	7,5	7,33	0,29	0,17	7,33±0,17
31	7	8	8	7,67	0,58	0,33	7,67±0,33
32	6,8	8,2	8	7,67	0,76	0,44	7,67±0,44
33	7,3	8,2	8,2	7,9	0,52	0,3	7,90±0,30
34	7,6	8	8	7,87	0,23	0,13	7,87±0,13
35	7,2	8	8,2	7,8	0,53	0,31	7,80±0,31
36	6,9	8	8	7,63	0,64	0,37	7,63±0,37
Total				7,78	0,22	0,04	7,78±0,04

Tabla 14. Mediciones del largo [mm] de los andamios impresos expresados como media ± error asociado.

Caracterización física y biológica de andamios impresos 3D de colágeno obtenidos a partir de piel porcina para uso biomédico

Altura [mm]							
Andamio	Medición n°1	Medición n°2	Medición n°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	3,5	3,2	3,3	3,33	0,15	0,09	3,33±0,09
2	3,4	3	3	3,13	0,23	0,13	3,13±0,13
3	3,2	3	3,3	3,17	0,15	0,09	3,17±0,09
4	3,3	3,2	3,2	3,23	0,06	0,03	3,23±0,05
5	3	3,1	3	3,03	0,06	0,03	3,03±0,05
6	3	3	3	3	0	0	3,00±0,05
7	3,1	3,1	3,2	3,13	0,06	0,03	3,13±0,05
8	3	2,8	3	2,93	0,12	0,07	2,93±0,07
9	3	3	3	3	0	0	3,00±0,05
10	3,1	3	3,2	3,1	0,1	0,06	3,10±0,06
11	2,5	3	2,7	2,73	0,25	0,15	2,73±0,15
12	3,1	3	3	3,03	0,06	0,03	3,03±0,05
13	3,2	3,1	3,3	3,2	0,1	0,06	3,20±0,06
14	3	3,1	3	3,03	0,06	0,03	3,03±0,05
15	3	2,8	3	2,93	0,12	0,07	2,93±0,07
16	3	2,8	3,1	2,97	0,15	0,09	2,97±0,09
17	3,1	3,2	3	3,1	0,1	0,06	3,10±0,06
18	2,5	2,7	3	2,73	0,25	0,15	2,73±0,15
19	2,5	3	3,2	2,9	0,36	0,21	2,90±0,21
20	3,4	3,2	3,1	3,23	0,15	0,09	3,23±0,09
21	3,1	3	3,3	3,13	0,15	0,09	3,13±0,09
22	3,1	3,1	3,2	3,13	0,06	0,03	3,13±0,05
23	3,3	3	3	3,1	0,17	0,1	3,10±0,10
24	3,1	3,2	3,2	3,17	0,06	0,03	3,17±0,03
25	3,1	3	3,3	3,13	0,15	0,09	3,13±0,09
26	3,3	3	3,4	3,23	0,21	0,12	3,23±0,12
27	3,2	3,2	3	3,13	0,12	0,07	3,13±0,07
28	2,5	2,1	2,3	2,3	0,2	0,12	2,30±0,12
29	3,1	3	3	3,03	0,06	0,03	3,03±0,03
30	3,2	3,1	3	3,1	0,1	0,06	3,10±0,06
31	3	3	3	3	0	0	3,00±0,05
32	3,5	3,4	3,3	3,4	0,1	0,06	3,40±0,06
33	3	3,1	3	3,03	0,06	0,03	3,03±0,05
34	3	3	2,3	2,77	0,4	0,23	2,77±0,23
35	3,3	3,3	3,3	3,3	0	0	3,30±0,05
36	3,3	2,8	3,2	3,1	0,26	0,15	3,10±0,15
Total				3,06	0,2	0,03	3,06±0,05

Tabla 15. Altura [mm] de los andamios impresos expresados como media ± error estándar asociado.

7.5 Dimensiones de andamios liofilizados

Ancho [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	4,7	4,70	5	4,80	0,17	0,10	4,80±0,10
2	5,20	5,30	5,20	5,23	0,06	0,03	5,23±0,05
3	5,10	5,20	5	5,10	0,10	0,06	5,10±0,06
4	5,10	5,2	5,10	5,13	0,06	0,03	5,13±0,05
5	4,50	4,60	4,50	4,53	0,06	0,03	4,53±0,05
6	5	5,00	5,10	5,03	0,06	0,03	5,03±0,05
7	5,20	5,10	5,20	5,17	0,06	0,03	5,17±0,05
8	5,10	5,20	5,10	5,13	0,06	0,03	5,13±0,05
9	5	5	4,90	4,97	0,06	0,03	4,97±0,05
10	5,20	5,10	5,20	5,17	0,06	0,03	5,17±0,05
11	5,10	5,20	5,20	5,17	0,06	0,03	5,17±0,05
Total				5,04	0,21	0,06	5,04±0,06

Tabla 16. Ancho [mm] de los andamios impresos liofilizados expresados como media ± error estándar asociado.

Largo [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	7,3	7,5	7,4	7,4	0,1	0,06	7,40±0,06
2	8	8	8	8	0	0	8,00±0,05
3	7,6	7,6	7,4	7,53	0,12	0,07	7,40±0,07
4	8	8	8	8	0	0	8,00±0,05
5	7,4	7,5	7,4	7,43	0,06	0,03	7,40±0,05
6	7,2	7,1	7,1	7,13	0,06	0,03	7,10±0,05
7	8,1	8	8	8,03	0,06	0,03	8,00±0,05
8	7,3	7,3	7,3	7,3	0	0	7,30±0,05
9	7,2	7,3	7,4	7,3	0,1	0,06	7,40±0,06
10	7,3	7,3	7,2	7,27	0,06	0,03	7,20±0,05
11	8	8	8,1	8,03	0,06	0,03	8,10±0,05
Total				7,58	0,36	0,1	7,58±0,10

Tabla 17. Largo [mm] de los andamios impresos liofilizados expresados como media ± error estándar asociado.

Caracterización física y biológica de andamios impresos 3D de colágeno obtenidos a partir de piel porcina para uso biomédico

Altura [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvio Estandar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	3	3,1	3	3,03	0,06	0,03	3,03±0,05
2	2,5	2,5	2,6	2,53	0,06	0,03	2,53±0,05
3	2,8	2,7	2,7	2,73	0,06	0,03	2,73±0,05
4	3,2	3,3	3,2	3,23	0,06	0,03	3,23±0,05
5	2,3	2,4	2,4	2,37	0,06	0,03	2,37±0,05
6	2,4	2,3	2,5	2,4	0,1	0,06	2,40±0,06
7	2,7	2,6	3	2,77	0,21	0,12	2,77±0,12
8	2,4	2,4	2,3	2,37	0,06	0,03	2,37±0,05
9	2,4	2,4	2,3	2,37	0,06	0,03	2,37±0,05
10	2,3	2,2	2,2	2,23	0,06	0,03	2,23±0,05
11	2,3	2,3	2,3	2,3	0	0	2,30±0,05
Total				2,58	0,33	0,09	2,54±0,05

Tabla 18. Alto [mm] de los andamios impresos liofilizados expresados como media ± error asociado.

7.6 Dimensiones de andamios inmersos en medio de cultivo

Ancho [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	5,10	5,10	5,20	5,13	0,06	0,03	5,13±0,16
2	5	5	5,10	5,03	0,06	0,03	5,03±0,06
Total				5,08	0,07	0,05	5,08±0,05

Tabla 19. Ancho [mm] de los andamios impresos liofilizados e inmersos en medio de cultivo, expresados como media ± error asociado.

Largo [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	8	8	8,1	8,03	0,06	0,03	8,03±0,05
2	7,4	7,5	7,4	7,43	0,06	0,03	7,43±0,05
Total				7,73	0,42	0,29	7,73±0,29

Tabla 20. Largo [mm] de los andamios impresos liofilizados e inmersos en medio de cultivo, expresados como media ± error asociado.

Altura [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	1,9	2	1,9	1,93	0,06	0,03	1,93±0,05
2	2	2	2,1	2,03	0,06	0,03	2,03±0,05
Total				1,98	0,07	0,05	1,98±0,05

Tabla 21. Alto [mm] de los andamios impresos liofilizados e inmersos en medio de cultivo, expresados como media ± error asociado.

7.7 Dimensiones de los andamios hidratados con PBS

Ancho [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	5	5,2	5,2	5,13	0,12	0,07	5,13±0,07
2	5,2	5,2	5,2	5,2	0	0	5,2±0,0
3	5,4	5,4	5,3	5,37	0,06	0,03	5,37±0,03
Total				5,23	0,12	0,07	5,23±0,07

Tabla 22. Ancho [mm] de los andamios impresos liofilizados e hidratados con PBS, expresados como media \pm error asociado.

Largo [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	7,4	7,7	7,2	7,43	0,25	0,15	7,43±0,15
2	7,4	7,7	7,4	7,5	0,17	0,1	7,5±0,10
3	8,3	8	8,2	8,17	0,15	0,09	8,17±0,09
Total				7,7	0,41	0,24	7,7±0,24

Tabla 23. Largo [mm] de los andamios impresos liofilizados e hidratados con PBS, expresados como media \pm error asociado.

Altura [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	3,1	3,1	3	3,07	0,06	0,03	3,07±0,03
2	3,2	3	3	3,07	0,12	0,07	3,07±0,07
3	3	3,3	3,2	3,17	0,15	0,09	3,17±0,09
Total				3,1	0,06	0,03	3,10±0,03

Tabla 24. Alto [mm] de los andamios impresos liofilizados e hidratados con PBS, expresados como media \pm error asociado.

7.8 Dimensiones de los andamios sometidos a cultivo celular

Ancho [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	5,2	5,2	5,3	5,2	0,1	0,06	5,20±0,06
2	5,1	5,2	5,2	5,2	0,1	0,06	5,20±0,06
3	5,3	5,4	5,4	5,4	0,1	0,06	5,40±0,06
Total				5,26	0,1	0,06	5,26±0,06

Tabla 25. Ancho [mm] de los andamios impresos liofilizados e incubados en cultivo celular, expresados como media ± error asociado.

Largo [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	8	8,2	8	8,1	0,1	0,06	8,10±0,06
2	8,2	8,2	8,3	8,2	0,1	0,06	8,20±0,06
3	8,4	8,2	8,2	8,3	0,1	0,06	8,30±0,06
Total				8,19	0,1	0,06	8,19±0,06

Tabla 26. Largo [mm] de los andamios impresos liofilizados e incubados en cultivo celular, expresados como media ± error asociado.

Altura [mm]							
Andamio	Medición N° 1	Medición N°2	Medición N°3	Media	Desvío Estándar	Error Estándar Asociado	Resultado
1	3	2,8	3	2,9	0,1	0,06	2,90±0,06
2	3	3	3,1	3	0,1	0,06	3,00±0,06
3	3,2	3,1	3,2	3,2	0,1	0,06	3,20±0,06
Total				3,04	0,12	0,07	3,04±0,07

Tabla 27. Alto [mm] de los andamios impresos liofilizados e incubados en cultivo celular, expresados como media ± error asociado.

7.9 Registros de temperatura corporal, peso y estado general

Edad de los animales [días]	Rata N°1 [°C]	Rata N°2 [°C]	Rata N°4 [°C]	Rata N°5 [°C]	Rata N°6 [°C]	Rata N°7 [°C]	Referencias
66	35,4	35,8	36,1	35,8	35,9	35,2	Cirugía Ratas 1, 2
85	37,1	36,1	36,1	37,9	36	36,9	Cirugía Ratas 4, 5
90	35,7	35,7	35,7	34,6	35,8	36,6	Cirugía Ratas 6 y 7
92	36,3	36,9	36,7	37,3	37,7	38,7	Eutanasia
93	35,5	36,9	37	36,1	37,1	35,9	
94	36	35,9	35,9	35,6	34,5	34,8	
96	36	36	36,1	35,4	36,8	36,8	
97	36,2	36	36	36	36,2	36	
98	36,5	37	35,8	36,4	35,8	35,4	
99	36,1	36	36,9	37,1	36,1	35,9	
100	36,5	36,9	35,6	37,4	36,7	37,4	
101	36,2	37,1	36	37,1	37,4	36,9	
102	35,8	36,1	36,2	36,7	35,7	38,1	
103	36,2	37,3	36,2	37	37,4	36,1	
104	35,1	35,4	35,1	35,8	36,8	36,4	
105	36,9	37,6	37,1	36,3	36,4	37,1	
106	34,9	36,3	38,4	36,8	36,4	38	
107	35,4	35,6	36,1	36,4	37,3	36,1	
109	36,4	36,7	36,1	38,3	36,1	34,5	
110	35,4	34,7	36,3	38,3	35,6	35,3	
111	35,1	35,2	37,1	37,4	35,6	37,4	
112	35,8	35,3	36,3	36,6	35,2	36,1	
113	36,4	37,6	35,8	35,3	37,2	35,3	
116	36,4	36,2	36,4	37,7	35,3	35,3	
117	35,4	36	37,1	35,2	36	35,7	
118	35,8	35,6	35,3	36,7	35,2	36,4	
119	35,8	36	37,7	37,3	35,6	37,4	
120	35,8	37,1	37,7	36,5	36,6	35,9	
121	35,3	36,8	38,1	36,4	35,1	37,4	
123	36	36,5	37	35,8	36,3	36,6	
124	37,7	36,5	37,6	37,6	37	36,7	
125	36,7	37	36,9	36,7	36,4	37	
126			36,7	36,4		37	
127			36,7	36,6		36,7	
128			37,4	37,5		36,6	
130			37,3	37,4		36,2	
131			36,7	36,9		36,3	
132			36	36,3		36,7	
133			36,3	36,8		36,7	
134			36,4	37		36,6	
135			36,3	36,9		36	
136			36,7	36,4		36,6	
138			36,5	36,4		36,2	
139			36,4	36,6		36,4	
140			37,3	36,7		35,8	
141			36,5	37,2		36,4	
144			36,2	36,2		36,4	
146			36,3	36,3		36,5	
149			36,3	36,4		36,4	
154			36,4	36,3		36,4	
Temperatura durante periodo de ensayo	36	36,3	36,5	36,6	36,2	36,4	
Desvío Estándar	0,6	0,7	0,8	0,9	0,8	1	
Error Estándar Asociado	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	
Resultado	36,0±0,1	36,3±0,1	36,5±0,1	36,6±0,2	36,2±0,1	36,4±0,2	

Tabla 28. Temperatura de los animales ensayados hasta el día de su eutanasia.