

Collagen obtaining for 3D printing to create biological substitutes for biomedical applications

Adragna C.¹, Jurczyszyn S.¹, Comín R.², Díaz Nocera A.¹, Salvatierra N.A.² and Cid M.P.²

¹Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

²Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba; Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, IIBYT (CONICET-UNC), Córdoba, Argentina.

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

A simple and economical method is developed for collagen purification starting from porcine skin through treatments with acidic and salt solutions, which preserve the structure of the fibers unlike normally used enzymatic procedures which denature the protein. Characterization and quantification through spectrophotometry and denaturing electrophoresis allowed to verify the effectiveness of this method for obtaining highly pure type I collagen; and rheometric studies indicated the viscosity of the material was suitable for 3D printing applications. A collagen bioink was prepared, which presented appropriated viscosity and stability for printing complex-structured 3D scaffolds with an extrusion bioprinter. A physical characterization of the printed scaffolds was performed through porosity and water swelling assays and cytocompatibility according to the ISO Standard 10993, part 5-2009, indicating that they aren't cytotoxic, as it is show in this work. This leaves the door open for subsequent studies oriented to cell culture experiments and *in vivo* analysis with the collagen printed scaffolds.

Keywords— Collagen, 3D Print, Tissue Engineering, Scaffold, Characterization, Porcine skin.

Resumen— Los andamios biodegradables con estructura tridimensional porosa son la base para la regeneración tisular, siendo componentes fundamentales para la ingeniería de tejidos; sobre ellos se realizan cultivos celulares para producir sustitutos biológicos que restauren o reparen daños en tejidos u órgano. El colágeno es el principal constituyente proteico de la matriz extracelular humana y posee una estructura que favorece la unión, migración y en ciertos casos la diferenciación de las células, siendo uno de los materiales más estudiados para el desarrollo de andamios. Sin embargo, su uso para fabricar estructuras tridimensionales con porosidad controlada, diseñadas para permitir la adhesión y migración de células en su interior y una difusión de oxígeno y nutrientes adecuada, ha sido limitado debido a su difícil procesabilidad mediante tecnologías de construcción capa por capa. En el presente trabajo se propone la impresión tridimensional de andamios de colágeno altamente porosos para uso biomédico. Para ello se desarrolla un método sencillo y relativamente económico para la purificación de colágeno tipo I de piel porcina a partir de tratamientos con soluciones ácidas y sales, que preservan la estructura de las fibras a diferencia de procedimientos enzimáticos normalmente usados, que desnaturalizan la proteína. El proceso llevado a cabo permitió la purificación, caracterización y cuantificación del colágeno mediante espectrofotometría y electroforesis desnaturalizante; y a través de un estudio reométrico se analizó su viscosidad. Con el colágeno se preparó una biotinta que permitió una extrusión homogénea por la bioimpresora y presentó viscosidad y estabilidad suficientes para la impresión de andamios tridimensionales. Se hizo una caracterización mediante microscopía electrónica de barrido, ensayos de hinchamiento de agua, porosidad y difracción de rayos X; además se comprobó la citocompatibilidad mediante un ensayo de citotoxicidad sugerido por Norma ISO 10993, parte 5-2009, y se realizaron cultivos celulares sobre los andamios para analizar el crecimiento y migración de las células en los mismos.

Palabras clave— Colágeno, Impresión 3D, Ingeniería de tejidos, Andamio, Caracterización, Piel Porcina.

I. INTRODUCCIÓN

La necesidad actual de reemplazo, reparación y regeneración de órganos y tejidos para pacientes se encuentra en continuo crecimiento, tal que los suministros disponibles no cubren la demanda existente;

debido principalmente a la falta de donantes, y a problemas de compatibilidad que llevan al rechazo de trasplantes. Para superar estas desventajas, se han investigado el uso de andamios biocompatibles como alternativa al trasplante [1]. Estos andamios son diseñados de modo que imiten la matriz extracelular, proveyendo soporte estructural y promoviendo la unión, proliferación y diferenciación celular, con la meta de formar tejidos u órganos funcionales. Uno de los principales métodos detrás de la ingeniería de tejidos

implica el cultivo de células *in vitro* para generar un tejido tridimensional (3D) o un órgano [2]. Las células por sí mismas carecen de la capacidad de crecer en orientaciones 3D y así definir la forma anatómica del tejido; sino que emigran aleatoriamente para formar una capa bidimensional (2D). Los tejidos tridimensionales necesarios se consiguen entonces sembrando las células en matrices porosas conocidas como andamios, a los cuales las células se unen y colonizan [3,4]. El andamio asume el rol de una matriz extracelular (MEC) artificial, promoviendo la unión, proliferación y diferenciación celular, y debiendo imitar las propiedades biomecánicas del órgano o tejido a ser reemplazado, por lo que tanto el material empleado como la estructura 3D del andamio tienen un efecto significativo sobre la actividad celular [1-3].

El colágeno es la proteína más abundante dentro de la MEC de los tejidos conectivos tales como piel, hueso, cartílago y tendón de los mamíferos y comprende más del 90% de su peso seco. El colágeno estructural primario en tejidos de mamíferos es el colágeno tipo I; esta proteína ha sido bien caracterizada y es omnipresente a través de especies animales y vegetales. Ofrece baja inmunogenicidad, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, interactúa específicamente con otras biomoléculas, contiene secuencias específicas que median la regulación de la morfología, adhesión, migración y diferenciación de células, propiedades que han llevado a su utilización como biomaterial para aplicaciones médicas actuales y para el desarrollo de productos de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, como vehículos de suministro, membranas y películas utilizadas para guiar la regeneración de tejidos, y andamios 3D porosos adecuados para regeneración tisular [5-7]. Varios de estos andamios biológicos (por ejemplo, los derivados de piel) han sido utilizados en estudios preclínicos y aplicaciones clínicas [8].

Se han desarrollado varias técnicas para procesar andamios 3D altamente porosos, que facilitan la distribución celular, guían su crecimiento, pero la mayoría crean matrices con macro y microarquitecturas inconsistentes, con una porosidad aleatoria y control insuficiente de los parámetros relevantes (tamaño de poro e interconectividad) [9-11]. En los últimos años, en el desarrollo de andamios para ingeniería en tejidos han ganado importancia las técnicas de impresión 3D como una tecnología avanzada para superar estas limitaciones; permitiendo crear estructuras de andamios definidas con tamaño de poro e interconectividad controlados, y con capacidad de soportar el crecimiento celular y formación de tejido, pudiendo producir andamios capaces de promover la regeneración de tejidos más efectivamente [9;11;12].

Aunque numerosos estudios demuestran que andamios basados en colágeno son por mucho los más prometedores en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa [13], su uso para fabricar estructuras 3D reproducibles y con porosidad controlada ha sido limitado debido a su baja procesabilidad mediante tecnologías 3D [14]. El entrecruzamiento mediante métodos físicos o químicos puede mejorar las propiedades mecánicas de dichos andamios; también suele combinarse el colágeno con otros polímeros para tal fin [15].

A. Colágeno como biomaterial.

La versatilidad del colágeno como material se debe

principalmente a su compleja estructura jerárquica desde la nanoescala a la macroescala [16].

El modelo de la estructura del colágeno tiene como unidad básica la molécula de tropocolágeno, que consiste en una triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas α levógiros. En la isoforma colágeno tipo I, dos cadenas α son idénticas, y la tercera tiene una secuencia levemente distinta, enrollándose en una hélice que tiene una longitud de 300nm, un diámetro de 1.5nm y un peso molecular de 300kDa. Su estabilidad se debe principalmente a los entrecruzamientos intermoleculares [17]

Los colágenos tipo I alogénicos y xenogénicos han sido reconocidos como una fuente de andamios biocompatibles útil con bajo potencial antigénico. El colágeno tipo I se extrae mediante procedimientos enzimáticos o con soluciones ácidas de tejidos de origen mamífero (principalmente bovino y porcino) ricos en la proteína fibrosa, como piel y tendón [18]. Normalmente el colágeno extraído es mayormente soluble; las fibras de colágeno luego pueden reconstituirse *in vitro* [5]. Las técnicas más populares involucran la extracción proteolítica con pepsina, sin embargo, cabe destacar que la misma altera la estructura molecular del colágeno al eliminar las regiones terminales telopeptídicas, resultando en una disminución del autoensamblaje de fibrillas y desnaturalización de las proteínas [7].

B. Impresión 3D

Estas tecnologías fabrican un objeto tridimensional aplicando el diseño asistido por computadora y ayuda asistida por computadora (CAD y CAM) para construir estructuras complejas superponiendo una serie de cortes 2D con propiedades definidas, es decir, secciones transversales diseñadas por CAD que la máquina usa como guías para imprimir, y son agregadas capa por capa de abajo hacia arriba [19][3]. La impresión 3D permite una alta reproducibilidad de la arquitectura y control de la microestructura del andamio, pudiendo diseñar estructuras de andamios capaces de imitar las complejas estructuras de la MEC, y de esta forma proveer un microambiente para la adhesión celular y posterior proliferación, distribución y diferenciación con la capacidad de soportar el crecimiento celular y formación de tejido[20-22]. La tecnología de extrusión es de las más avanzadas debido a la posibilidad de deposición con alta precisión y la capacidad de poder emplear diferentes biomateriales[23, 24].

Para ser una opción viable, el material debe ser fácil de manipular por la tecnología de la impresora para ser dispensado en estructuras tridimensionales complejas, y proveer soporte estructural al constructo; pudiendo ser imprimibles con un alto grado de reproducibilidad, y manipulables para formar la morfología deseada de los andamios diseñados [25]. Los principales parámetros fisicoquímicos que determinan la capacidad de un gel para ser impreso en 3D son sus propiedades reológicas y mecanismos de entrecruzamiento. La microextrusión permite incorporar materiales altamente viscosos para mantener la forma después de su deposición; el proceso es compatible con viscosidades dentro de un amplio rango, desde 30 mPa/s a más de 6×10^7 mPa/s [24, 26, 27]. Las propiedades reológicas del material pueden ser adaptadas para que las extrusiones mantengan su forma; hidrogeles de polímeros naturales, como el colágeno, son difícil de manipular, pero su bioactividad innata hace a estos

materiales los más atractivos, siendo los más estudiados en investigaciones de bioimpresión, por lo que se han trabajado combinaciones de polímeros sintéticos y naturales para mejorar la resistencia mecánica de los hidrogeles [28, 29, 25].

C. Andamios basados en colágeno

Andamios fabricados a partir de colágeno, con una porosidad mayor al 90% y tamaños de poro entre 100-150mm han sido ampliamente usados para ingeniería de tejidos en cartílago, hueso, hígado, piel y tejido cardíaco [30].

Los andamios porosos tridimensionales de colágeno se han fabricado usando métodos de liofilización y evaporación en punto crítico; sin embargo, las esponjas obtenidas permiten un transporte limitado de oxígeno y nutrientes profundamente dentro del andamio, y consecuentemente no pueden soportar el crecimiento de tejidos mayores a 500µm de grosor [14]. Aunque tiene enorme potencial como un buen biomaterial, su procesabilidad mediante métodos de impresión es limitada debido a la naturaleza extremadamente hidrofílica del colágeno y su baja viscosidad a temperatura ambiente [14, 31]. Muy pocos estudios fueron realizados y tres estrategias han sido reportadas hasta ahora. En primer lugar, se utilizó un método indirecto, fabricando moldes negativos de sacrificio con un tamaño y forma específicos, en el cual se vertió el material de colágeno poco viscoso [32, 33]. En segundo lugar, Ahn y su grupo de trabajo [14] desarrollaron una impresión criogénica directa que permitió la deposición de solución de colágeno de baja viscosidad a temperaturas bajo cero. Por último, el grupo de trabajo de Lode [31] imprimió una dispersión de colágeno altamente viscosa para la fabricación de andamios 3D por impresión directa a temperatura ambiente. Los experimentos in vitro con distintas líneas celulares realizados por los grupos mencionados confirmaron la idoneidad del colágeno como excelente portador de células, mostrando que los andamios actuaron favoreciendo la adhesión inicial, y proliferación de las células.

Otras estrategias para generar andamios 3D con colágeno estables usando técnicas 3D se basan en la combinación de colágeno poco viscoso con otro material que proporciona la fuerza mecánica deseada, como andamios híbridos que consisten en colágeno y polímeros termoplásticos sintéticos (policaprolactona, poli (ácido láctico-co-glicólico)) fabricados por extrusión multicanal[29] o la modificación superficial con colágeno de andamios de policaprolactona, fabricados por sinterización láser selectiva[34]. En estos casos, las propiedades que permiten la impresión las proporciona el segundo componente.

En el presente trabajo, en cambio, se trabaja en la obtención de una biotinta consistente en fibras de colágeno insoluble y de alta viscosidad, para la fabricación de andamios 3D mediante impresión directa a temperatura ambiente.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Protocolo de purificación de colágeno

Se extrajo el colágeno a partir de piel porcina, modificando el método descrito por Ghodbane y cols (50). Brevemente, se colocó en frascos estériles con etanol piel porcina comprada a un proveedor y se almacenaron los

mismos. Se seccionó el tejido en piezas de aproximadamente 1 cm; las mismas se congelaron, liofilizaron y rallaron manualmente, realizando cuatro partidas de tejido procesado.

Los fragmentos de piel obtenidos se sometieron a 12 tratamientos consecutivos de 24 h cada uno: seis tratamientos de fosfato de sodio 0.211M, dos tratamientos de cloruro de sodio 0.48M, dos tratamientos de buffer de citrato 0.225M (pH 3.7) y dos tratamientos de ácido acético de 0.175M. Después de cada tratamiento, cada muestra se centrifugó a 800xg durante 15min, se eliminó el sobrenadante, se añadieron 500 ml de agua deionizada sobre el precipitado y se colocó en agitación suave durante 15min. Luego dicha solución fue centrifugada una vez más y se eliminó el agua para añadir la solución del tratamiento siguiente; y tras 15 min de agitación la muestra se almacenó a 4°C. Una vez completos los 12 tratamientos las muestras se lavaron cuatro veces con agua deionizada, se congelaron y liofilizaron. Las muestras se almacenaron en freezer a -20 °C. Se sintetiza el proceso descrito en el esquema de la Fig. 1. El rendimiento de este procedimiento se definió como la relación porcentual entre el peso final de la muestra liofilizada y el peso inicial de la piel liofilizada procesada.

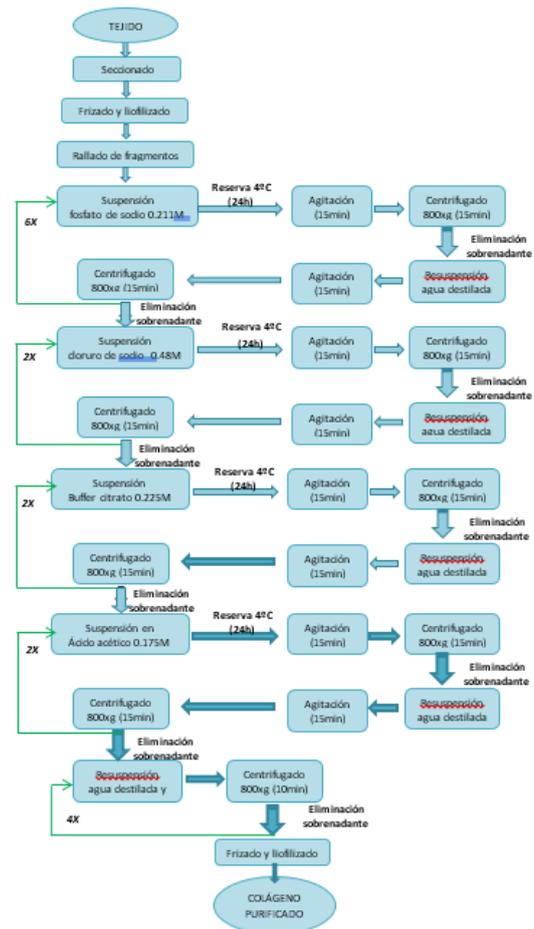


Fig. 1: Esquema del protocolo desarrollado para la purificación de colágeno tipo I de piel porcina.

B. Cuantificación y Caracterización del colágeno

1. Cuantificación de Proteína Total

Se cuantificó la cantidad de proteína total utilizando un método descrito por Komsa-Penkova (1996) [35], a través de la medición de su absorbancia. Este método es una modificación de la técnica de Lowry [36] que permite

cuantificar proteínas fibrilares como el colágeno que no se solubilizan con el método convencional. Se utilizó colágeno tipo I comercial (Sigma St. Louis, USA) como estándar.

Se tomaron muestras representativas de cada una de las cuatro tandas de colágeno liofilizado obtenido con el protocolo descrito anteriormente. Se procedió a pesar con una balanza de precisión la cantidad de miligramos de cada muestra y se hicieron las diluciones correspondientes con agua deionizada, de modo que las soluciones tuviesen la misma concentración (0,93mg de esponja/ml). Para ello se cortaron con bisturí los liofilizados en fragmentos pequeños y homogeneizaron intensivamente durante 4h. Con el colágeno testigo se realizaron los mismos pasos para obtener una solución de concentración 0,88mg/ml. Para obtener la curva estándar en el rango de linealidad, se prepararon tubos con el testigo de colágeno con concentraciones que variaron desde los 0.11mg/ml hasta los 0,44mg/ml. A partir de las soluciones madres de cada muestra, se prepararon series de diluciones de colágeno, con valores de concentración comprendidos entre los 0,22mg/ml y 0,465mg/ml.

Se incubaron volúmenes de 200µl de las suspensiones con 180ul de una solución acuosa de 0.4% tartrato de sodio-potasio, 10% Na₂CO₃ y NaOH 0.5M, y 20µl de una solución acuosa de 2% tartrato de sodio-potasio, 3% Cu₂SO₄·5 H₂O y NaOH 0.1M a 55°C durante 20min en un baño caliente. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, se añadieron 600ul de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:15), se agitaron los tubos y se incubaron a 55° C durante 10 min.

Se midió la absorbancia de las muestras a temperatura ambiente con espectrofotómetro (Beckman) a 650 nm, midiendo primero el testigo para la curva de calibración. Para todas las lecturas, se realizó cada muestra por triplicado. SDS fue analizado utilizando el software Cliqs 1D pro de Totallab.

II. Cuantificación de cantidad de colágeno

Se realizó un ensayo colorimétrico Sirius Red en una placa de 96 pocillos para la cuantificación del contenido de colágeno según el procedimiento descrito por Kliment y cols. (2011) [37] usando colágeno tipo I (Sigma St. Louis, USA) como testigo. La curva de calibración se construyó con un estándar de colágeno en un rango de 40µg a 2µg por pocillo, cada concentración se ensayó por duplicado. Se analizaron ocho muestras del colágeno purificado, ensayando seis concentraciones con rangos entre 5µg y 48µg de proteína; realizando cada concentración por triplicado. Las cantidades de solución en microlitros que fueron sembradas en cada pocillo de la placa se indican en la Tabla 1.

Una vez sembradas las muestras se dejó secar la placa durante la noche en una estufa a 40°C y luego se lavó tres veces con agua destilada (150µl por pocillo). Se añadieron a cada pocillo 150µl del colorante Sirius Red (Direct Red 80, Sigma St. Louis, USA) disuelto al 0.1% en ácido pícrico saturado y se incubó durante 1h a temperatura ambiente sobre un agitador (75 rpm). Se lavó la placa cuatro veces con agua acidificada (5% ácido acético, 150µl por pocillo) y se incubó con 150µl de NaOH 0.1M durante 30 min a temperatura ambiente en agitación (95 rpm). Luego se trasvasó el contenido de cada pocillo a una nueva placa para efectuar la lectura en el espectrofotómetro (lector de microplaca MultiskanSpectrum, ThermoScientific) a 550nm.

TABLA 1.
PROTOCOLO PARA SEMBRADO DE PLACA PARA CUANTIFICACIÓN CON SIRIUS RED. LAS CONCENTRACIONES INDICADAS CORRESPONDEN A LA CANTIDAD DE MILIGRAMOS DE ESPONJA POR MILILITROS DE AGUA DE LAS SOLUCIONES DE COLÁGENO.

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

III. Electroforesis en gel de poli(acrilamida)- SDS

Se analizó el contenido de proteínas del colágeno obtenido mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sodio (SDS), basándose en el método de Laemmli [38]. Se empleó un gel desnaturante de poli(acrilamida) con una concentración de 7.5% para el gel resolutorio y 4% para el gel concentrador para analizar una muestra representativa de colágeno. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio espectro (bio-Rad) y colágeno tipo I (Sigma St. Louis, USA) como control.

Las muestras y el testigo de colágeno se disolvieron con un buffer de solubilización (SDS 1% (p/v), 100mM Tris-base, pH 9.5) a una concentración de 1mg/ml. Las soluciones se mezclaron con un buffer preparador de muestra (0.5M Tris-HCl pH 6.8, SDS al 10%, glicerol, azul de bromofenol, agua deionizada) en relación 1:1 y β-mercaptoetanol; luego se calentó durante 15 min a 95°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se cargaron 40µl de muestra por calle en el gel de poli(acrilamida).

Se realizó la corrida electroforética durante 2h, aplicando durante los primeros 30min un voltaje de 100V para permitir que las muestras cargadas penetren en el gel con un perfil de bajada parejo en todas las calles; luego se llevó la fuente a 140V durante 45 min, y finalmente se aumentó a 150V durante 45 min para terminar la corrida. Al término se retiró el gel de la cámara y se fijó con una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético al 10% durante 30 min. Se colocó el gel en una solución de Comassie Blue R-250 0,05% (p/v) en metanol al 10% y ácido acético 5% (v/v) y se dejó en agitación suave (50 rpm) durante toda la noche. Se quitó la solución teñidora y se destiñó el gel con una solución de metanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), cambiando la misma hasta quitar el fondo azul del gel; finalmente se colocó el gel en una solución preservadora (5% glicerol, 10% ácido acético) durante 10 min y se almacenó en agua. El gel de poli(acrilamida) con SDS fue analizado utilizando el software Cliqs 1D pro de Totallab.

C. Medición de Viscosidad

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

en el modo oscilatorio con una frecuencia en el rango de 0.001 a 1s-1 para caracterizar el comportamiento del fluido.

E. Fabricación de andamios de colágeno

Se obtuvo una biotinta rehidratando el colágeno purificado con agua deionizada a 42°C, obteniendo una consistencia de gel. Se realizaron pruebas con la misma para comprobar su imprimibilidad, y posteriormente se generaron los andamios utilizando una bioimpresora de extrusión *Life Science*, con una resolución igual a 500µm (diámetro de la aguja de impresión), y según el diseño establecido previamente [39].

F. Caracterización de los andamios impresos

I. Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo fue realizado en el Laboratorio de Biocompatibilidad del Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT, CONICET-UNC). Se evaluó la citotoxicidad del colágeno obtenido de acuerdo con un ensayo propuesto por la norma ISO 10993-5 (2009) [40], utilizando extractos de las muestras según ISO 10993-12 (2012) [41]. Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular basándose en la reducción de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.

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

Las células se cultivaron en medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Pasching, Austria), 4 mM de L-Glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4 mM de Piruvato de Sodio (Sigma, St. Louis, USA) y 10.000 unidades/mL de penicilina-10.000 µg/mL de estreptomycin. Se incubó la placa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24h para la formación de una monocapa de células.

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

Las células Vero se sembraron en una placa con una densidad de 15.000 células/pocillo y se agregaron diferentes diluciones del extracto original de colágeno. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Para el ensayo se analizaron pocillos con células con sólo medio de cultivo como control; y además se realizó un control positivo con una solución de Fenol al 0,2%. Los controles se realizaron por sextuplicado.

Después de 24h de cultivo de las células con el extracto, se retiró el mismo de la placa y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. A todas las muestras ensayadas se le agregó MTT a una concentración final de 1 mg/ml en buffer fosfato salino y se incubaron a 37°C durante 1:30h. Las absorbancias de las muestras se leyeron en un lector de microplacas (MultiskanSpectrum, ThermoScientific) a 595nm y se calculó el porcentaje de viabilidad celular como: % Viabilidad= (DO células tratadas/células control) x 100.

II. Ensayo de hinchamiento y porosidad

Se calculó la porosidad mediante la inmersión de los andamios (peso inicial en seco W₀) en etanol a temperatura

ambiente durante 24h (peso en etanol W) a través de la siguiente fórmula [42]:

En la anterior ρ_1 y ρ_2 representan la densidad del colágeno (1,21g/ml) y del etanol (0,79g/ml), respectivamente. Se ensayaron cinco andamios, realizando sobre tres de ellos una repetición del procedimiento de medición de porosidad.

Para realizar el estudio de hinchamiento se pesaron y se incubaron dos andamios en agua destilada a temperatura ambiente y determinando el peso húmedo de los mismos 24h después, período en el cual el andamio alcanza el equilibrio [42]. El porcentaje de hinchamiento de agua se definió como la relación porcentual del incremento de peso respecto al peso inicial del composite.

III. RESULTADOS

Protocolo de purificación de colágeno

Se empleó un procedimiento de purificación no enzimático para obtener colágeno insoluble a partir de piel porcina con el protocolo descrito, a través de una serie de tratamientos del tejido con ácidos y sales. Se obtuvieron rendimientos entre 11-16 % para las distintas partidas trabajadas, calculados como la relación porcentual entre el peso final de la muestra liofilizada y el peso inicial de la piel liofilizada (pesado previamente al comienzo de los tratamientos). Tanto en la etapa de rallado del tejido liofilizado como en los primeros tratamientos con la solución de fosfato de sodio se observó el desprendimiento de gran cantidad de grasa en la piel procesada, lo cual incidió en el rendimiento del protocolo, ya que el tratamiento químico aísla la proteína del resto de componentes del tejido; siendo esto informado también por otros autores [43]. Similar método empleado para extraer colágeno a partir de tendones de distintas fuentes animales [44] ha resultado en mayores rendimientos, probablemente debido a la ausencia de grasa en el tejido.

Con respecto a otros métodos de extracción reportados [45, 46] (basados en la solubilización en un medio ácido, digestión enzimática y un proceso de diálisis), se encontró ventajoso este método al preservar la estructura fibrilar del colágeno, la cual imparte resistencia mecánica al material permitiendo luego un comportamiento adecuado para la impresión 3D de los andamios. Además, el mismo implica un costo significativamente menor en relación a los métodos enzimáticos normalmente empleados, evitando el uso de una membrana para diálisis y enzimas, las cuales representan costos mucho más altos.

Cuantificación y Caracterización del colágeno

I. Cuantificación de proteína total

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

Se tomaron tres muestras de cada partida para cuantificar la cantidad total de proteína sobre cantidad de esponja según el método descrito previamente. Se realizó una curva de calibración con el testigo de colágeno para conocer el rango de concentraciones en las que la concentración de proteína y la absorbancia mantienen una relación lineal. Una vez conocido el rango de trabajo (concentraciones

entre 0,11 y 0,46 mg/ml), se realizó una regresión lineal para obtener el coeficiente de extinción.

La cantidad total de proteína por miligramo de esponja fue de un 89,8% promedio, con un error del 4,9%; indicando que la composición del material purificado consistió mayormente de proteínas.

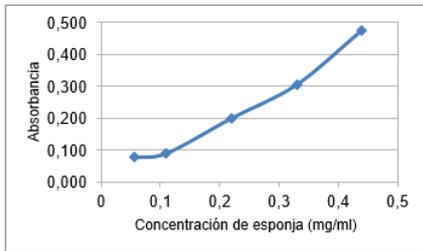


Fig. 2: Curva de calibración del testigo de colágeno.

TABLA 2
CUANTIFICACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LAS ESPONJAS DE COLÁGENO EXTRAÍDO.

Esponja (mg)	H ₂ O (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)	Cantidad de proteína por cantidad de esponja (%)
A1	6,9	7,42	0,921 ±0,054
A2	7,3	7,85	0,731 ±0,036
A3	7,3	7,85	0,709 ±0,109
B1	5,2	5,59	0,969 ±0,018
B2	7,5	8,06	0,701 ±0,027
B2'	7,5	8,06	0,971 ±0,049
C1	13,3	14,4	0,721 ±0,055
C3	10,3	11,07	0,911 ±0,053
C4	9,5	10,22	0,971 ±0,030
D1	4,6	4,95	0,783 ±0,013
D3	6,1	6,56	0,899 ±0,057
D4	4,5	4,84	0,703 ±0,063
Promedio total			89,79 ±4,92

II. Cuantificación de cantidad de colágeno

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se tomaron seis muestras, y se cuantificó la cantidad de colágeno sobre proteína a través de espectrofotometría, con una técnica basada en la afinidad específica del colorante Sirius Red por la estructura de triple hélice del colágeno. Se realizó la curva de calibración del testigo de colágeno y se trabajó de manera similar al punto anterior (rango de linealidad identificado entre los 0,003µg y 0,03µg de proteína). En base a las cantidades de proteína sembradas para cada muestra se calcularon las correspondientes cantidades de colágeno en miligramos y se expresaron los resultados como porcentaje.

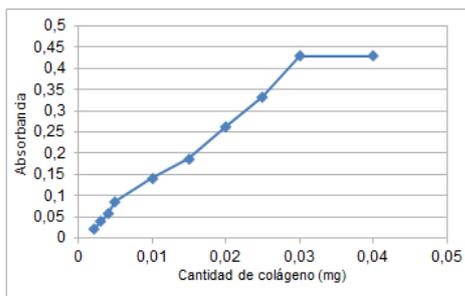


Fig. 3: Curva de calibración del testigo para cuantificación de colágeno por Sirius Red.

TABLA 3
CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE COLÁGENO SOBRE CANTIDAD DE PROTEÍNA DE LAS MUESTRAS.

	Proteína (mg/ml)	Colágeno (mg/ml)	Cantidad de colágeno por cantidad de proteína (%)
A1	0,4843	0,446	92,09 ±0,77
B1	0,3604	0,245	67,98 ±0,13
B2	0,4707	0,3749	79,65 ±0,32
C1	0,4575	0,4408	96,35 ±0,25
C3	0,3656	0,2447	66,93 ±0,44
C4	0,3543	0,3948	111,43 ±1,31
D1	0,3914	0,3158	80,68 ±0,78
D4	0,3451	0,486	140,82 ±0,56
Promedio			91,99 ±8,73

El porcentaje de colágeno sobre el contenido total de proteína fue de un 91,99% promedio, con un error asociado de 8,73%. Esto indica que la mayoría de la esponja obtenida está compuesta por colágeno tipo I, corroborando la efectividad del protocolo de extracción para obtener un producto con alto grado de pureza. Respecto al peso inicial de piel tratada para purificación, se encontró que el método de purificación empleado permitió obtener una buena cantidad de colágeno con alto grado de pureza; trabajos realizados por otros autores informan extracciones con contenidos mucho menores (por un factor de tres órdenes de magnitud) en cuanto a cantidad de colágeno (en miligramos) referidos al peso de piel inicial (en gramos) [45- 48].

III. Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS

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

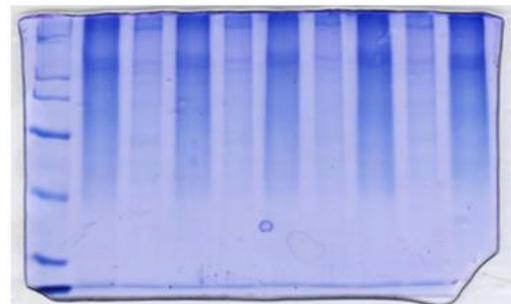


Fig. 4: Gel de poliacrilamida tras la tinción, mostrando la separación de bandas de las muestras.

TABLA 4
PESOS MOLECULARES DE CADA BANDA INDICADOS EN kDA.

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

Se encontraron cuatro bandas de interés: dos bandas cercanas entre sí con pesos moleculares en los 137 y 152kDa, que se corresponden con las cadenas α1 y α2 del colágeno, y dos cadenas con pesos moleculares mayores,

una en los 250kDa y otra en 300kDa respectivamente, las cuales son las bandas correspondientes a dímeros (cadena β), y trímeros (cadena helicoidal γ) de las anteriores; características de la estructura del colágeno tipo I. En ambos casos el testigo y la muestra ensayada compartieron similitud en la relación de frente de cada banda, corroborando la naturaleza del material obtenido con el protocolo de purificación. Este comportamiento es semejante a los resultados reportados en otros trabajos para colágeno extraído de varias especies, que muestran conformaciones cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$, dímeros β [45, 49- 51] y trímeros o cadenas helicoidales [47].

Mediciones de viscosidad

Se ensayaron dos muestras de colágeno con un reómetro de placas paralelas como se ha descrito en materiales y métodos. Se analizó la viscosidad en el rango de velocidades de corte (frecuencia) presentes en la jeringa de la bioimpresora durante la extrusión, observándose que el valor de la misma disminuye a medida que aumenta la frecuencia (Fig. 5). Se encontró que las dispersiones de colágeno fueron altamente viscosas, presentando valores mayores por cuatro órdenes de magnitud respecto a las viscosidades informadas en el trabajo de Lode y cols. [31], que realizaron estudios comparables. Los estudios reométricos también indicaron que el material exhibe un comportamiento pseudoplástico, reportado por dicho grupo de trabajo.

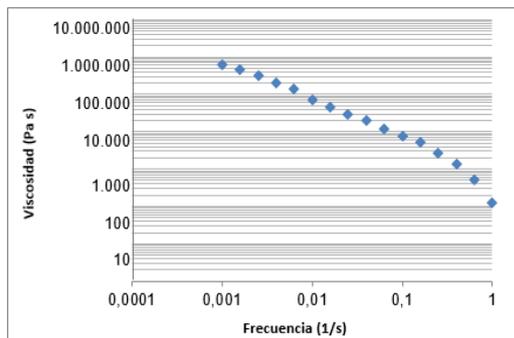


Fig. 5: Mediciones reométricas de la dispersión de colágeno.

La alta viscosidad del colágeno obtenido permitió la fabricación de andamios por impresión tridimensional a temperatura ambiente, logrando depositar el gel de colágeno en hebras con estabilidad suficiente para no colapsar sobre si mismas y así poder construir la estructura 3D con el patrón diseñado. Además, las propiedades pseudoplásticas del colágeno se consideran ventajosas para el proceso de impresión, ya que durante la extrusión del material su viscosidad disminuye a causa de las fuerzas en la boquilla de impresión, favoreciendo así el flujo del material. Por otro lado, después de la deposición (cero velocidades de flujo) la viscosidad del colágeno es muy alta, facilitando la fidelidad de forma de la estructura construida.

Fabricación de andamios de colágeno

Con la biotinta se pudieron fabricar andamios de colágeno a través de la técnica de impresión 3D. Las hebras depositadas presentaron suficiente consistencia para formar la estructura del andamio según la geometría predefinida (CAD). En la Fig 6 se muestra uno de los andamios

impresos, con dimensiones de 6mm x 6mm aproximadamente.



Fig 5: Andamio 3D de colágeno impreso.

Caracterización de los andamios impresos

I. Ensayo de citotoxicidad

Se analizó la citotoxicidad del material obtenido en el protocolo de purificación con células Vero-incubadas en presencia de distintas concentraciones de extracto de colágeno, realizando el ensayo de MTT, que evalúa viabilidad celular. Los resultados obtenidos para las células cultivadas en contacto con el extracto de colágeno evaluado en cada una de sus diluciones se muestran a continuación (ver Figura 7 y Tabla 5).

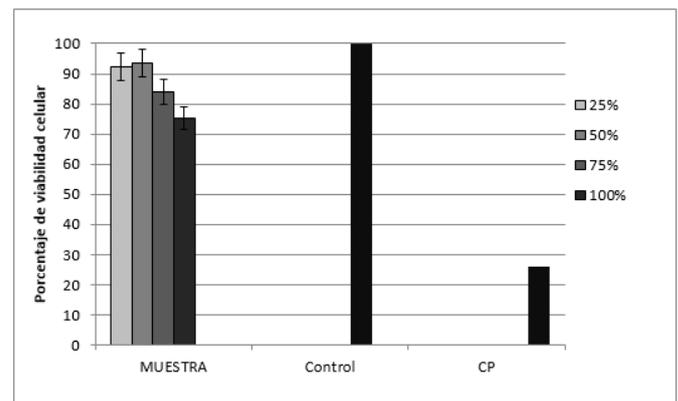


Fig. 7: Porcentajes de viabilidad obtenidos para células Vero-crecidas en presencia de los extractos de colágeno luego de 24h de cultivo. CP: control positivo.

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

TABLA 5
RESULTADOS DEL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

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

II. Ensayo de hinchamiento y porosidad

Los andamios impresos presentaron alta porosidad, con un valor medio de $90,27 \pm 1,38\%$. Una microestructura porosa con interconectividad de sus poros es crítica para asegurar una distribución uniforme de células, así como su supervivencia, proliferación y migración in vitro, afectando directamente la difusión de nutrientes y desechos metabólicos de las células en los andamios; generalmente

porosidades mayores al 90% son óptimas, mientras que el tamaño de poro del andamio óptimo que permite la entrada máxima de células, así como la adhesión celular y la deposición de matriz varía con los diferentes tipos de células y el tipo de tejido [51, 52]. Otros estudios sobre andamios ventajosos para el crecimiento de tejidos y células basados en colágeno exhibieron resultados similares a los obtenidos [52, 53].

TABLA 6
MEDICIONES Y CÁLCULO DE POROSIDAD DE LOS ANDAMIOS.

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

Se realizaron mediciones para conocer el hinchamiento de agua de los andamios 3D impresos, mostrando los resultados en la Tabla 6. El hinchamiento de agua depende tanto de su estructura porosa externa como interna [54] y es un parámetro importante porque indica cómo responderá el andamio en contacto con un fluido corporal; la capacidad del andamio de tomar agua es favorable para la adhesión y crecimiento celular, y para estudios sobre colágeno se han encontrado porcentajes entre 1000-1700% [8, 55, 56]

TABLA 7
HINCHAMIENTO DE AGUA DE LOS ANDAMIOS DE COLÁGENO.

	P seco (mg)	P agua (mg)	% Hinchamiento
1	4,2	49,2	1071,43
2	9,5	98,9	941,05

IV. CONCLUSIONES

La metodología de purificación permitió la obtención de colágeno tipo I con un alto grado de pureza, adecuado para ser empleado en impresión 3D de andamios. Uno de los objetivos planteados fue la preparación de una biotinta de colágeno apta para la impresión tridimensional de una estructura compleja; con adecuada fidelidad de impresión y que pueda dispensarse a través de la boquilla de la bioimpresora. Determinante clave en este punto es la viscosidad del material, por lo que se hicieron las correspondientes mediciones reológicas que permitieron confirmar un comportamiento adecuado del fluido de alta viscosidad. La impresión tridimensional a temperatura ambiente de la biotinta de colágeno descrita en el presente estudio permitió la fabricación precisa de andamios 3D para uso biomédico. El uso de la técnica de impresión 3D por deposición controlada de capa, previo diseño, permite el acceso a un método económico y asequible

El objetivo del presente trabajo fue cumplido y ha sentado las bases para la realización de futuros ensayos sobre los andamios impresos con cultivos celulares sobre los mismos, así como la posibilidad de aplicación de dichos andamios in vivo en animales permitiendo la adhesión, diferenciación y posterior migración de las células circundantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al IIByT (CONICET-UNC), al Departamento de Química (FCEfyN-UNC) y al LAMARX (FAMAF-UNC) por el apoyo y colaboración que permitió la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Ikada, Y. "Scope of Tissue Engineering" in *Tissue Engineering Fundamentals and Applications*, 1st ed., vol. 8. Mie, Japan: Academic Press, 2006.
- [2] Seidi A, Ramalingam M. "Protocols for Biomaterial Scaffold Fabrication," in *Integrated materials for Tissue Engineering*, 1st ed., vol. 4, Strasbourg, France: John Wiley and Sons, 2012.
- [3] Derby B, "Printing and Prototyping of tissues and scaffolds," *American Association for the Advancement of Science*, vol. 338, pp. 921-926, Nov. 2012.
- [4] C. J. T. Sachlos E, "Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds", *Eur Cell Mater*, vol. 5, pp. 29-39, Jun. 2003.
- [5] Walters B D, Stegemann J P, "Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales", *Acta Biomater*, vol. 10, ed. 4, pp. 1488-1501, Sep. 2013.
- [6] Lee C H, Singla A, Lee Y, "Biomedical applications of collagen," *Int J Pharm*, vol. 221, ed. 1-2, pp. 1-22, Jun 2001.
- [7] Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F, "Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering", *Materials*, vol. 3, ed. 3, pp. 1863-1887 2010.
- [8] Badylak S F, Freytes D O, Gilbert T W, "Extracellular matrix as a biological scaffoldmaterial: structure and function," *Acta Biomater*, vol. 5, ed. 1, pp. 1-13, Sep 2015.
- [9] An J, Teoh J E M, Suntuornond R, Chua C K, "Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues", *Engineering*, vol. 1, ed. 2, pp. 261-268, 2015.
- [10] Hutmacher D. W., Sittinger M, Risbud M. V., "Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems.," *Trends Biotechnol*, vol. 22, ed. 7, pp. 354-362, Jul 2004.
- [11] Ikada Y, "Basic technologies developed for Tissue Engineering," in *Tissue Engineering Fundamentals*, 1st ed., vol. 8. Mie, Japan: Academic Press, 2006.
- [12] H. D. W, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives.," *J Biomater*, vol. 12, ed. 1, pp. 107-124 2001.
- [13] Sander E A, Barocas V H "Applications, Biomimetic Collagen Tissues: Collagenous Tissue Engineering and Othera. O. Applications" in *Collagen Structure and Mechanics*, Springer, USA, 2008.
- [14] Ahn SH, Koh Y H, Kim GH, "A three-dimensional hierarchical collagen scaffold fabricated by a combined solid freeform fabrication (SFF) and electrospinning process to enhance mesenchymal stem cell (MSC) proliferation," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, ed. 6, pp. 7, May 2010.
- [15] Chanjuan Dong, Yonggang L, "Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives," *Polymers*, vol. 8, ed. 2, pp. 42, 2016.
- [16] Wess TJ, "Collagen Fibrillar Structure and Hierarchies," in *Collagen Structure and Mechanics*, 1st ed, Springer, USA, 2008.
- [17] Shoulders M D, Raines R T, "Collagen Structure and Stability," *Annu Rev Biochem*, vol. 78, pp. 929- 958, 2009.
- [18] Silvipriya S, Krishna K, Bhat AR, Dinesh K, Anish J, Panayappan L, "Collagen: Animal Sources and Biomedical Application" *J App Pharm Sci*, vol. 5, ed. 3, pp. 123- 127.
- [19] C. D. J. P. S. J. K. M. S. K. C. M. K. C. H. Gu B K, "3-dimensional bioprinting for tissue engineering applications," *Biomater Res*, vol. 20, ed. 12, Apr 2016.
- [20] Li J, Chen M, Fan X, Zhou H, "Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects," *J Transl Med*, vol. 14, ed. 271, Sep 2016.
- [21] Do A V, Khorsand B, Geary S M, Salem A K, "3D Printing of

- Scaffolds for Tissue Regeneration applications,"*Adv Healthc Mater*, vol. 4, ed. 12, pp. 1742-1762, Aug 2015.
- [22] Gao G, Cui X, "Three-dimensional bioprinting in tissue engineering in regenerative medicine,"*Biotechnol Lett*, vol. 38, ed. 2, pp. 203-211, Feb 2015.
- [23] Mironov V, Kasyanov V, Drake C, Markwald R R, 2008.
- [24] Murphy S V, Atala A, "3D bioprinting of tissues and organs,"*Nat Biotechnol*, pp. 773-785, Aug 2014.
- [25] Guvendiren M, Molde J, Soares R M D, Kohn J, "Designing Biomaterials for 3D Printing,"*ACS Biomater Sci*, pp. 1679- 1693, Apr 2016.
- [26] Zhang X, Zhang Y, "Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting,"*Cell Biochem Biophys*, vol. 32, ed. 8, pp. 777-782, Jul 2015.
- [27] Jones N, "Science in three dimensions: the print revolution,"*Nature*, vol. 487, ed. 7405, pp. 22-30, Jul 2012.
- [28] Skardal A, Atala A, "Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting,"*Ann Biomed Eng*, vol. 43, ed. 3, pp. 730-746, Mar 2015.
- [29] Shim J H, Kim J Y, Park M, Park J, Cho D W, "Development of a hybrid scaffold with synthetic biomaterials and hydrogel using solid freeform fabrication technology,"*Biofabrication*, vol. 3, ed. 3, Sep 2011.
- [30] Park H, Cannizaro C, Vunjak-Novakovich G, Langer R, Vacanti C, Farokhzad O C, "Nanofabrication and Microfabrication of Functional Materials for Tissue Engineering,"*Tissue Eng*, vol. 13, ed. 8, pp. 1867-1877, Aug 2007.
- [31] Lode A, Meyer M, Brüggemeier S, Paul B, Baltze H, Schröpfer M, Winkelmann C, Sonntag F, Gelinsky M, "Additive manufacturing of collagen scaffolds by three-dimensional plotting of highly viscous dispersions,"*Biofabrication*, vol. 8, ed. 1, Feb 2016.
- [32] Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka J T, "Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid free form fabrication,"*Biomaterials*, vol. 24, ed. 8, pp. 1487-1497, Apr 2003.
- [33] Yeong W Y, Chua C K, Leong K F, Chandrasekaran M, Lee M W, "Comparison of drying methods in the fabrication of collagen scaffold via indirect rapid prototyping,"*J of Biom Mat Res*, vol. 8, ed. 1, pp. 260-266, Jul 2007.
- [34] Chen YC, Chen CT, Chen J P, "Surface modification of polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering for cartilage tissue engineering,"*Mater Sci Enq C Mater Biol Appl*, vol. 40, Jul 2014.
- [35] Komsa-Penkova R, Spirova R, Bechev B., "Modification of Lowry's method for concentration measurement,"*J Biochem Biophys Methods*, vol. 32, ed. 1, pp. 33-43, Apr 1996.
- [36] Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, "Protein measurement with the folin phenol reagent,"*J Biol Chem*, vol. 193, ed. 1, pp. 265-275, 1951.
- [37] Kliment C R, Englert J M, Crum L P, Oury T D., "A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal,"*Int J Clin Exp Pathol*, vol. 4, ed. 4, pp. 349- 355, Apr 2011.
- [38] Laemmli, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,"*Nature*, vol. 227, ed. 5259, pp. 680-685, Aug 1970.
- [39] Díaz Nocera A, Salvatierra N A, Cid M P. Document Printing.
- [56] Kim H J, Kim K K, Park I K, Choi B S, Kim J H, Kim M S. "Hybrid Scaffolds Composed of Hyaluronic Acid and Collagen for Cartilage Regeneration.," *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 9, No. 2, pp 57-62 (2012).
- collagen 3D structures. 2015. IMFB E Proceedings 44, pp136-139.
- [40] ISO 10993-5:2009. "Tests for Cytotoxicity- In Vitro Methods". 2009. 34 p.
- [41] ISO 10993- 12: 2012. "Biological Evaluation of medical devices- Sample preparation and reference materials". 2012. 28p.
- [42] Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, "Biodegradability and cell-mediated contraction of porous collagen scaffolds: The effect of lysine as a novel crosslinking bridge,"*J Biomed Mater Res A*, vol. 71, ed. 2, pp. 334-342, Nov 2004.
- [43] Pacak C A, MacKay A A, Cowan D B, "An Improved Method for the Preparation of Type I Collagen From Skin.,"*J Vis Exp*, ed. 83, Jan 2014.
- [44] Ghodbane S. A, Dunn M. G., "Physical and Mechanical Properties of Cross-linked Type I Collagen Scaffolds Derived from Bovine, Porcine, and Ovine Tendons,"*J Biom Mat Res*, vol. 104, ed. 11, pp. 2685- 2692, Nov 2016.
- [45] Martínez-Ortiz M A, Hernández-Fuentes A D, Pimentel-González D J, Campos-Montiel R G, Vargas-Torres A, Aguirre-Álvarez G, "Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization,"*J Food*, vol. 13, ed. 2, pp. 253- 258, Aug 2014.
- [46] Mocan E, Tagadiuc O, Nacu V, "Aspects of collagen isolation procedure," *Vols. Clin. Res. Studies*, vol. 2, ed. 320, pp. 3-5, 2011.
- [47] Pacak C A, Powers J M and Cowan D B, "Ultrarapid Purification of Collagen Type I for Tissue Engineering Applications,"*Tissue Enq Par C Methods*, vol. 17, ed. 9, pp. 849-885, Sep 2011.
- [48] Rizk M, Mostafa N Y, "Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications,"*Or J Chem*, vol. 32, ed.3, pp. 32-35 ,Apr 2016.
- [49] Lin Y K, Liu D C, "Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species,"*Food Chem*, vol. 99, ed. 2, pp. 244-251, 2006.
- [50] Torres-Arreola W, Pacheco- Aguilar R, Sotelo-Mundo R R, Rouzaud- Sáñez O, Ezquerro- Brauer J M, "Caracterización Parcial del Colágeno Extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante." *Cien Tecn Alim*, vol. 6, ed. 2, pp. 101-108, 2008.
- [51] Gómez- Lizarraga K, Piña- Barba C., Rodríguez- Fuentes N, "Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino,"*Superficies y vacío*, vol. 24 ,ed.4, pp. 137-140, Dic 2011.
- [52] Kim H J, Kim K K, Park I K, Choi B S, Kim J H, Kim M S, "Hybrid Scaffolds Composed of Hyaluronic Acid and Collagen for Cartilage Regeneration" in *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 9, ed. 2: Springer USA, PP. 57-62, Apr 2012.
- [53] Glowacki J, Mizuno S, "Collagen Scaffolds for Tissue Engineering,"*Biopolymers*, vol. 89, ed. 5, pp. 338-344.
- [54] Bettini S., Bongrante V., Madaghie M., Salvatore L., Syrgiannis Z., Giancane G., Valli L., "On Demand Release of Hydrosoluble Drugs From a Paramagnetic Porous Collagen- Based Scaffold.," *Chem*, vol. 23, ed. 6, pp. 1338/ 1345, Jan 2017.
- [55] Hollister S.J., "Porous scaffold design for tissue engineering," *Nat Mater*, vol. 4, ed. 7, pp. 518-524, Jul 2005.