



*MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS DEL PROGRAMA  
PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (Pro.In.Bio).*

*ESCUELA DE GRADUADOS-FACULTAD DE MEDICINA-  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA.*

# DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MATRIZ BIOPOLIMÉRICA DE COLÁGENO PARA REPOSICIÓN DÉRMICA

---

**Lic. Luciana Pereira**

**Directores Académicos:**

**Dra. Helena Pardo**

**Dra. Cristina Touriño**

*Montevideo, República Oriental del Uruguay. Marzo 2022.*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mis tutores Helena Pardo y Cristina Touriño, por el apoyo y enseñanzas a lo largo de este proceso, tanto a nivel académico como personal.

Al Dr. Álvaro Mombrú por haber tenido la visión de introducir esta temática en el país y haber creado los cimientos y generado tanto el *know how* como los recursos para que el presente proyecto pudiese haberse llevado a cabo, además por todo el apoyo durante el desarrollo de la tesis.

Agradezco también al Dr. Ricardo Faccio por su transferencia de conocimiento y su participación en los inicios de este proyecto.

A mis compañeros de Nanomat, Msc. Analía Castro, Ing. Juan Pablo Villanueva, QF Pablo Miranda y Dra. Patricia Zimet por su constante apoyo, colaboración y compañía.

A Dr. Mariano Romero por su invaluable asistencia y transferencia de conocimiento en técnicas de síntesis de la matriz colagénica, así como para su caracterización.

A mis colegas del Departamento Básico de Medicina, Msc. Lourdes Etcharte y Lic. Natalia Marquisá por su ayuda y enseñanzas en los ensayos de cultivo celular. En especial agradezco a Lourdes por permitirme evaluar la proliferación y diferenciación de las células en las que basó su proyecto de doctorado. Al Departamento de Fisiopatología del Hospital de Clínicas por su ayuda en técnicas de tinción celular.

Al Instituto Nacional de Donación y Trasplante por la transferencia de conocimientos varios por parte de sus integrantes, así como de expertos internacionales que brindaron aportes invaluableles al trabajo. Agradezco especialmente a Dra. Inés Álvarez, Dr. Héctor Pérez Campo y Lic. Walter Vicentino por su tiempo, enseñanzas y excelente disposición para utilizar sus equipos.

A Dr. Juan Benech y Dra. Natalia Oddone por su colaboración en ensayos de caracterización biológica, tanto in vitro como in vivo. Al laboratorio de Biotecnología, a Iris Miraballes y a Susana Cáceres por su colaboración en los ensayos de caracterización química, y por su buena disposición para utilizar sus equipos.

A Dr. Alejandro Marquez, Dra. Ana Laura Reyes y Lic. Magela Rodao (Facultad de Ciencias) por su apoyo en estudios SEM. A Patricia Lema, Erika Paulsen y Sofía Barrios (Facultad de Ingeniería) por su colaboración en los ensayos de propiedades mecánicas.

A los integrantes del tribunal por su tiempo y buena disposición: Dra. Patricia Cassina, Dra. Gabriela Otero y Dra. Sofía Grille.

A ProinBio, ANII (POS\_NAC\_2013\_1\_11636) y CSIC por su apoyo financiero.

A mi familia, mis amigos y colegas por su ánimo y apoyo incondicional.



## RESUMEN

Los andamios en base a colágeno y condroitín-6-sulfato (GAG) pretenden imitar las características estructurales y funcionales de la matriz extracelular (MEC) nativa. Dichas matrices colagénicas (MC) actúan como un andamiaje temporal que permite la migración y proliferación organizada de las células, induciendo la regeneración de los tejidos. Algunos tipos celulares, como las células estromales mesenquimales de médula ósea (BMSC) poseen características prometedoras para ser adicionadas a la MC, potenciando así los beneficios de éstas.

En el presente estudio se propuso optimizar el desarrollo de matrices de colágeno tipo I y GAG de origen bovino y nacional, así como también realizar su caracterización desde el punto de fisicoquímico y biológico, con el fin de determinar si éste puede ser utilizado como andamio para la reparación tisular.

Se llevó a cabo la síntesis de la MC utilizando como agentes de entrecruzamiento el GAG y/o diferentes dosis de radiación *gamma*, dando lugar a distintas matrices que fueron comparadas y caracterizadas para seleccionar la que tuviera propiedades más aptas para permitir la reparación tisular. A su vez, se evaluó la influencia de las distintas estrategias de entrecruzamiento sobre las propiedades fisicoquímicas de la misma. Una vez seleccionada la MC con las propiedades más adecuadas, se realizó la evaluación biológica. La caracterización biológica consistió en la evaluación de la citotoxicidad y la adherencia celular a la matriz, estudios de proliferación con BMSC y la evaluación de su capacidad para la multidiferenciación sobre la MC. A su vez, se realizó un estudio preliminar *in vivo* de la biocompatibilidad de la MC en un modelo murino.

La optimización del protocolo de síntesis de las MC dio lugar a matrices porosas, cuyas características fueron comparadas entre sí. La incorporación de las distintas estrategias de entrecruzamiento generaron una mejoría considerable en la estructura de la matriz, obteniéndose andamios con una microestructura más adecuada y homogénea, mejores propiedades biomecánicas, con mejor resistencia a la degradación enzimática y térmicamente más estables. Se seleccionó la matriz con GAG y 15 kGy como la más apta para convertirse en un andamio de reparación tisular de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas estudiadas. Los espectros FT-IR y Raman confirmaron la composición de los andamios producidos y permitieron detectar cambios en el modo de deformación y de la estructura secundaria de las proteínas colagénicas.

La matriz no resultó citotóxica bajo las condiciones en las que fue evaluada. Además, todas las líneas celulares evaluadas lograron adherirse a la membrana. Las BMSC lograron proliferar sobre la matriz durante el estudio y diferenciarse al linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. Los resultados del ensayo *in vivo* sugieren que el andamio tiene una buena compatibilidad en los animales estudiados.

En conclusión, se obtuvieron distintas matrices las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente, logrando describir y comparar sus propiedades, y permitiendo establecer la influencia de los distintos tipos de entrecruzamiento evaluados sobre estas propiedades. La dosis de radiación *gamma* seleccionada (15 kGy) estaría generando entrecruzamiento y la formación de nuevos enlaces, pero sin mostrar una degradación significativa de la estructura colagénica. El andamio seleccionado logró una buena

biocompatibilidad, permitiendo la adhesión y proliferación celular y específicamente con las BMSC, permitió obtener diferenciación hacia los 3 linajes característicos. Por tanto, la MC resultante permitió el desarrollo de procesos biológicos fundamentales para la reparación tisular y sería factible considerar la adición de BMSC a la misma con la finalidad de obtener un constructo más eficiente. En suma, es posible considerar al andamio en cuestión como un buen apósito acelular para la reparación tisular.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**%C:** porcentaje de cicatrización

**%EM:** Porcentaje de Elongación Máximo

**3D:** tridimensional

**AA:** aminoácidos

**ARS:** Alizarin Red S

**AT:** Azul de Toluidina

**BJ:** Fibroblastos de prepucio humano

**BMSC:** Células estromales mesenquimales de médula ósea

**CFSE:** diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil

**CG** : suspensión/matriz compuesta por Colágeno Tipo 1 y Condroitín-6-Sulfato

**Col1:** Colágeno Tipo 1

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DCT:** Matrices congeladas mediante un descenso semicontrolado de temperatura // descenso semicontrolado de temperatura

**DETEMA:** Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMEM-HG:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DSC:** Calorimetría Diferencial de barrido

**EGF:** el factor de crecimiento epidérmico

**ETM:** Esfuerzo Tensil Máximo

**FDA:** Fluoresceína

**FT-IR:** Espectroscopia de Infrarroja con Transformada de Fourier

**GAG:** Condroitín-6-Sulfato

**GTA:** Glutaraldehído

**HAc:** Ácido acético glacial

**IFN  $\gamma$**  : interferón *gamma*

**INDT:** Instituto Nacional de Donación y Trasplante

**ISCT:** Sociedad Internacional de Terapia Celular

**IT** : ingeniería tisular

**MC:** Matriz colagénica

**MEC:** Matriz extracelular

**MR:** medicina regenerativa

**MEM:** medio esencial mínimo

**MS-5:** línea celular estromal de origen murino

**MSC:** células estromales mesenquimales multipotentes

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**NIH-3T3:** Fibroblastos de origen murino

**NR:** Nile red

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PDGF:** crecimiento derivado de las plaquetas

**PI:** Ioduro de Propidio

**P-S:** penicilina-streptomicina

**RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute

**sDCT:** Matrices que No han sido congeladas mediante un descenso controlado de temperatura

**SDS-PAGE:** Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido

**SFB:** Suero fetal bovino

**SPARC:** Proteínas secretadas ácidas y ricas en cisteína

**Tc:** Temperatura de congelamiento

**TGF- $\alpha$ :** Factor de crecimiento tumoral- $\alpha$

**TGF- $\beta$ :** el factor de crecimiento transformante- $\beta$

**VEGF:** factor de crecimiento de endotelio vascular

**WOAH:** The World Organization for Animal Health

**$\alpha$ -MEM:** medio mínimo esencial de Eagles alfa



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>13</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
HERIDAS DE PIEL Y FISIOPATOLOGÍA DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA .....	16
La piel .....	16
Matriz extracelular .....	17
Cicatrización .....	19
1) Hemostasis e inflamación .....	19
2) Proliferativa o de granulación .....	20
3) Maduración y remodelación .....	21
4) Contracción de la herida .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Problemáticas de la cicatrización defectuosa .....	23
LA MEDICINA REGENERATIVA Y LA INGENIERÍA TISULAR EN EL TRATAMIENTO DE HERIDAS .....	24
Sustitutos dérmicos de IT .....	25
Clasificación y propiedades .....	25
Andamio de Col1:gag .....	27
Colágeno tipo I: .....	28
Condroitín-6-sulfato .....	31
Células e ingeniería tisular .....	31
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>36</b>
<b>ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO</b> .....	<b>37</b>

**CAPÍTULO 1: DESARROLLO DE LA MATRIZ BIOPOLIMÉRICA DE COLÁGENO .....38**

**GENERALIDADES .....38**

**INTRODUCCIÓN .....38**

Extracción del colágeno tipo 1 .....38

Preparación del co-precipitado colágeno: GAG.....39

Congelamiento del co-precipitado colágeno: GAG y liofilización .....40

Reticulación e irradiación Gamma .....42

Formación de la epidermis artificial .....44

Empaquetamiento y esterilización final .....45

**SÍNTESIS DE LA MATRIZ COLAGÉNICA .....47**

**METODOLOGÍA .....47**

Extracción del colágeno tipo 1 .....47

Formación del co-precipitado CG.....49

Congelamiento semicontrolado del co-precipitado .....49

Entrecruzamiento mediante radiación gamma .....50

Liofilización.....51

Preparación de capa epidérmica artificial .....51

Empaquetamiento y Esterilización final .....52

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....52**

**CONCLUSIONES .....53**

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA MATRIZ COLAGÉNICA.....54**

**GENERALIDADES .....54**

**METODOLOGÍA .....54**

CARACTERIZACIÓN FÍSICA .....54

Análisis morfológico y tamaño de poro.....54

Análisis biomecánico .....56

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....57

Degradación Enzimática .....57

Análisis con Espectroscopía de Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) .....58

Análisis con Espectroscopía Raman Confocal .....59

ANÁLISIS DE DATOS .....	59
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
CARACTERIZACIÓN FÍSICA .....	60
Análisis morfológico y tamaño de poro .....	60
Análisis biomecánico .....	67
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	71
Degradación Enzimática .....	71
Análisis con Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) y Espectroscopía Raman Confocal .....	76
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
<b><u>CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA MATRIZ COLAGÉNICA.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b>GENERALIDADES .....</b>	<b>85</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>85</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>86</b>
<b>EVALUACIÓN IN VITRO .....</b>	<b>86</b>
Estudio de citotoxicidad celular in vitro con extracto de la matriz colágena .....	86
Adherencia de células a la matriz.....	87
Proliferación celular en la matriz colágena .....	88
Capacidad de multidiferenciación de las BMSC sobre matrices colagénicas.....	89
Diferenciación al linaje Osteogénico .....	89
Diferenciación al linaje Adipogénico .....	90
Diferenciación al linaje Condrogénico .....	91
EVALUACIÓN PRELIMINAR DE BIOCOMPATIBILIDAD DE LA MATRIZ EN MODELO MURINO .....	93
<b>ANÁLISIS DE DATOS .....</b>	<b>94</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
Citotoxicidad de la MC .....	95
Adherencia de células a la matriz.....	95
Proliferación celular en la matriz colágena .....	97
Capacidad de multidiferenciación de las BMSC sobre matrices colagénicas.....	99
Evaluación preliminar de biocompatibilidad de la matriz en modelo murino .....	104
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b><u>CONCLUSIONES GENERALES.....</u></b>	<b><u>108</u></b>

<b><u>PERSPECTIVAS .....</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	<b><u>111</u></b>
<b><u>ANEXO .....</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b><u>TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS Y MEDIOS DE DIVULGACIÓN.....</u></b>	<b><u>129</u></b>

## ***Índice de Tablas***

Tabla i: Clasificación de sustitutos cutáneos según sus propiedades. ....	25
Tabla ii: Descripción de l requerimientos de los andamios de reposición tisular.....	27
Tabla 1.1: Distintos tipos de matrices sintetizadas en el estudio. ....	53
Tabla 2.1: Descripción y denominación de las matrices colagénicas evaluadas.....	55
Tabla 2.2: Estadísticos calculados para los diámetros de Feret de las diferentes matrices evaluadas.....	65
Tabla 2.3: Comparación bibliográfica de propiedades biomecánicas. ....	69
Tabla 2.4: Temperaturas de Desnaturalización (Td) resultantes de los estudios de calorimetría diferencial de barrido .....	74
Tabla 3.1: Composición de la Solución de Marcado para el ensayo Live/Dead.....	87
Tabla 3.2: Composición del Medio Inductor Osteogénico. ....	90
Tabla 3.3: Composición del Medio Inductor Adipogénico .....	91
Tabla 3.4: Composición del Medio Condrogénico.....	92
Tabla 3.5: Formas de Metacromasia del Azul de Toluidina.....	92

## Índice de Figuras

Fig.i: Esquema de la estructura anatómica de la piel humana.....	16
Fig. ii: Estructura de la triple hélice de colágeno para el modelo peptídico (Gly-Pro-Hyp). .....	29
Fig. 1.1: Dispositivo de congelamiento semicontrolado. El dispositivo consistió en un baño de alcohol isopropílico dentro una caja de poliuretano .....	41
Fig. 1.2: Comparación de matrices con y sin descenso controlado de temperatura .....	42
Fig. 1.3: Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de Barrido de matrices de colágeno reticuladas con glutaraldehído. ....	43
Fig. 1.4: Esquema del protocolo de síntesis de las matrices de colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato.....	47
Fig. 1.5: Extracción del colágeno. ....	48
Fig. 1.6: Preparación del coprecipitado de colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato.....	49
Fig. 1.7: Equipo Gammacell 220 Excel con el que se llevaba a cabo la irradiación gamma .....	50
Fig. 1.8: Polimerización de la capa epidérmica artificial. ....	51
Fig. 1.9: Bicapa polimérica de colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato al final del proceso de síntesis .....	52
Fig. 2. 1: Micrografías tomadas con Microscopio Electrónico de barrido de las matrices colagénicas congeladas sin descenso controlado de temperatura en su síntesis .....	61
Fig. 2. 2: Micrografías tomadas con Microscopio Electrónico de barrido de las matrices colagénicas resultantes de las distintas condiciones de síntesis. ....	62
Fig. 2.3: Histogramas con la distribución de los diámetros de Feret (a lo largo del eje mayor del poro) calculados a partir de las micrografías. ....	64
Fig. 2.4.: Propiedades mecánicas de las matrices colagénicas	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Fig. 2.5: Degradación enzimática de las matrices colagénicas.....	72
Fig. 2.6: Termogramas obtenidos del estudio de las propiedades térmicas de las matrices colagénicas.....	75
Fig. 2.7: Espectroscopía de Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) de las matrices colagénicas y sus componentes .....	76
Fig. 2.8: Espectroscopía Raman de matrices colagénicas. ....	78

Fig. 2.9.1: Imágenes de Microscopía Raman Confocal de las matrices colagénicas .....	79
Fig. 2.9.2: Espectro Raman confocal de las áreas seleccionadas de las matrices .....	80
Fig. 3.1: Cámara Millicell EZ Slide 8 pocillos (Millipore Corporation, 2009). .....	88
Fig. 3.2: Viabilidad celular de las líneas BJ, MS5 y NIH-3T3.....	95
Fig.3.3: Estudio con microscopía confocal del cultivo de líneas celulares con y sin matriz colagénica. ....	96
Fig. 3.4: Micrografía resultante de la tinción de las BMSC con CFSE .....	99
Fig. 3.5: Diferenciación osteogénica de BMSC. ....	101
Fig. 3.6: Diferenciación adipogénica de BMSC con y sin matriz colagénica .....	102
Fig. 3.7: Micrografías resultantes del ensayo de diferenciación condrogénica .....	103
Fig. 3.8: Evolución de las heridas con y sin matriz colagénica. ....	106

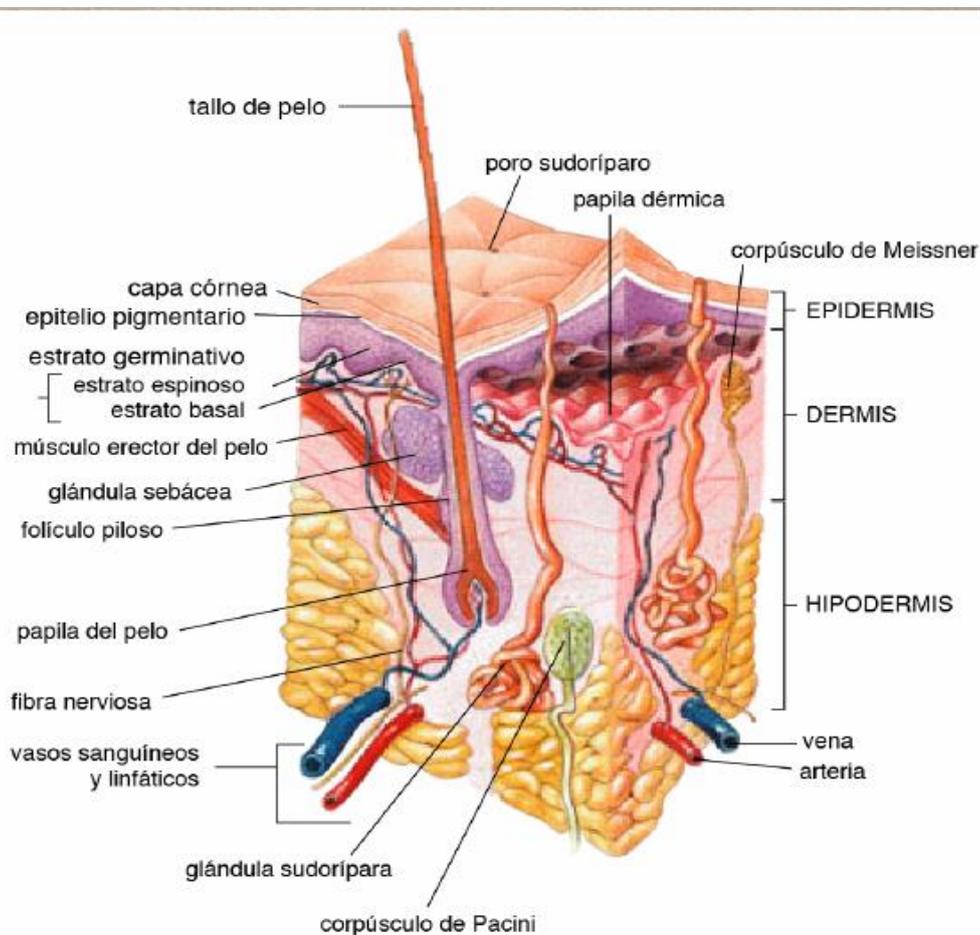
# INTRODUCCIÓN

## Heridas de piel y fisiopatología de la cicatrización cutánea

### La piel

La piel constituye el órgano más grande del cuerpo y al recubrir la superficie de éste, funciona como un sistema de defensa primario que continuamente confronta con el ambiente externo para protegernos de los rayos UV, de patógenos y de la pérdida excesiva de agua (Ågren, 2016a; Mahboob et al., 2014; Millán, 2014; Tripathi et al., 2021). Adicionalmente, actúa como un órgano sensorial y un regulador primario de la temperatura, ya que conforma una barrera de permeabilidad que controla el movimiento de agua y otros electrolitos (Millán, 2014). A su vez, posee funciones secretora y excretora, destacando la producción de vitamina D, e inmunológicas (Buendía et al., 2018)

La piel se compone de 3 capas: la epidermis, dermis y una capa subcutánea llamada hipodermis (Ågren, 2016a) ([Figura i](#)).



**Fig.i: Esquema de la estructura anatómica de la piel humana.** Traducido de Merino & Noriega (2011).

La capa más superficial es la epidermis, tiene aproximadamente entre 40-400  $\mu\text{m}$  de espesor dependiendo de la ubicación anatómica (Isaza, 2019). La epidermis deriva del

ectodermo; constituye una capa superficial delgada de queratinocitos dispuestos de forma estratificada, que provienen de las células proliferantes del estrato basal. Estas células se diferencian a queratinocitos a medida que se dividen y son empujadas hacia la superficie, acumulando crecientemente filamentos de queratina en su citoplasma. Al llegar a la superficie, las células finalmente se desprenden, describiendo a lo largo de la epidermis cinco capas bien definidas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo. La epidermis se relaciona estrechamente con la dermis subyacente a través de la lámina basal, a la cual se adhiere mediante conexiones proteicas dando lugar a una microarquitectura de crestas y valles (Isaza, 2019; Millán, 2014).

La dermis es la segunda capa de la piel, y constituye un tejido conectivo fibroelástico denso derivado del mesodermo. Dicha capa está dividida en dos regiones anatómicas: la dermis papilar y la dermis reticular. Como todo tejido conectivo, se compone por constituyentes celulares embebidos en una matriz extracelular. El principal constituyente celular de la dermis es el fibroblasto, seguido de células inmunes y células endoteliales vasculares. La matriz extracelular (MEC) dérmica está compuesta principalmente de colágeno, glicosaminoglicanos, elastina y otras proteínas. Dentro de la dermis también se pueden observar una densa red de capilares además de derivados ectodérmicos, tales como apéndices epidérmicos (folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas). Las funciones principales de la dermis son la regulación térmica, proporcionar fuerza, elasticidad y tacto, además de proveer a la epidermis de nutrientes y almacenar parte del suministro de agua del cuerpo (Isaza, 2019; Millán, 2014).

La capa más profunda es la hipodermis; se ubica contigua al músculo. Las principales células de la hipodermis son los adipocitos, que se encuentran organizados en lóbulos y separados por septos fibrosos. Sus funciones abarcan la conservación del calor del cuerpo y la protección mediante amortiguación para los órganos internos (Ågren, 2016a; Isaza, 2019). Actualmente se está investigando el papel de esta capa en los procesos de reparación tisular. Esto se debe a que dicha capa contiene células estromales mesenquimales, algunas de las cuales poseen propiedades de célula madre, constituyendo una fuente alternativa de células para los procedimientos de terapia celular y medicina regenerativa (Haydar Sahab et al., 2013)

### **Matriz extracelular**

La MEC es una estructura macromolecular compleja, que rodea a las células en los tejidos del cuerpo generando una red tridimensional entre éstas (Sainio et al., 2009). Su composición bioquímica exacta varía entre tejidos, definiendo la estructura morfológica del propio tejido, así como el ambiente local en que residen las células (Aulin, 2010; Haraway, 2006). Anteriormente, la MEC era considerada un componente inerte, un material de relleno que proveía a las células solamente de soporte mecánico y estructural. Actualmente, comprendemos que la MEC constituye una estructura dinámica, que interactúa con las células, generando señales mediante circuitos de retroalimentación para controlar el comportamiento celular y la homeostasis del tejido (Aulin, 2010; Sainio et al., 2009). Por tanto, las macromoléculas de la MEC son bioactivas y modulan los eventos celulares, tales como la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia (Sainio et al., 2009). Es importante señalar, que dichas funciones las cumplen componentes estructuralmente muy diferentes. Estos se

encuentran estrictamente organizados, de manera tal que, incluso alteraciones menores podrían generar no solo una alteración de las propiedades fisicoquímicas de los tejidos, sino también cambios en el fenotipo celular y en las interacciones célula-matriz (Sainio et al., 2009). De hecho, la MEC es un componente importante de la expresión fenotípica de las células que están adheridas a ella, estableciéndose un equilibrio dinámico en el cual las células adheridas a la matriz controlan su composición y a cambio, la composición de la MEC regula el fenotipo celular (Freshney, 2010). En efecto, muchas líneas celulares son capaces de generar su propia MEC, sin embargo, los cultivos celulares primarios, la expansión de algunas células especializadas y la inducción de su diferenciación pueden requerir la presencia de una MEC externa. Por tanto, la utilización de componentes de la MEC puede ser beneficiosa para el incremento de la supervivencia, proliferación y/o diferenciación celular (Freshney, 2010).

En general, los componentes de la MEC pueden clasificarse en: proteínas estructurales, moléculas interfibrilares o de adhesión celular, y proteínas matricelulares (Haraway, 2006; Sainio et al., 2009). Las proteínas estructurales se componen por ciertos tipos de colágeno y elastina. La descripción de la estructura y propiedades del colágeno se realiza en la sección siguiente ([Colágeno tipo I](#)). La elastina por su parte, otorga elasticidad e integridad estructural a los tejidos en respuesta al estrés mecánico, al adoptar una forma elongada con organización lineal cuando es estirada y volviendo a una forma enrollada cuando es liberada (Haraway, 2006). Dicha función elástica es complementaria a la que proveen las fibras de colágeno, que otorgan rigidez y resistencia tensil (Aulin, 2010). Las moléculas estructurales son apoyadas en sus funciones biomecánicas por los proteoglicanos y glicosaminoglicanos, entre los cuales se incluyen: ácido hialurónico, dermatán sulfato, condroitín sulfato, heparina, heparán sulfato y queratán sulfato. En muchos casos, con la excepción del ácido hialurónico, estos conforman proteoglicanos al unirse a una proteína núcleo, dando lugar a la conocida estructura de aspecto similar a una pluma. Los glicosaminoglicanos son polímeros altamente aniónicos, lo cual los hace atraer grandes cantidades de agua, permitiéndoles resistir fuerzas de compresión y regulando la absorción de agua (Aulin, 2010; Haraway, 2006). Si bien los glicosaminoglicanos son estructuras rígidas, su alto contenido acuoso permite la migración celular, de nutrientes y otras sustancias a través de ellas. Los glicosaminoglicanos interactúan con proteínas de adhesión celular, logrando que éstas queden ancladas en lugares específicos modificando su actividad biológica (Haraway, 2006).

Las moléculas interfibrilares abarcan glicoproteínas tales como fibronectina y la laminina. Estas moléculas se unen a las células mediante integrinas y a otros componentes de la MEC actuando como moduladores de la actividad celular y siendo responsables de la adhesión celular. La fibronectina es la segunda molécula más abundante de la MEC, y consiste en una glicoproteína muy larga con diferentes dominios de unión. Existen 2 formas de fibronectina, una soluble que se encuentra en la sangre y otra insoluble encontrada en la MEC. La laminina se encuentra en la lámina basal, separando el epitelio del correspondiente tejido conectivo subyacente. Esta molécula se encuentra involucrada en la diferenciación, migración y proliferación celular, jugando un rol preponderante en la angiogénesis (Aulin, 2010). Las proteínas denominadas “matricelulares” son aquellas que no cumplen una función estructural, sino que modulan las interacciones célula-matriz y las funciones celulares tales como la

reparación tisular (Sainio et al., 2009). Estas proteínas también promueven la migración de los queratinocitos y la formación y contracción de la matriz (Haraway, 2006). Las proteínas matricelulares incluyen: trombospondinas, osteopontinas, tenascinas y proteínas secretadas ácidas y ricas en cisteína (SPARC).

El adecuado mantenimiento de la MEC resulta de un delicado balance entre la producción y la degradación de sus componentes (Alba et al., 2002; Pereira, 2012). La síntesis de sus componentes la realizan los fibroblastos, mientras que las responsables principales de la degradación de la MEC son las metaloproteinasas. Éstas constituyen una familia de endopeptidasas entre las que se encuentran las colagenasas, encargadas de degradar la mayor parte de la MEC y proteínas de la membrana basal (Metzmacher, 2005).

Tal como se mencionó recientemente, la MEC participa activamente de diversos procesos celulares. Uno de los procesos en los que posee un rol preponderante es en la cicatrización dérmica, ya que dirige una respuesta directa y organizada con sus componentes (Haraway, 2006).

### **Cicatrización**

Una herida es una solución de continuidad de la piel o mucosa producida por una agresión física o química (Villalba et al. 2008). Cuando esto sucede, se desencadenan en el organismo una serie de mecanismos de reparación para restaurar la integridad del tejido (Jackson et al., 2012). Por ende, la cicatrización de heridas constituye un proceso dinámico que involucra interacciones entre células, la MEC y distintos factores de crecimiento. Este proceso consta de una serie de eventos bioquímicos complejos que se superponen en el tiempo y ocurren en respuesta a las lesiones tisulares conduciendo a su regeneración (Ramírez, 2010; Tripathi et al., 2021; Zheng et al., 2021). Para facilitar la comprensión del proceso de reparación de las heridas, se divide en fases, las cuales se describen en forma secuencial pero se dan en forma superpuestas en el tiempo, es decir que, parte de las fases ocurren simultáneamente. Estas fases son: **1) “hemostasis e inflamación”, 2) “proliferativa”, 3) “maduración”** (Childs, 2017).

#### **1) Hemostasis e inflamación**

Una vez ocurre la lesión se produce el daño en los vasos sanguíneos con la consiguiente pérdida de plasma, células y factores hacia el intersticio exponiendo el colágeno subendotelial a las plaquetas (Ramírez, 2010). Como resultado se inicia la activación de los elementos celulares de la sangre, que conlleva a la formación del coágulo o tapón hemostático. La activación de la cascada de la coagulación es iniciada por la interacción de las plaquetas con el Factor Von Willebrand secretado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos lesionados. Esto genera que las plaquetas se adhieran al intersticio, donde la trombina y el colágeno fibrilar expuesto las activa. Dicha activación, causa la degranulación de las plaquetas, es decir, la liberación de citoquinas y mediadores entre los que se encuentran: fibrinógeno, fibronectina y trombospondina. Estas moléculas estimulan la agregación plaquetaria y en consecuencia, la formación de un tapón hemostático sobre el que se deposita y entrecruza la fibrina. El coágulo de fibrina formado evita la pérdida de sangre o fluidos y sirve como soporte primario para la infiltración celular, tanto de células inflamatorias, como epiteliales y fibroblastos. Adicionalmente, las plaquetas también liberan factores de crecimiento desde los  $\alpha$ -

gránulos plaquetarios tales como: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) con acción mitogénica y quimiotáctica en los fibroblastos, el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Ågren, 2016a; Millán, 2014; Ramírez, 2010). En respuesta a la activación del complemento, la degranulación de las plaquetas y la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos, aumenta la permeabilidad vascular y se promueve la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos en el sitio de la lesión. Una vez los neutrófilos migran al intersticio, ocurren interacciones “célula-célula” y “célula-matriz” favorecidas por las integrinas iniciando así la función de fagocitosis de proteínas de la matriz y eventualmente de bacterias por medio de liberación de enzimas específicas, entre otros. La presencia de los neutrófilos no resulta esencial para que ocurra la reparación, ya que puede no haber contaminación bacteriana (Ågren, 2016a). Alrededor del día 3 de la herida, los monocitos migran a la herida y se diferencian a macrófagos, dichas células poseen una mayor sobrevivencia que los neutrófilos ya que permanecen en la herida hasta que el proceso de reparación se completa (Ågren, 2016; Millán, 2014). Estas células, si bien se encargan de limpiar la herida eliminando restos celulares, también juegan un papel importante en la regulación de cascada de la reparación de heridas. Esto se debe a que la activación de los macrófagos posee implicancias fundamentales en el desbridamiento, en la síntesis de la MEC y en la angiogénesis (Childs, 2017). De hecho, al unirse a la matriz extracelular, sufren un cambio fenotípico adquiriendo un comportamiento de células reparadoras, ya que liberan citoquinas y factores de crecimiento que poseen un rol importante en la neoformación tisular (Clark, 2014).

## 2) Proliferativa

Esta fase abarca tanto la revascularización como la formación de tejido de granulación, los cuales ocurren en paralelo. La angiogénesis resulta de la combinación de la proliferación y migración celular. Los vasos sanguíneos adyacentes a la lesión emiten yemas capilares, y las células endoteliales que se encuentran en esos extremos sufren un cambio fenotípico que les permite migrar al espacio perivascular; proceso en el que el VEGF y las angiopoyetinas poseen especial participación. A su vez, el TGF  $\beta$  estimula la síntesis de fibronectina y proteoglicanos, facilita la migración celular e induce la formación de tubos capilares. Como resultado de esta fase, se originan brotes capilares que luego se unen formando asas y creando los plexos capilares, dando lugar a nuevos vasos sanguíneos con el fin de suplementar al sitio en reparación de nutrientes y oxígeno (Ågren, 2016a; Clark, 2014; Millán, 2014; Ramírez Hernández, 2010).

Los fibroblastos una vez en el lecho de la lesión, migran sobre una matriz laxa de fibronectina, gracias a la expresión de receptores de integrina estimulados por PDGF. La hipoxia en el centro de la herida, también favorece la liberación de factores de crecimiento o estimulantes de la proliferación de fibroblastos (FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), TGF  $\beta$ , PDGF, EGF y VEGF). La movilización a través de la matriz se ve facilitado por un sistema proteolítico compuesto por enzimas derivadas de fibroblastos, como proteasas séricas y colagenasas. El PDGF estimula la liberación de estas proteínas del fibroblasto mientras que el TGF  $\beta$  induce la secreción de inhibidores de las proteinasas, controlando así la degradación de la matriz. Como resultado de la migración de fibroblastos, ocurre el depósito de una neomatriz provisional de fibronectina y ácido hialurónico, que reemplaza al coágulo de fibrina formado inicialmente. Los fibroblastos bajo la estimulación de citoquinas y factores de

crecimiento comienzan a sintetizar la matriz de colágeno (tipos I, III y VI) y una vez que se depositó una suficiente cantidad, se inhibe la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (Clark, 2014; Millán, 2014; Ramírez Hernandez, 2010).

Mientras que la granulación del tejido y la síntesis de colágeno ocurren en la región profunda de la herida, la integridad epitelial está siendo restituida en la superficie de ésta (Ågren, 2016a; Childs, 2017). Para que se lleve a cabo la epitelización de la herida, los queratinocitos deben migrar desde los bordes de la herida o desde los anexos remanentes con el fin de restablecer la barrera cutánea. La migración se logra gracias a un cambio en su fenotipo que implica la pérdida del aparato de adhesión (retracción de los tonofilamentos y disolución de los desmosomas), desarrollo de filamentos de actina y la proyección de lamelopodios hacia la herida, junto con la expresión de cierto tipo de queratinas. Como resultado, ocurre la pérdida de unión entre las células epidérmicas entre sí, a la membrana basal y a la dermis subyacente (Villalba et al., 2008). Esto comienza a ocurrir a las 24 horas de la lesión, luego de lo cual comienzan a migrar a lo largo de la matriz provisoria, rellenando la herida. Una vez que el defecto ha sido cubierto, las células epiteliales migrantes pierden su apariencia plana, para adquirir un aspecto más columnar e incrementan su actividad mitótica. La estratificación del epitelio se reestablece, y la capa superficial eventualmente es queratinizada (Ågren, 2016a; Clark, 2014). Esta fase suele efectuarse entre de las primeras 48 horas en heridas cuyos bordes son aproximados, pero puede tomar más tiempo en heridas más extensas (Ågren, 2016a). La velocidad de restauración de la superficie epidérmica es importante, ya que evita la pérdida excesiva de agua y reduce el tiempo de exposición a patógenos (Clark, 2014). La proliferación y la migración ocurre en simultáneo, ya que mientras las células epiteliales migran a través de la herida, las células proximales proliferan por el estímulo de mediadores solubles y debido a la ausencia de células vecinas.

El queratinocito finaliza este proceso al percibir varias señales: tales como la del IFN  $\gamma$  (interferón *gamma*) que lo convierte en contráctil facilitando así la reorganización de la matriz de la membrana basal provisoria, y la del TGF  $\beta$  que lo convierten en una célula basal para iniciar nuevamente la diferenciación y la reparación de la membrana basal con el nuevo depósito de laminina, lo cual también constituye una señal indicativa de que la herida ya está reparada y debe dejar de migrar.

### 3) Maduración

Esta etapa comienza junto con la fibroplasia y continúa durante meses. Durante esta etapa, los fibroblastos reorganizan la matriz de colágeno (Falco, 2012). Como puede desprenderse del texto, la MEC de la herida sufre ciertos cambios durante el proceso de reparación. Inicialmente, ésta se compone principalmente de fibrina y fibronectina, resultante del proceso hemostático, y de macrófagos. A continuación, son sintetizados los glicosaminoglicanos, proteoglicanos, y otras proteínas como SPARC para proveer mayor soporte en la deposición y remodelación de la matriz. Posteriormente, el colágeno pasa a ser la proteína predominante de la cicatriz, el cual es depositado de forma relativamente al azar. Con el transcurso del tiempo las fibras individuales del colágeno se reorganizan mediante entrecruzamiento para dar lugar a haces alineados (Ågren, 2016a; Villalba et al., 2008).

La matriz de la dermis intacta se encuentra compuesta predominantemente por colágeno tipo I (80-90%) y tipo III (10-20%), mientras que el tejido de granulación la proporción del colágeno tipo III se incrementa a un 30%, para luego volver a caer a un 10% en el tejido cicatricial ya maduro. De hecho, incluso al cabo de 1 año o más, el colágeno tipo III que se depositó durante la reparación es reemplazado por el de tipo I, adquiriendo una composición más similar al que tenía la dermis originalmente. La degradación del colágeno tipo III se debe a la acción de las metaloproteinasas de la matriz (colagenasas, gelatinasas y estromalinasas).

La síntesis de la red de colágeno se ve incrementada durante al menos 4 o 5 semanas luego de la lesión. El incremento de la tasa de síntesis colagénica durante el proceso de cicatrización es causado no solo por el aumento del número de fibroblastos, sino porque la capacidad individual de síntesis colagénica en dichas células también está sobrestimulada (Ågren, 2016a). La estructura y disposición de las fibras de la MEC también se modifica a lo largo del proceso, ya que en la dermis normal las fibras colagénicas poseen un patrón entramado, mientras que en la cicatriz las finas fibras colagénicas se disponen paralelas a la piel, para luego engrosarse gradualmente. Esto se ve acompañado por un incremento en la resistencia tensil de la cicatriz, indicando una correlación positiva entre el grosor de la fibra y su disposición. Bioquímicamente, el colágeno que se origina durante la granulación, también difiere del colágeno de la piel sana, ya que posee una mayor hidroxilación y glicosilación de los residuos de Lys, lo cual se correlaciona con fibras de menor diámetro. A pesar de los cambios que ocurren en la fase de remodelación, la orientación de las fibras de colágeno en una cicatriz curada nunca resulta tan organizada como en la dermis intacta. En efecto, la resistencia tensil máxima del tejido cicatricial siempre es menor a la de la dermis intacta, de hecho, se estima que incluso luego de 3 meses el tejido cicatricial recupera solamente hasta el 80% de las propiedades mecánicas de su correspondiente piel sana (Ågren, 2016a).

La contracción de la herida refiere a la aproximación de los bordes de ésta, mientras que la contractura de la herida es el acortamiento de la cicatriz en sí misma. Distintas teorías se han postulado sobre los mecanismos de la contracción de la herida. Una de ellas sugiere que el fenotipo miofibroblástico es responsable de la contracción, mientras que otros sugieren que es la movilización de todos los fibroblastos lo que genera la reorganización de la matriz y la posterior contracción (Ågren, 2016a). El miofibroblasto expresa  $\alpha$ -actina muscular en haces gruesos, llamados fibras de estrés, que permiten la contracción. Los miofibroblastos establecen tanto uniones célula-célula así como uniones con la MEC mediante receptores integrínicos (Villalba et al., 2008). Por otro lado, el colágeno neoformado se une covalentemente con haces del borde de la herida y de la dermis adyacente, generando así una red a través de la herida. De esta forma, la tracción que realizan los fibroblastos a la matriz pericelular se puede transmitir dando como resultado una contracción coordinada. En efecto, se estima que en una herida de espesor completo hay reducción en un 40% respecto al tamaño original (Villalba et al., 2008).

Hacia el final del proceso de cicatrización los fibroblastos inician su proceso de apoptosis, estableciéndose así la transición de una cicatriz rica en fibroblastos y tejido de granulación, a una cicatriz acelular. Como resultado final, la actividad celular

disminuye y el tejido conjuntivo cicatricial se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos, sin folículos pilosos y sin glándulas sudoríparas ni sebáceas

En conclusión, la cicatrización cutánea constituye un complejo proceso reparativo que resulta en la regeneración del epitelio y el reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al normal.

Una herida completamente cicatrizada se define como aquella que ha retornado a una estructura anatómica, función y apariencia normal, dentro de lapso razonable de tiempo. La mayoría de las heridas usualmente son causadas por injurias leves, sin embargo, algunas no cicatrizan en tiempo y forma. Múltiples factores locales y sistémicos pueden estar causando un enlentecimiento del proceso de cicatrización, perturbándolo y resultando en heridas crónicas o de difícil cicatrización.

### *Problemáticas de la cicatrización defectuosa*

Tal como se describió recientemente, la cicatrización de heridas constituye un proceso dinámico que involucra la interacción sinérgica entre factores de crecimiento, citoquinas, componentes de la matriz extracelular, células residentes y del sistema inmune (Ubillos et al., 2018). La alteración en alguna de estas fases, puede conducir a la cronicidad de la herida (Moffatt et al., 2004).

El retraso en la cicatrización puede ser causado por múltiples factores, entre los que se destacan: factores patológicos del huésped, alteración funcional de células o mediadores químicos involucrados en este proceso y la presencia anormal de microorganismos que colonizan las lesiones y retardan el proceso de cicatrización (Falco, 2012; Fonder et al., 2008; Tripathi et al., 2021). Existen otros factores vinculados a la propia herida como el tamaño, la profundidad y la localización de la misma (Grey et al., 2006). Es importante considerar también la comorbilidad del paciente, ya que ciertas patologías (como la diabetes, la arteriopatías, la obesidad, la desnutrición, la edad avanzada y el cáncer) así como el uso de fármacos inmunosupresores, retrasan el proceso de cicatrización (Falco, 2012; Otero et al., 2019). Independientemente de la causa que genera la alteración de este proceso, la cicatrización defectuosa puede conllevar a la afección cosmética, funcional y anatómica del sitio dañado (Millán, 2014)

Adicionalmente, la remodelación de la matriz en las heridas crónicas no se genera de la misma forma que en una herida aguda. De hecho, en heridas crónicas o de difícil cicatrización, como las úlceras, el proceso normal de cicatrización se ve enlentecido o detenido debido a disfunciones sistémicas subyacentes, y suelen exhibir deficiencias o disfunciones en las MEC que impiden el correcto proceso de cicatrización (Haraway, 2006; Velnar et al., 2015).

A su vez, no debemos olvidar los factores psicosociales de los pacientes que padecen estas lesiones, entre los que se destacan: aislamiento social, morbilidad, depresión, estrés, y dolor (Falco, 2012; Otero González et al., 2012). Estos factores tendrían también un impacto negativo en el proceso de cicatrización (Falco, 2012), lo cual genera una retroalimentación negativa para el tratamiento. Por tanto, este tipo de patologías posee una importante repercusión sobre la calidad de vida del paciente, pudiendo resultar en ausentismo laboral y jubilación temprana por incapacidad. Todo lo cual conlleva a una fuerte carga económica para el paciente y su entorno, así como para el

sistema de salud en sí mismo (Otero et al., 2019; Otero González et al., 2012; Ubillos et al., 2018; Velnar et al., 2015). Esta situación ha alcanzado un importancia significativa, no sólo por el envejecimiento de la población en general, sino también por el aumento de otras enfermedades ya mencionadas con repercusiones en el tratamiento de heridas (Ågren, 2016b). En efecto, si bien no existen datos específicos actuales para la República Oriental del Uruguay, en países desarrollados se estima que entre 1-2% de la población padecerá heridas crónicas a lo largo de su vida (Ågren, 2016b). Solamente en Estados Unidos, las heridas crónicas afectan a 6,5 millones de pacientes, generando un costo estimado de US\$ 25 billones anuales en el tratamiento de estos pacientes (Ågren, 2016b). En Argentina, por ejemplo, se estima que el costo medio anual de un hospital público por el tratamiento de úlceras crónicas de medios inferiores fue aproximadamente de US\$ 4054 por paciente ingresado y US\$ 3589 por paciente ambulatorio (Ramponi, 2019).

A su vez, independientemente de su etiología, las heridas crónicas constituyen un desafío terapéutico debido a que muchas veces no responden a tratamientos convencionales (Ubillos et al., 2018). Algunos de los tratamientos convencionales para heridas incluyen: apósitos para heridas, injertos de grosor dividido, terapias con presión negativa, terapia de oxígeno hiperbárico, terapia electromagnética, etc. (Mahboob et al., 2014). Otras estrategias abarcan autoinjertos, homoinjertos, xenoinjertos y prótesis. Sin embargo, estos recursos presentan limitaciones entre las que destacan la morbilidad del sitio donante, rechazo del implante o injerto y riesgo de contaminación por agentes patógenos (Eltom et al., 2019; Millán, 2014). Por tales motivos, resulta imperioso crear métodos o materiales efectivos para el tratamiento de heridas de gran porte (Ågren, 2016a)

En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias de tratamiento, tomando en cuenta la mayor comprensión que existe sobre los mecanismos celulares y moleculares subyacentes al proceso de cicatrización (Ågren, 2016b, 2016a). En este sentido, ha surgido una nueva disciplina que integra la medicina regenerativa (MR) y la ingeniería tisular (IT), cuyo objetivo es el desarrollo de terapias y materiales alternativos para el tratamiento de diferentes patologías.

### *La Medicina Regenerativa y la Ingeniería Tisular en el tratamiento de heridas*

Los avances científicos de los últimos años, han propiciado un profundo incremento en la comprensión de los mecanismos biológicos subyacentes al proceso de la reparación de heridas y la regeneración tisular, dando lugar a la elaboración de nuevas estrategias para el tratamiento de heridas (Ramírez Hernandez, 2010). En este contexto, nuevas áreas de conocimiento proveen enfoques alternativos para reparar y regenerar los tejidos dañados del organismo. Estas áreas incluyen la IT y MR (Cattalini, 2015). La IT es una disciplina integrativa que aplica principios de la ingeniería y las ciencias naturales con el fin de desarrollar materiales biológicos con el objetivo de reemplazar, reparar y/o mejorar la función de los tejidos (Zhao et al., 2018). Para ello, se combina la utilización de soportes, células y moléculas biológicamente activas (Han et al., 2020). La MR constituye una amplia rama de conocimiento que combina la IT con la terapia celular, la terapia génica y la utilización de factores de crecimiento para inducir la regeneración *in vivo* del órgano o tejido (Han et al., 2020). Estas áreas en conjunto han realizado aportes

invaluables en el tratamiento de la reparación de tejidos, desarrollando productos y terapias que imitan los mecanismos y/o estructuras que naturalmente intervienen en la renovación celular del organismo, ofreciendo de esta forma, posibles alternativas al trasplante tradicional de órganos y tejidos (Cattalini, 2015; Mahboob et al., 2014; Sundar et al., 2021).

### Sustitutos dérmicos de IT

#### Clasificación y propiedades

El advenimiento de constructos derivados de la IT ha beneficiado ampliamente el tratamiento de heridas cutáneas (Clark, 2014). Los sustitutos dérmicos o andamios constituyen equivalentes de la MEC, ya sea artificiales o naturales, utilizados para inducir la regeneración de tejidos o reemplazar tejidos y órganos dañados (Colorado et al., 2013). Por tanto, éstos son utilizados para colaborar con el cierre de la herida, controlar el dolor asociado o reemplazar la función tisular para promover la cicatrización de ésta (Mahboob et al., 2014). Los mismos funcionan como materiales biomiméticos y como soporte en simultáneo, ya que son capaces de reclutar células, además de proveer un soporte mecánico para éstas (Clark, 2014; Sundar et al., 2021). Existe una importante variedad de sustitutos cutáneos artificiales, debido a la gran diversidad de materiales utilizados, mecanismos de elaboración y técnicas de implementación descrita, por lo que se han creado distintos tipos de clasificaciones para categorizarlos. En el presente trabajo se tomará en cuenta la elaborada por la revisión que se expone en el trabajo de Davison-Kotler et al. (2018), la cual puede observarse en la [Tabla i](#).

**Tabla i: Clasificación de sustitutos cutáneos según sus propiedades.** Descripción de la clasificación de sustituto dérmicos de acuerdo al trabajo de Davison-Kotler et al. (2018).

criterio	Variantes
Estructura anatómica a suplantarse	Derma-epidérmica Epidérmica Dérmica
Duración en la herida	Permanente: No-Biodegradable Temporal: Biodegradable
Cantidad de capas	Monocapa Bicapa
Tipo del biomaterial	Natural: Autólogo, Alogénico o Xenogénico Sintético Ambos
Componente celular:	Celular (presencia de células) Acelular (ausencia de células)

Dentro de esta clasificación cabe destacar que las estrategias en la IT pueden ser celulares y acelulares. Los andamios “celulares” implican que la siembra de células sobre el biomaterial ocurre *in vitro*, previamente a ser implantado en el tejido lesionado, y de esta forma estimular el crecimiento de nuevo tejido. En cambio, la estrategia acelular busca alcanzar el mismo objetivo, pero con la salvedad de que el andamio es implantado en la región dañada para estimular la infiltración de células vecinas responsables de la

deposición de la MEC, o sea que la adición del componente celular ocurre *in vivo* (Colorado et al., 2013).

Tal como se menciona en secciones anteriores, la mayoría de los tejidos nativos poseen células contenidas dentro de una red tridimensional (3D) de MEC. Las características de esta estructura posibilitan la comunicación celular, el transporte de oxígeno y nutrientes, la eliminación de desechos y el propio metabolismo celular (Colorado et al., 2013; Sundar et al., 2021). En este contexto, el reconocimiento de la importancia de la MEC en el proceso de la cicatrización de heridas, ha favorecido el desarrollo de productos que intentan estimular o reemplazar a la MEC (Calne, 2010). Por ende, estos andamios podrían contribuir a la proliferación y diferenciación celular y a la difusión de nutrientes vitales, al ejercer influencias mecánicas y biológicas a las células (Colorado et al., 2013).

Por otra parte, idealmente los andamios deben cumplir con ciertas propiedades fisicoquímicas y biológicas para desempeñarse correctamente. Estas se encuentran listadas junto con la descripción correspondiente en la [Tabla ii](#), y se resumen a continuación. Idealmente los andamios deberían proteger a la herida frente a la infección y la pérdida de fluidos, proveer de un sustrato estable y biodegradable para la síntesis de nuevos tejidos, generando solo una mínima inflamación (Colorado et al., 2013; Sundar et al., 2021; Tripathi et al., 2021). A su vez, deberían permitir la afluencia de células que participan en la regeneración y tener una buena resistencia mecánica sin perder la flexibilidad. Una matriz de reposición debería poder reproducir temporalmente funciones de la epidermis y la dermis durante la cicatrización, estimulando la restauración completa del tejido, evitando contracción excesiva de la herida y reducir el tejido cicatricial. Por último, las matrices de reposición dérmica deberían ser fáciles de manipular y aplicar, de fácil acceso, poseer una larga vida media, pocos requerimientos de almacenamiento y bajo costo (Shevchenko et al., 2010). En cambio, los andamios que se encuentran comercialmente disponibles a nivel mundial no ofrecen una solución capaz de cumplir con todas las necesidades clínicas (Macewan et al., 2017). De hecho, ninguno de estos productos posee todas las propiedades mencionadas previamente, ni tampoco pueden reemplazar completamente las propiedades anatómicas y funcionales de la piel nativa (Chang et al., 2021). En general, estos productos logran reemplazar solo una parte de los requerimientos funcionales de la piel, y para compensarlo, los cirujanos tienden a utilizar diferentes productos para alcanzar objetivos específicos (Shevchenko et al., 2010). Es así que existe una continua necesidad de nuevos andamios de reposición que puedan mejorar los resultados de la cicatrización (Macewan et al., 2017)

Es por esto que el presente trabajo plantea el desarrollo de un andamio de reposición dérmica que simule ciertas características de la MEC, y que genere un entorno propicio para la supervivencia, adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. En ese sentido se optó por un andamio de colágeno bovino, formado por una bicapa de colágeno y condroitín -6- sulfato, cuyos requerimientos ideales se detallan a continuación.

**Tabla ii: Descripción de requerimientos para los andamios de reposición tisular.** \*Aulin, 2010;\*\* Morshed et al., 2014;\*\*\* Cattalini, 2015;

Propiedad	Descripción
Porosidad	Proveer difusión de nutrientes, gases y desechos, y permitir la migración celular *
Propiedades mecánicas	Deberían aproximarse a las del tejido diana * Proveer a las células de soporte ** El material debería poder resistir el estrés ténsil, compresión y otras fuerzas en el lugar donde se implanta, así como la manipulación durante el procedimiento en si mismo. *
Degradabilidad	La tasa de degradación debe coincidir con la tasa de formación del nuevo tejido * No debe generar productos resultantes tóxicos *
Superficie química	Debería lograr promover la adsorción de proteínas y la adherencia celular *
Topografía de superficie	Es importante para la adhesión celular e integración del tejido *
Estructura física	Constituir una barrera hacia el exterior para evitar pérdida excesiva de agua e ingreso de patógenos Relativamente fácil de procesar y de buena maleabilidad a la forma deseada ** Ser esterilizable **
Toxicidad	La materia prima como los productos de degradación del andamio no deben ser tóxicos, ni en corto ni largo plazo.* El material no debe evocar respuestas inmunogénicas o mostrar signos de genotoxicidad *
Biológicas	Inducir y conducir el crecimiento celular ** e inducir el proceso natural de desarrollo de un tejido *** Lograr adherencia celular ** Estimular la respuesta celular **

### Andamio de Col1:GAG

Los andamios de colágeno y condroitín-6-sulfato fueron primeramente desarrollados por Yannas para su utilización en la regeneración de la piel (Burke et al., 1981; I. V Yannas & Burke, 1980). Desde ese entonces, diversas variantes de este andamio han mostrado potencial para utilizarse en la reparación de nervios, cartílago y hueso (Chamberlain et al., 1998; Farrell et al., 2006; Lee et al., 2000) (Chamberlain et al., 1998; Farrell et al., 2006; Lee et al., 2000). En efecto, en el trabajo de Farrell y colaboradores (2006) se demostró que dichas matrices posibilitaban la diferenciación de células mesenquimales estromales adultas a los linajes condrogénicos y osteogénicos.

Este producto se encuentra disponible en el mercado mundial bajo el nombre de Integra® (Integra Life Science Corporation, Plainsboro, Estados Unidos de América). Dicho andamio acelular consiste en un componente dérmico poroso conformado de Colágeno tipo I bovino y GAG de tiburón, unido a una porción pseudo-epidérmica

compuesta por silicona de grado médico (I. V Yannas & Burke, 1980). La porción dérmica del andamio es colonizada por células del huésped, entre las que se incluyen los fibroblastos, los cuales contribuyen activamente a la formación de la neo-dermis, mientras el propio material del andamio va siendo degradado. La porción pseudoepidérmica por su parte, protege a la herida de la pérdida de vapor y contaminación bacteriana (Shevchenko et al., 2010). Cuando la etapa de vascularización y granulación se completan, en general cerca de los 15-20 días, la porción de silicona es removida y la herida puede ser cerrada de forma permanente con un injerto de piel de espesor parcial. Este material ha mostrado buenos resultados en el tratamiento de quemaduras, considerándose un sustituto dérmico “gold-standard” en ciertas regiones del mundo (Shevchenko et al., 2010). Entre las ventajas de este tipo de andamios, se destacan su fácil manipulación, biocompatibilidad, porosidad y generación de productos de degradación no tóxicos. A su vez, la innata disponibilidad de sitios de unión del colágeno, permite que éstos puedan ser utilizados como vehículo de citoquinas y factores de crecimiento (Haugh, 2009; Shevchenko et al., 2010). Sin embargo, al igual que otros andamios comercialmente disponibles, éste posee ciertas desventajas. Entre éstas se señala que para utilizar este producto se requiere una meticulosa preparación quirúrgica del lecho de la herida para garantizar una buena integración del biomaterial, no pudiendo utilizarse en heridas infectadas. Además, requiere un tiempo relativamente largo para la vascularización, y requiere una segunda intervención quirúrgica para remover la porción pseudoepidérmica (Shevchenko et al., 2010).

En base a este problema sanitario identificado en nuestro país, y teniendo en cuenta el potencial de los andamios que emulan la MEC, investigadores del Centro NanoMat (Instituto Polo Tecnológico de Pando), y DETEMA (Facultad de Química, UdelaR) han venido desarrollando un protocolo para la elaboración de un biomaterial para reposición dérmica. Considerando los recursos y *know-how* disponible en el país, se procedió a trabajar en la elaboración de un producto de similares características de Integra®, pero compuesto de colágeno tipo I y condroitin 6-sulfato bovino de origen nacional, efectuando además otras modificaciones (detalladas en el capítulo 1).

### Colágeno tipo I:

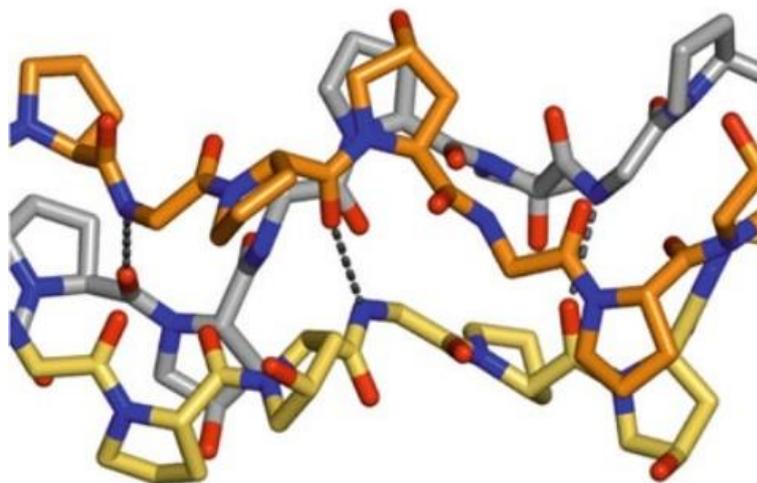
El colágeno es la proteína más abundante en el ser humano y la mayoría de los vertebrados. Consiste en un gran polímero estructural que otorga integridad estructural y rigidez a los tejidos del organismo, tales como los tendones, hueso, cartílago y la piel (Ågren, 2016b; Millán, 2014; Wessels, 2007). Los biomateriales a base de colágeno han sido ampliamente utilizados en diversas aplicaciones de IT por varias razones. El colágeno es un material altamente estudiado y caracterizado, y como tal, reconocido como un material seguro, biocompatible y biodegradable, capaz de proporcionar no solo gran resistencia a la tensión y limitada extensibilidad, sino que además interviene en la funcionalidad celular (Caliari, 2013; Mahboob et al., 2014; Millán, 2014; Sundar et al., 2021; Tripathi et al., 2021).

Existen más de 29 tipos de colágenos encontrados en el ser humano, dentro de los cuales el colágeno tipo I (Col1) es el más abundante. A nivel celular, el Col1 actúa como componente estructural pero también media funciones biológicas como: unión celular, migración, crecimiento y quimiotaxis (Khang, 2017). El Col1 es parte de la subclase de

colágenos llamada colágeno fibrilar, por su capacidad de ensamblarse en complejos altamente ordenados. La mayoría de la fuerza mecánica e integridad molecular presente en el colágeno está dada por su estructura jerárquica. Variaciones sutiles en dicha estructura le permiten ser lo suficientemente versátiles para constituir desde tejido blando hasta hueso.

En particular, los derivados del colágeno bovino se encuentran actualmente aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y percibidos como elementos de bajo riesgo. El colágeno bovino, tiene buena adherencia y excelente potencial de vascularización, pero tiene como desventaja de no ser tan eficiente en la función de barrera y elasticidad (Tripathi et al., 2021), y su incapacidad para prevenir la invasión bacteriana (Colorado et al., 2013). La literatura actual indica que los mayores inconvenientes que los científicos se han enfrentado al sintetizar andamios de colágeno para su aplicación en IT son su rápida degradabilidad y su baja resistencia mecánica. Para intentar compensar estas problemáticas, el colágeno es modificado mediante distintos agentes de entrecruzamiento para modificar sus propiedades fisicoquímicas (Sundar et al., 2021).

Todos los tipos de colágeno se componen de 3 cadenas polipeptídicas llamadas cadenas  $\alpha$  (Figura ii). En particular, el Col1 es un heterotrímero constituido por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$  (Millán, 2014). Estas cadenas se alinean paralelamente y se enrollan en una hélice levógira, que está estabilizada por enlaces de hidrógeno entre cadenas



**Fig. ii: Estructura de la triple hélice de colágeno para el modelo peptídico (Gly-Pro-Hyp).** Cada cadena polipeptídica forma una hélice levógira de Poliprolina (representadas por los colores naranja, amarillo y gris), las cuales se entrelazan formando una súper hélice dextrógira. La estructura completa es estabilizada por puentes de hidrógeno entre los grupos NH de la Glicina y los grupos CO de la Hidroxiprolina de la cadena vecina. Otra importante estabilización de la cadena surge de los enlaces N-C presentes en los residuos aminoacídicos, los cuales favorecen la estabilización de la hélice de poliprolina. Los anillos de las prolinas se encuentran apuntando hacia afuera de la hélice, lo cual les permite interactuar con otras fibras de colágeno u otras estructuras de diferente conformación. N y O se observa marcados en azul y rojo respectivamente. Imagen obtenida de Mecham (2011).

(Ågren, 2016a; Chattopadhyay & Raines, 2014). Cada cadena contiene alrededor de 1000 aminoácidos (AA), y a pesar de las diferencias en secuencia de AA entre tipos de colágeno, todos comparten una secuencia en común de Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier AA pero usualmente son ocupados por prolina e hidroxiprolina. Esto convierte a Gly-Pro-Hyp en el triplete más común del colágeno (Ågren, 2016a; Chattopadhyay & Raines, 2014; Khang, 2017). La repulsión estérica entre los residuos de Pro y Hyp ayuda a mantener la hélice enrollada, forzando a las moléculas de Gly hacia el interior de la hélice asegurando así el empaquetado apretado de las tres hebras en una hélice de tropocolágeno (Fullana, 2015). El tropocolágeno que se considera la unidad básica del colágeno, posee un peso molecular general de ~300 kDa, longitud de 280 nm y ancho de 1.5 nm (Khang, 2017). Tres cadenas  $\alpha$  simples se unen para dar lugar a una triple hélice dextrógira, conocida como procolágeno. Las regiones de la triple hélice que tengan la secuencia Gly-Pro-Hyp tendrán un bucle más apretado, con 7 AA cada 2 vueltas. El resto de la hélice que tiene bajo contenido de grupos de AA posee una hélice con bucle más suelto, 10 AA cada 3 vueltas. La variación entre simetrías dentro de la triple hélice es crucial para el correcto ensamblaje de la misma en fibras y estructuras más organizadas (Fullana, 2015).

En los extremos N- y C- terminal de las moléculas de colágeno, existen áreas caracterizadas por la alta cantidad de Hyp y Pro, y la consecuente falta de estructura de triple hélice. Estas regiones se denominan telopéptidos, y son regiones ricas en residuos de lisina e hidroxilisina, y poseen las siguientes funciones: estabilización de la molécula mediante entrecruzamiento intramolecular, formación y estabilización de las fibras de colágeno mediante entrecruzamiento intermolecular, constituyendo puntos de unión con proteínas de la MEC, y formación de los llamados “extremos pegajosos” mediante puentes disulfuro para estimular el autoensamblaje. Las moléculas de tropocolágeno se ensamblan de forma escalonada, de manera que cada molécula se solapa aproximadamente  $\frac{1}{4}$  con la molécula vecina (67 nm), siendo estabilizadas mediante enlaces covalentes intramoleculares. Este proceso se repite hasta que una fibra de cierta dimensión se forma. Este fenómeno puede detectarse mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), y se observa como el característico patrón de bandas, en el que se alternan estriaciones claras y oscuras, generando así la estructura cuaternaria del colágeno. Este patrón de bandas posee una periodicidad de 67-70 nm y se conoce como Período D (Fullana, 2015; Khang, 2017). Por otro lado, el extremo N- del telopéptido está vinculado con la regulación del grosor de las fibras. El diámetro de la fibra junto con la distribución de otras dimensiones de ésta, son importantes determinantes de las propiedades mecánicas del tejido, de manera que fibras muy gruesas poseen una gran resistencia tensil, pero son susceptibles a la deformación plástica, mientras que las fibras más finas son menos sensibles a este fenómeno. Las fibras colagénicas pueden unirse formando haces, dando lugar a la característica estructura entretejida de los haces de colágeno. Es importante destacar que la estructura cuaternaria del colágeno se desarma como resultado de la precipitación en ácido durante la fabricación de la matriz Col1:GAG, limitando así también la adherencia plaquetaria *in vivo* (Caliari, 2013).

La estructura característica del colágeno, es lo que le permite tanto proveer soporte estructural al tejido y a su vez, la adherencia de células. Estas propiedades resultan especialmente beneficiosas al utilizar el biomaterial para estimular el proceso de

cicatrización. En teoría, esto se debería a que el colágeno exógeno estimula la homeostasis mediante la iniciación de la adherencia y agregación plaquetaria, iniciando así la quimiotaxis de los granulocitos, macrófagos y fibroblastos. A su vez, el colágeno, sirve como andamio para la adherencia, infiltración y proliferación celular. Además, el colágeno del andamio incrementa la cicatrización al actuar como un modelo para la producción y orientación del colágeno endógeno (Wessels, 2007). Cabe destacar también, que el colágeno resulta extremadamente útil como biomaterial que generalmente es reconocido como propio por el sistema inmune del paciente; de hecho, al ser un sustrato de origen natural y una molécula evolutivamente conservada, es menos probable que sea rechazado por el huésped, incrementando la posibilidad de una integración exitosa al tejido (Ågren, 2016b). Por último, es sabido que ciertas secuencias de las fibras de colágeno, estimulan la proliferación y diferenciación celular, haciendo de éste un material con múltiples aplicaciones (Ågren, 2016b). Un ejemplo de estas posibles aplicaciones, son en forma de esponjas porosas, tal como la que se desarrolla en este estudio.

### *Condroitín-6-sulfato*

El condroitín-6-sulfato (GAG) consiste en dos monosacáridos alternados, ácido D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina sulfatada, por tanto, forma parte de la familia de los glicosaminoglicanos sulfatados. Posee un peso molecular entre 20-60 kDa, y constituye el glicosaminoglicano más abundante del organismo, siendo un importante componente del cartílago (Khang, 2017). Este tipo de moléculas posee una carga negativa importante debido a la presencia de los grupos sulfatos, lo cual genera una presión osmótica alta. En consecuencia, la molécula logra atraer grandes cantidades de agua, lo cual le permite adquirir resistencia a la compresión y a la deformación repetitiva (Caliari, 2013).

Por otro lado, se ha comprobado que estas moléculas son biocompatibles y no-inmunogénicas (B. C. Harley & Gibson, 2008). Asimismo, actúan como sustituto de la MEC, sirviendo como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento, modulando la bioactividad del biomaterial. Además, es capaz de otorgar un marco estructural a los fibroblastos durante la regeneración epitelial (Ågren, 2016b; Khang, 2017). Otro motivo que también estimula su incorporación en la matriz de estudio, es el hecho de que distintos trabajos han demostrado que es capaz de mejorar distintas propiedades del colágeno, tales como la resistencia a la degradación enzimática, la porosidad y la elasticidad (Matsuda et al., 1990; Zou et al., 2004).

### Células e ingeniería tisular

Si bien existen sustitutos dérmicos muy prometedores en el mercado, todavía no ha sido posible crear un andamio que imite exactamente todas las características de la piel (Ågren, 2016a). Por tanto, la incorporación de células a los biomateriales podría resultar en una estrategia eficiente para las actuales terapias que restauran tejido dañado (Xie et al., 2013). La terapia celular, utilizada para sustituir o reparar la función de células o tejidos lesionados, consiste en administrar células vivas a un receptor por la vía de administración más adecuada y en cantidades suficientes para que sobrevivan y restauren la función normal. De hecho, es posible combinar la utilización de células con un andamio, constituyendo un producto de ingeniería tisular. El mecanismo de acción de las células administradas puede ser *sustitutivo*, implantándose y diferenciándose

para reconstituir el tejido dañado, o ejerciendo un *efecto parácrino* por liberación de sustancias bioactivas que limitan el daño tisular y estimulan la propia regeneración del tejido. Se podrían utilizar células de diferente grado de diferenciación según el tejido a tratar. Las células más diferenciadas tienen el inconveniente de la menor capacidad proliferativa y la senescencia.

En este sentido, una de los tipos celulares más prometedoras para la IT y MR, podrían ser las células madre, debido a su potencialidad en diferenciarse a distintos linajes celulares de acuerdo a la fuente celular utilizada. Las células madre, también llamadas células tronco, células troncales o células "stem" (del inglés: stem cells) constituyen células indiferenciadas no especializadas, con la capacidad de auto-renovarse y con el potencial de diferenciarse en células especializadas de más de un linaje pudiendo luego madurar y llevar a cabo funciones específicas. Por lo tanto, los criterios mínimos necesarios para definir a células madre adultas son la indiferenciación, la multipotencialidad y la capacidad de autorrenovación.

Dentro del este grupo de células madre adultas, varios autores incluyeron a las células "madre"-estromales mesenquimales (Del inglés, MSC: Mesenchymal Stem/Stromal Cells). Las MSC constituyen una población heterogénea de células multipotentes adultas presentes en la fracción estromal de varios tejidos. Dicha población fue caracterizada inicialmente por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea (BMSC) y las describió como una población de células adherentes, de morfología fibroblastoide (llamadas unidades formadoras de colonias fibroblastoides), en analogía con su contraparte hematopoyética (Friedenstein et al., 1968). Estudios posteriores demostraron el potencial de diferenciación múltiple *in vitro* de estas células hacia linaje mesodérmico, como osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Posteriormente, se demostró que las MSC pueden aislarse de varios tejidos como tejido adiposo, cordón umbilical, entre otros. De hecho, se considera que residen en el tejido conectivo de la mayoría de los órganos y tejidos a una frecuencia muy baja y que tienen como rol principal la homeostasis y reparación del tejido en que se encuentran. En 1991, Caplan propuso llamar a estas células "Mesenchymal Stem Cells" o "Células madre mesenquimales" (Caplan, 1991). En los últimos años, se ha generado un gran debate en relación a la definición de esta población celular obtenida por adherencia al plástico. Esta metodología permite obtener una población heterogénea de células y no todas cumplen con las propiedades de células madre. El estudio y demostración de estas tres propiedades, es relativamente complejo y no sería práctico su realización, previo a la administración de estas células con fines terapéuticos. Por ello, algunos autores, como Keating, proponen mantener la sigla (en inglés MSC) pero cambiando el significado de "Mesenchymal Stem Cells" a "Mesenchymal Stromal Cells" (Keating, 2012). Asimismo, el propio Caplan argumentó que era tiempo de cambiar el nombre de esta población celular y solicitó que si querían les llamaran MSC (manteniendo la sigla) pero que no le llamaran "stem cells" (Caplan, 2017). En cuanto a la multipotencialidad de las células estromales mesenquimales, si bien como mencionamos previamente, ha sido demostrada experimentalmente *in vitro*, en modelos *in vivo* no existe evidencia contundente. Por otra parte, en relación a la capacidad de autorrenovación existen ciertos trabajos que han aportado evidencia a favor de esta propiedad. Sin embargo, como ya fue mencionado, sólo algunas células de esta población cumplirían con esta propiedad y se requieren de estudios complejos para evaluar esta propiedad, lo cual lo hace poco práctico al momento de pensar en una

aplicación clínica. También se observó que las poblaciones de MSC derivadas de diferentes tejidos muestran características diferentes, lo cual dificulta la creación de una definición universal. Esto se traduce en la gran variabilidad de los resultados de los ensayos clínicos con terapias que utilizan MSC, junto con la ausencia de protocolos estandarizados para preparar y caracterizar a estas células. En vista a estos problemas, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso denominar a esta población celular aislada por adherencia al plástico como “Células estromales mesenquimales multipotentes” (CEM, manteniendo la sigla MSC en inglés- “mesenchymal stromal cells”), en lugar de “Mesenchymal Stem Cells”(MSC), remarcando que no todas son verdaderas células madre con capacidad de autorrenovación y diferenciación *in vivo* (Dominici et al., 2006). De acuerdo a los criterios establecidos por la ISCT las MSC humanas cultivadas deben poseer: adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo, expresión de los antígenos CD105, CD73 CD90 y CD44; falta de expresión de los antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alfa o CD19 y HLA-DR, y capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* (Ávila, 2019; Pittenger et al., 2019). En efecto, las MSC son células no hematopoyéticas capaces de derivar a diferentes linajes celulares, dependiendo tanto del microambiente en el que se encuentren, como de la interacción y señalización que establezcan con la matriz extracelular del entorno.

Las MSC poseen características que resultan especialmente atractivas para la MR tales como: alta capacidad de proliferación *in vitro*, multipotencialidad, capacidad de migrar y adherirse a sitios de inflamación o injuria, secreción de moléculas bioactivas que estimulan la proliferación celular, efectos antiinflamatorios, capacidad de evadir el reconocimiento del sistema inmune y capacidad inmunomoduladora (Aggarwal & Pittenger, 2005; Keating, 2012; Pittenger et al., 2019), así como la capacidad de promover la angiogénesis (Jackson et al., 2012; Marino et al., 2014). En efecto, las MSC han sido evaluadas en un número importante de estudios y han mostrado resultados prometedores (Pittenger et al., 2019; Young et al., 1998).

En los últimos años, las células estromales mesenquimales son el tipo celular más ampliamente utilizado como terapia experimental basada en células para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas. Su extensa utilización se debe a su potencialidad demostrada en un amplio rango de modelos animales y a su excelente perfil de seguridad en humanos (Pittenger et al., 2019; Young et al., 1998). Sin embargo, como ya fue mencionado anteriormente, el mecanismo de acción preciso de las MSC administradas en humanos en las diferentes patologías es aún, un área de intensa investigación.

Particularmente, desde hace ya un par de décadas, las MSC han emergido como una terapia prometedora para el tratamiento de heridas con cicatrización enlentecida. De hecho, el tratamiento de heridas con MSC se ve altamente beneficiado ya que acelera el cierre de la herida, aumenta la formación del tejido de granulación y estimula la angiogénesis. Sorpresivamente, estas consecuencias positivas sobre la cicatrización, no se deberían a la capacidad de las MSC de diferenciarse y reemplazar la porción de piel dañada, sino que las MSC ejercerían su efecto terapéutico mediante la secreción de factores solubles que regulan la respuesta celular ante la injuria cutánea (Hocking, 2012). Entre estos se encuentran: factores de crecimiento (VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , etc),

citoquinas (como por ejemplo diversas interleucinas), microARNs y otras moléculas de señalización celular. La composición y concentración de estas moléculas secretadas por las MSC varía dependiendo del tipo de tejido y las condiciones del microambiente en el que se encuentren (Chang et al., 2021). De hecho, al conjunto de las moléculas secretadas por las MSC junto con el medio condicionado en el que se están sembradas, se le denomina secretoma y posee potenciales diversos efectos terapéuticos tal como se detalla en la revisión de Chang et al (2021). Esto se debe a que las moléculas secretadas cumplen diversas funciones biológicas tales como antiapoptosis, angiogénesis, inmunomodulación, quimioatracción, proliferación, antifibrosis y neuroprotección (Chang et al., 2021).

Por otro lado, la utilización de las células indiferenciadas para la IT y MR requiere sistemas de diferenciación efectivos. Durante la diferenciación, el ambiente extracelular, en especial la MEC, cambia dinámicamente regulando dicho proceso. Por ende, se considera que la MEC juega un rol fundamental en dicho proceso (Murphy et al., 2012). Sin embargo, el rol de la remodelación de la MEC en la diferenciación aún no ha sido completamente esclarecido, principalmente debido a la falta de modelos *in vitro* capaces de imitar la MEC durante la diferenciación. Por tanto, es importante focalizar esfuerzos en el desarrollo de este tipo de modelos para mejorar la comprensión del proceso, para así establecer sistemas efectivos de diferenciación (Hoshiba et al., 2010).

En este contexto, este trabajo analizó la proliferación y diferenciación de células estromales mesenquimales de médula ósea (BMSC), las cuales fueron obtenidas de donante cadavérico mediante el protocolo desarrollado por la MSc Lourdes Etcharte para su trabajo de Doctorado. Dichas propiedades biológicas fueron analizadas sembrando las BMSC sobre la matriz sintetizada en este estudio.

En suma, el presente estudio se propuso desarrollar un sustituto de reparación tisular, utilizando como materia prima Col1 y GAG bovinos de origen nacional. Para ello, se optimizó el protocolo de síntesis elaborado previamente por el grupo de trabajo del Centro NanoMat y DETEMA, para lograr producir de forma estandarizada una matriz que posee las características fisicoquímicas y biológicas adecuadas para lograr inducir la regeneración cutánea.

Cabe destacar que en el Centro NanoMat del Polo Tecnológico de Pando, DETEMA, (Facultad de Química, UdelAR) se viene trabajando intensamente desde hace varios años en el desarrollo de esta matriz colagénica. De hecho, es importante mencionar que fue el Dr. Álvaro Mombrú fue quién introdujo esta temática en Uruguay y al Centro NanoMat al identificar la necesidad de este tipo de alternativas terapéuticas a nivel nacional. En vista de esta urgente necesidad, en el año 2007 el Dr. Mombrú presenta el proyecto ante CSIC (Modalidad Innovación focalizada a la inclusión social) titulado “A la búsqueda de una solución para el tratamiento de lesiones y quemaduras en población de riesgo”. Dicho proyecto obtuvo la financiación entre los años 2008-2010, y permitió sentar las bases y know-how en la elaboración de de las matrices colagénicas sobre las que se propone seguir avanzando en este proyecto.



## OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Optimizar el desarrollo y avanzar en la caracterización de una matriz colagénica como sustituto dérmico para estimular la reparación y/o regeneración tisular

### *Objetivos específicos*

- Sintetizar un andamio poroso de reposición dérmica utilizando colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato de origen bovino y nacional.
- Caracterizar tanto física como químicamente la matriz de colágeno sintetizada, determinando la influencia de las estrategias de entrecruzamiento sobre estas
- Estudiar el comportamiento de la matriz frente a distintos sistemas biológicos, de acuerdo al potencial uso planteado.
- Estudiar distintas funciones biológicas de las células sobre la matriz.
- Evaluar de forma preliminar la biocompatibilidad in vivo de la membrana en un modelo murino

## ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO

Los investigadores del Centro NanoMat (Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR) han venido trabajando en esta línea de conocimiento desde el año 2007. Como resultado de dicho trabajo se logró elaborar un protocolo que tomó como punto de partida el extenso trabajo realizado por Yannas et al. (1989), desarrollando así una primera aproximación a una bicapa artificial, compuesta por colágeno tipo 1 y condroitin 6-sulfato de origen bovino y nacional. El presente trabajo pretende optimizar dicho protocolo, incorporando algunas mejoras de la literatura actual y teniendo en cuenta los recursos disponibles en el país. Con este fin, en los siguientes capítulos se procederá a detallar la fabricación y caracterización de un producto con características de “sustituto dérmico”, a partir de materias primas de origen nacional.

En el primer capítulo, se llevará a cabo la descripción y consideraciones de la elaboración de dicho producto. En la primera parte de dicho capítulo se argumentarán los procedimientos previamente desarrollados en el laboratorio, junto con las modificaciones adoptadas en el presente trabajo. En la segunda parte del capítulo 1, se detallará el protocolo final junto con la descripción de las distintas matrices resultantes de estas modificaciones.

En el capítulo 2, se expondrá la caracterización fisicoquímica de las distintas matrices colagénicas resultantes de los procesos de síntesis establecidos en el capítulo 1. Dicha caracterización, tendrá como objetivo describir y comparar estas propiedades para seleccionar cuál de los procesos de síntesis propuestos origina matrices más adecuadas para su posterior utilización como producto de reposición dérmica. Dentro de esta caracterización se incluyen estudios de la morfología y la microestructura de las matrices, análisis biomecánicos, determinación de la resistencia a la degradación enzimática y su estabilidad térmica. Por último, se procederá a presentar los estudios espectrales para detectar posibles modificaciones moleculares resultantes de los distintos protocolos de síntesis, y la posible influencia sobre estas propiedades de los métodos de entrecruzamiento seleccionados.

Una vez seleccionado el proceso de síntesis que originó el producto más adecuado posible, se efectuó la evaluación biológica del producto presentada en el capítulo 3. Esta caracterización biológica fue efectuada mediante evaluación de citotoxicidad, adherencia y proliferación de ciertos sistemas biológicos sobre el andamio seleccionado. Por último, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* con carácter preliminar para evaluar la biocompatibilidad del andamio en un modelo murino, teniendo en cuenta la funcionalidad preestablecida que se le ha adjudicado.

# CAPÍTULO 1: DESARROLLO DE LA MATRIZ BIOPOLIMÉRICA DE COLÁGENO

## *Generalidades*

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, investigadores del Centro NanoMat (Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR) han venido desarrollando un protocolo de elaboración de un biomaterial compuesto de colágeno tipo I y condroitín 6-sulfato de origen nacional, que logre simular ciertas características de la MEC.

El presente trabajo pretende introducir mejoras a dicho protocolo mediante la incorporación de algunas actualizaciones presentes en la literatura y adaptándolas a los recursos disponibles del laboratorio y en el país. De esta forma, el objetivo de la siguiente sección será describir el proceso de fabricación de la matriz con potencial de reparación tisular, mediante la aplicación de técnicas de la ingeniería de tejidos y de medicina regenerativa.

Las propiedades físicas y químicas de un biomaterial que simula la MEC se encuentran influenciadas por la fuente de las materias primas, su procesamiento, entrecruzamiento y esterilización (Cornwell et al., 2009). Por lo tanto, en este capítulo primero se expondrán las consideraciones y explicaciones de pasos a efectuar para generar un método reproducible de fabricación de un andamio de reposición tisular; y en la segunda parte del capítulo se resume el protocolo de síntesis seleccionado.

## *Introducción*

### *Extracción del colágeno tipo 1*

El producto desarrollado en este trabajo utilizó como materia prima principal colágeno soluble tipo I obtenido a partir de tendón bovino. La elección de este material surge como estrategia para reducir los posibles costos de producción, ya que el tendón bovino constituye un subproducto de la industria cárnica nacional, pudiendo ser adquirido en grandes cantidades y a bajo costo. A su vez, cabe destacar que la República Oriental del Uruguay es un país libre de encefalitis espongiforme bovina (“enfermedad de la vaca loca”), de acuerdo con lo establecido tanto por el Ministerio de Agricultura y Pesca del Uruguay como por The World Organization for Animal Health (WOAH, 2020). Por lo tanto, ambas situaciones posibilitan la elección del tendón bovino como materia prima segura desde el punto de vista bromatológico y de bajo coste.

En este trabajo se utilizaron tendones de Aquiles de ganado bovino joven (hasta 24 meses de edad), debido a que la solubilidad y la cantidad de colágeno extraído decrecen proporcionalmente con la edad del animal (Miller et al., 1983). Tal como se realizó en otros estudios, los mismos fueron diseccionados manualmente de la fascia circundante y del resto de tejidos no tendinosos. Los tendones obtenidos son lavados con abundante agua y puestos a congelar. Una vez congelados, se procedió a triturar en máquina picadora de carne limpia y desinfectada. Los tendones triturados se mantuvieron congelados a -20 °C hasta ser utilizados para evitar la desnaturalización por calor (Zeugolis et al., 2008).

La técnica utilizada para extraer el colágeno tipo I del tendón fue mediante solubilización con ácido acético glacial (HAc) y sales neutras. Una posible desventaja de esta técnica, es que deja las regiones de telopéptidos del colágeno, lo cual podría llegar a reducir la biocompatibilidad del producto (Wessels, 2007; Zeugolis et al., 2008). Sin embargo, la técnica de solubilización con ácidos se utiliza en una gran cantidad de estudios (Harley et al., 2007; Liang et al., 2008; Orgill & Blanco, 2009; Wolever, 2010; Zhao & Wu, 2006), debido a su practicidad y a que se ha demostrado que las fibras colagénicas que se originan luego de la extracción ácida poseen el bandeo característico de la molécula de 67 nm, y en general son más similares a su disposición *in vivo* que las fibras tratadas con enzimas proteolíticas (Zeugolis et al., 2008). De hecho, estudios reportan al HAc como un buen solvente del colágeno, que selectivamente degrada el bandeo de la molécula sin afectar la estructura de la triple hélice. La exposición inadecuada a este ácido, ya sea en tiempo o concentración, podría generar una pérdida incompleta del bandeo con el consecuente incremento en la agregación plaquetaria en la superficie de la matriz (Yannas et al., 2010).

El colágeno extraído con la metodología utilizada en el presente estudio fue previamente analizado mediante SDS-PAGE. Los resultados indicaron que el material extraído observó patrones moleculares en concordancia a lo esperado para el colágeno soluble (Anexo 1).

#### Preparación del co-precipitado colágeno: GAG

El otro componente principal de la matriz de reposición dérmica desarrollada en este trabajo es el condroitín-6-sulfato, también de origen bovino (Syntex Uruguay S.A). La incorporación de este componente se debe a que, además de sus propiedades biológicas (Zou et al., 2004), tiene la capacidad de mejorar la microestructura y las propiedades mecánicas de los andamios (Wessels, 2007; Zou et al., 2004).

La suspensión de colágeno resultante de la extracción es precipitada mediante la adición de glucosaminoglicanos sulfatados, como lo es el condroitín-6-sulfato. Dicha precipitación ocurre por complejización de los dos polímeros (Yannas et al., 2010) (Yannas et al., 2010). En este proceso, es importante considerar la cantidad y la forma en la que el GAG es adicionado a la suspensión de colágeno. Esto se debe a que si se agrega GAG por debajo del nivel óptimo, se pierde gran parte de la capacidad de mejora de las propiedades de la matriz que proporciona este componente (Yannas et al., 2010). Por otro lado, si se sobresatura la solución, no se forma un precipitado homogéneo, sino que ambos componentes se aglutinan y decantan, no pudiendo ser utilizados para fabricar la matriz. De hecho, la mayoría de los estudios reportan a 92:8 como la proporción Col1:GAG que produce estructuras y propiedades adecuadas para obtener matrices biológicamente activas (Wessels & Pretorius, 2008). Por tal motivo, se decidió modificar la relación m/m Col1:GAG propuesta por el protocolo al que se llegó previamente a este trabajo (5:1). A su vez, también la forma de adicionar el GAG fue reemplazada, por una disolución previa del GAG en HAc adicionada gota a gota manteniendo la suspensión colagénica en agitación, de acuerdo a lo sugerido (Liang et al., 2008).

Por su parte, el Col1 tendrá una concentración final de 0.5 % m/v en el precipitado generado, de acuerdo a lo indicado en otros trabajos (F. J. O'Brien et al., 2005a; Wessels & Pretorius, 2008). Para ello el colágeno extraído se disuelve con solución HAc 0.1 M a

pH = 3.2. Este pH bajo genera que las fibras de colágeno se expandan, destruyendo la estructura cuaternaria al igual que el bandeado periódico de las fibras. Estos cambios estructurales remueven una gran parte de los marcadores inmunológicos de la superficie del colágeno, reduciendo la respuesta inmunológica del huésped, y previniendo la agregación plaquetaria y la adherencia sobre la superficie de la matriz (Harley, 2006). Por otro lado, otros estudios demuestran que el pH del co-precipitado influencia la porosidad de la matriz, y establecen que pHs cercanos al utilizado en este estudio, producen arquitecturas más fibrosas (Doillon et al., 1986; Wessels, 2007).

De esta forma, el GAG fue adicionado a la suspensión de colágeno en HAc, lo que dio lugar al entrecruzamiento espontáneo de las fibras colagénicas hinchadas mediado por las moléculas de GAG, ocasionando la precipitación del contenido y dando lugar a la suspensión CG (Harley, 2006).

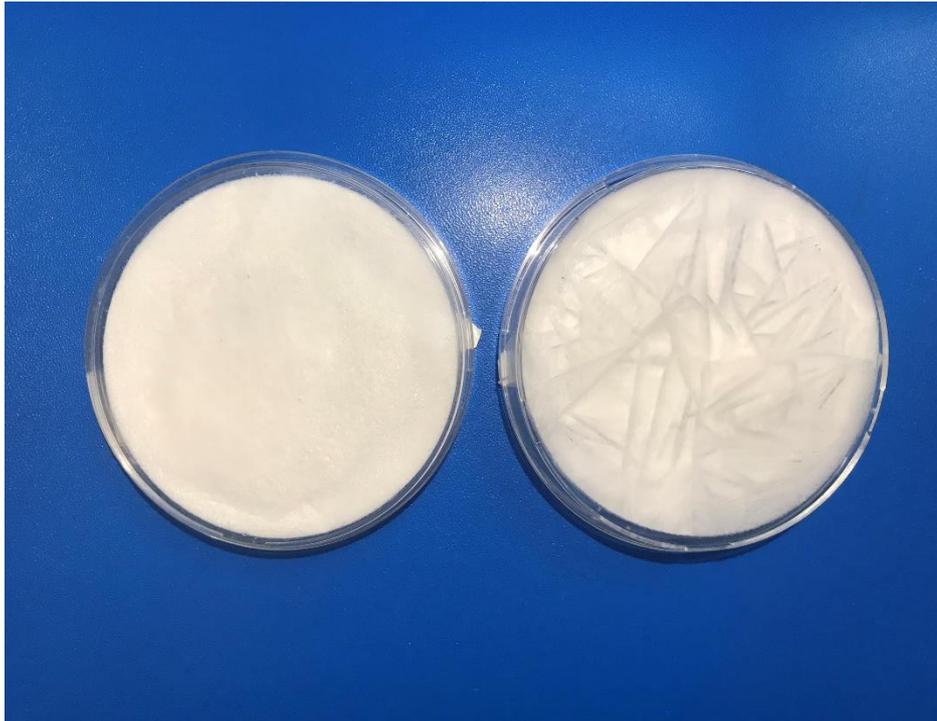
#### *Congelamiento del co-precipitado colágeno: GAG y liofilización*

Las matrices evaluadas en este trabajo fueron fabricadas mediante el proceso de liofilización de la suspensión CG congelada. Esta técnica consiste en solidificar la suspensión CG mediante el congelamiento, forzando al co-precipitado de CG a que quede localizado entre los cristales de hielo que se están formando (Freyman et al., 2001; F. J. O'Brien et al., 2005a). Este proceso genera una continua red de cristales de hielo rodeada por las fibras del co-precipitado. La sublimación subsiguiente de los cristales de hielo durante la fase de secado, resulta en la formación de una matriz altamente porosa (Haugh et al., 2010). Debido a que la estructura porosa de las matrices refleja la red cristalizada de hielo formada durante el congelamiento, la estructura porosa puede ser efectivamente controlada mediante la alteración del proceso de congelamiento utilizado durante el liofilizado (Ågren, 2016b; Murphy et al., 2010; O'Brien et al., 2005a). De hecho, la selección adecuada de los parámetros de transferencia de calor, junto con el apropiado control de la etapa de congelamiento, genera como resultados matrices de estructura más homogénea (Ågren, 2016b; Yannas et al., 2010). Por tanto, la porosidad y el tamaño de los poros puede ser controlada por la fracción del volumen del precipitado en la suspensión y por el propio proceso de congelado (O'Brien et al., 2005a). A su vez, algunos trabajos han evaluado los efectos de la tasa de enfriamiento y de la temperatura de congelamiento ( $T_c$ ) utilizados durante el proceso de congelamiento (Haugh et al., 2010; O'Brien et al., 2005a). Los mismos permitieron determinar que la tasa de enfriamiento determina la homogeneidad de la estructura, mientras que la  $T_c$  influencia el tamaño de poro. Los resultados de dichos trabajos muestran que el tamaño de poro se reduce al utilizar  $T_c$  menores a  $-40$  °C. Esto se debe a que la formación de los cristales de hielo en la suspensión está influenciada por la tasa de nucleación y la tasa de difusión térmica y proteica, proceso primeramente controlado por la  $T_c$  y la transferencia de calor asociada al congelamiento. Cuando la  $T_c$  se reduce, la tasa de difusión térmica y proteica también decrecen, reduciendo así el tamaño de los cristales de hielo que se forman, y como consecuencia, se obtienen matrices con poros más pequeños. Al mismo tiempo, otros estudios establecen que la tasa de enfriamiento también afecta la uniformidad de la estructura porosa. Se encontró que tasas de enfriamiento de  $0,9$  °C/min producían matrices de estructura homogénea, mientras que, tasas más rápidas o más lentas generaban matrices con uniformidad de estructura reducida.

En el presente trabajo, se adicionaron algunas de estas estrategias al protocolo anterior con el fin de obtener matrices de estructuras más homogéneas. Con este fin se ideó un dispositivo que permitiera congelar la suspensión de CG de forma más lenta y controlada ([Figura 1.1](#)). Dicho dispositivo se basó en el diseño del dispositivo “Mr. Frosty” (ThermoFischer®), utilizado originalmente para congelar células a una tasa semi controlada de aproximadamente 1°C/minuto (LI et al., 2019). El mismo consistió en un baño de alcohol isopropílico 100% dentro de una caja de poliuretano, en la que se coloca una bandeja de metal sobre la que se sitúan las placas conteniendo la suspensión CG. Luego de colocar las muestras, el dispositivo se cierra lo más herméticamente posible, y se enfría en un freezer a -80 °C durante 48 horas, para así establecer un equilibrio entre el isopropanol líquido y el gaseoso. Si bien este implemento no es comparable a los sistemas de descenso programado de temperatura, que realizan un descenso de temperatura con tasas de congelamiento constantes y exactas, su incorporación al proceso de síntesis permitió obtener una estructura de poros con una distribución de tamaños adecuadamente homogénea ([Figura 1.2](#)). A su vez, se detectó una importante reducción en la formación de grietas a causa de un proceso de congelamiento más acelerado, lo que permite una mayor eficiencia en la producción de matrices ya que se minimiza el descarte.



**Fig. 1.1: Dispositivo de congelamiento semicontrolado. El dispositivo consistió en un baño de alcohol isopropílico dentro una caja de poliuretano, en la que se coloca una bandeja de metal sobre la que se sitúan las placas conteniendo la suspensión de colágeno y condroitín-6-sulfato, luego la caja se cierra lo más herméticamente posible y es almacenada en freezer a -80 °C.**



**Fig. 1.2: Comparación de matrices con y sin descenso controlado de temperatura.** La imagen muestra matrices con la misma suspensión de colágeno y condroitín-6-sulfato, pero congeladas de forma diferente. La matriz de la izquierda fue congelada dentro del dispositivo casero de descenso controlado y la matriz de la derecha fue colocada directamente en el freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta última presenta grietas en su estructura como consecuencia de la formación de cristales de hielo de gran tamaño durante el congelamiento.

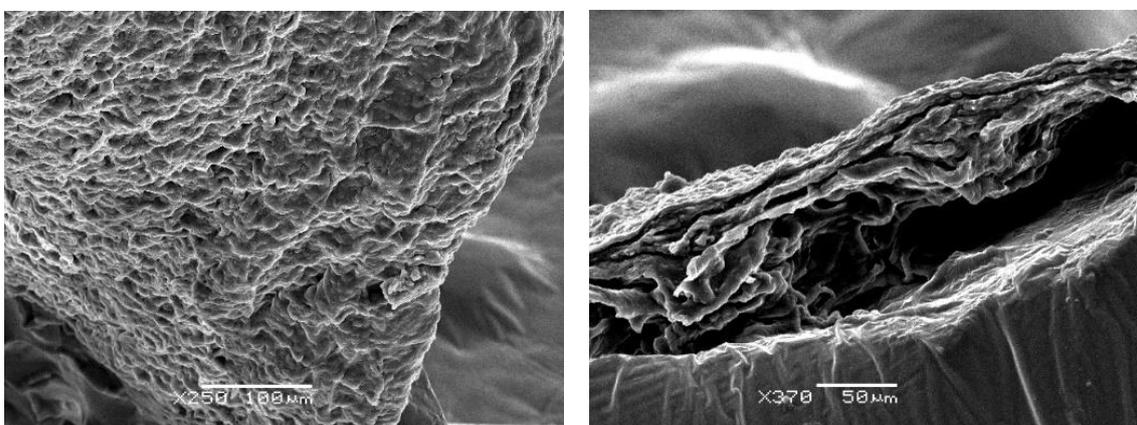
### *Reticulación e irradiación Gamma*

Las moléculas de colágeno en el tejido conectivo son gradualmente entrecruzadas por enlaces covalentes a lo largo de la vida del individuo, y en consecuencia, se transforman en moléculas de colágeno insolubles en ácido. Por ende, cuando buscamos utilizar el colágeno para sintetizar un andamio en ingeniería tisular, es necesario adicionar métodos artificiales de reticulación para estabilizar las moléculas de colágeno, ya sea ante la degradación enzimática por las metaloproteinasas o para obtener las propiedades mecánicas requeridas para su aplicación clínica (Hara, 2006).

En términos generales, los métodos de reticulación pueden clasificarse en tres categorías: químicos, físicos o biológicos/enzimáticos. Uno de los métodos químicos más utilizado es mediante el tratamiento con Glutaraldehído (GTA) (Hara, 2006). Este tratamiento genera enlaces covalentes entre dos grupos aminos, pudiendo generar entrecruzamientos entre 2 residuos de Lys, y como resultado, disminuye la carga positiva en la superficie de la proteína. Sin embargo, existen reportes que recalcan la importancia de remover los restos de GTA de la muestra (Cheung et al., 1990; Kutz, 2009), ya que si parte del GTA sin reaccionar permanece en la matriz de colágeno, así

sea una pequeña cantidad, puede provocar efectos adversos debido sus subproductos tóxicos (Hara, 2006; Jafari-sabet et al., 2016; Kutz, 2009). No obstante, otros estudios reportaron una mejoría en las propiedades mecánicas y en la tasa de degradación de los andamios que utilizan GTA como agente de reticulación (Ågren, 2016b; Annor et al., 2012; Hara, 2006). Por estos motivos, el protocolo anterior de síntesis de la matriz CG utilizaba como agente de reticulación el tratamiento con GTA. Por otro lado, durante la optimización de dicho protocolo, se logró constatar que el grado de compactación de las matrices reticuladas con GTA era excesivo, tal como puede observarse en la [Figura 1.3](#). Consecuentemente, en el presente trabajo se decidió modificar la técnica de reticulación, por una con menor riesgo de toxicidad, como lo es la radiación *gamma*.

La reticulación mediante la radiación *gamma*, es un método físico que se utiliza en ingeniería tisular para generar entrecruzamientos entre moléculas, pero sobre todo como agente esterilizante. A grandes rasgos, esta radiación ionizante actúa sobre los polímeros alterando su estructura interna. Dicha técnica puede generar tanto entrecruzamiento como escisión en las moléculas del polímero, dependiendo de las características de la muestra y las condiciones del propio procedimiento, tales como la presencia o ausencia de humedad (Faraj et al., 2011; You et al., 2013). De hecho, en muestras proteicas húmedas, la reacción que predomina es la de entrecruzamiento (Faraj et al., 2011; Hara, 2006). Posiblemente, las reacciones de entrecruzamiento en estos casos puedan estar inducidas por los radicales hidroxilo, entre otros, que se forman como resultado de la ruptura de las moléculas de agua de la muestra a causa de las reacciones químicas inducidas por la radiación (Faraj et al., 2011; Hara, 2006). Una de las ventajas de utilizar la radiación *gamma* como agente de entrecruzamiento en las matrices, es que dicho proceso ocurre sin que sea necesario utilizar agentes químicos perjudiciales que permanezcan en el material y puedan generar toxicidad al ser implantados. Asimismo, los rayos *gamma* poseen una buena penetración al interior de la muestra, pudiendo penetrar en los materiales a una escala de 10 cm, lo cual permite efectuar una reticulación de forma relativamente homogénea en la muestra (Hara, 2006). Pese a esto, la técnica también posee ciertas desventajas, entre las que se



**Fig. 1.3:** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de Barrido de matrices de colágeno reticuladas con glutaraldehído. Se observa la estructura compacta de la matriz desde la cara superficial (izquierda, barra: 100 µm) y lateral (derecha, barra: 50 µm).

encuentran el alto costo de equipamientos requeridos para realizarla, además de las obvias precauciones de bioseguridad necesarias para trabajar con este método.

A su vez, también existe la posibilidad de que ciertas estructuras proteicas tridimensionales puedan verse desnaturalizadas por la exposición a altas dosis de radiación (Hara, 2006). Además, debido a la introducción de nuevos enlaces dentro de la estructura del colágeno, es de esperar que la radiación afecte las propiedades fisicoquímicas, térmicas y de resistencia a la degradación de las matrices (Deeken et al., 2012). De hecho, en la literatura se observa cierta contradicción en cuanto al reporte del efecto de la radiación en estas propiedades. Esto se debe a que dependiendo de las condiciones en las que se produce la irradiación y la dosis seleccionada pueden advertirse distintos efectos. Algunos trabajos reportan que matrices irradiadas secas con dosis entre 25 y 50 kGy, aumentaban su susceptibilidad a la degradación enzimática, mientras que dosis de 10 o 75 kGy no generaban cambios en dicha propiedad (Cheung et al., 1990). En cuanto a las propiedades mecánicas, se observan también resultados inconclusos, ya que algunos estudios establecen que las propiedades mecánicas se ven negativamente afectadas con la irradiación (Berthod et al., 1994), mientras que otros no observan cambio alguno (Faraj et al., 2011).

De todas formas, es posible considerar que la irradiación *gamma* consiste en una herramienta prometedora para efectuar el entrecruzamiento del colágeno y de otros componentes de la matriz extracelular, siempre y cuando, las desventajas de la técnica puedan ser minimizadas con la selección adecuada de las condiciones de radiación (Hara, 2006). Por tal motivo, en el presente trabajo se procedió a incluir dicha técnica en el proceso de síntesis de los andamios de reposición dérmica. Para ello, se utilizó el equipo *Gamma cell 220* (Nordion, Canadá) en coordinación con el Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT), y se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en el “Código de Prácticas para la esterilización de Tejidos Humanos destinados a Injerto” del Organismo Internacional de Energía Atómica por el cual se rige el INDT. En este caso en particular, la irradiación fue realizada con las muestras congeladas, con el fin de que predomine el proceso de entrecruzamiento sobre el de fragmentación de moléculas. A su vez, se seleccionó un rango de dosis a evaluar (5, 15 y 25 kGy), de acuerdo a lo establecido en la literatura como suficientes para lograr la esterilización de las mismas (Faraj et al., 2011; Wiegand et al., 2009). Además, para determinar cuál de las dosis de radiación generaba el andamio óptimo, se evaluaron los efectos de las distintas dosis sobre las propiedades de la matriz.

#### **Formación de la epidermis artificial**

La porción “epidérmica” del andamio de reposición tisular consiste en una delgada capa de silicona de grado médico denominada Silastic® (Silastic MDX4-4210 Medical Grade Elastomer Base, Dow Corning®). Dicho producto es un elastómero de silicona de dos componentes, los cuales al combinarse se transforman en una goma de silicona transparente (Wessels, 2007). El componente elastómero consiste en un polímero lineal de dimetilsiloxano (PDMS) o dimeticona. Pertenece al grupo de los compuestos de organosilicio, sustancias comúnmente conocidas como siliconas. El PDMS es el polímero orgánico basado en silicio más extensamente usado debido a sus propiedades reológicas inusuales (Briquet et al, 1996). Tiene un aspecto transparente y, generalmente inerte, inocuo y no inflamable. El segundo componente es su respectivo *curing agent*, es decir

un reticulante de siloxanos (Dow Corning®). Al combinarlos, se crea un elastómero sin formación de productos secundarios (Briquet et al, 1996).

La pureza, el perfil toxicológico y la biocompatibilidad hacen que este producto sea adecuado para uso biomédico (Wessels, 2007). De hecho, este producto cuenta con certificación ISO 10993-1, que lo habilita para contacto directo con la piel, ya sea de forma temporal o prolongada. A su vez, se encuentra habilitado para contacto temporal con fluidos corporales, e incluso para contacto extendido o permanente con el organismo (prótesis, lentes de contacto, recubrimientos aislantes, etc) (Briquet et al, 1996; Wessels, 2007). Dentro de las opciones disponibles, los PDMS de la marca Dow Corning® son los más utilizados en el mercado. Por ende, en este trabajo se hizo uso de dicho producto para que oficie de “epidermis” artificial. La finalidad de esta capa es prevenir la pérdida de humedad del lecho de la herida, así como oficiar de barrera física contra la infección bacteriana (Burke et al., 1981).

### **Empaquetamiento y esterilización final**

La última etapa del desarrollo de la matriz consiste en el empaquetamiento y una segunda irradiación para garantizar la esterilización final del andamio.

En primer lugar, cabe destacar que el propósito de todo proceso de esterilización es inactivar los contaminantes microbianos que puedan estar presentes en el producto de interés (Sloff et al., 2018). Usualmente, esto se consigue mediante la desnaturalización de las proteínas de los microorganismos, desmantelando sus sistemas enzimáticos o destruyendo sus ácidos nucleicos. Algunos de los métodos más comúnmente utilizados para la esterilización involucran: la exposición a altas temperaturas (calor seco, autoclave), irradiación (esterilización física: radiación *gamma* o beta) o esterilización con químicos (etanol, óxido de etileno) (Sloff et al., 2018). Todos estos procedimientos, son conocidos por causar alteraciones en las biomoléculas y sus respectivas actividades biológicas. Por tanto, al seleccionar el método de esterilización de un constructo dérmico, se deberán evaluar los efectos sobre sus propiedades y su desempeño como tal (Wiegand et al., 2009). Para productos con sensibilidad a las altas temperaturas como lo es el colágeno, las radiaciones ionizantes constituyen un buen método alternativo para la esterilización. La misma puede efectuarse mediante rayos *gamma* a partir de Cobalto 60, o a partir de partículas beta resultantes de un generador de haz de electrones (Wiegand et al., 2009).

Particularmente en este estudio, debido a que luego de la liofilización de las MC estas son manipuladas para adherir la capa de silicona, se lleva a cabo una segunda irradiación con 5 kGy para garantizar la esterilización del andamio una vez que está empaquetado.

Esta segunda irradiación se llevó a cabo con una dosis de 5 kGy de radiación *gamma* con Cobalto 60 del equipo *Gamma Cell 220* (Nordion, Canadá). Tal como se menciona anteriormente, esta dosis es reportada como suficiente para lograr la esterilidad en andamios de reposición dérmica (Faraj et al., 2011; Wiegand et al., 2009).

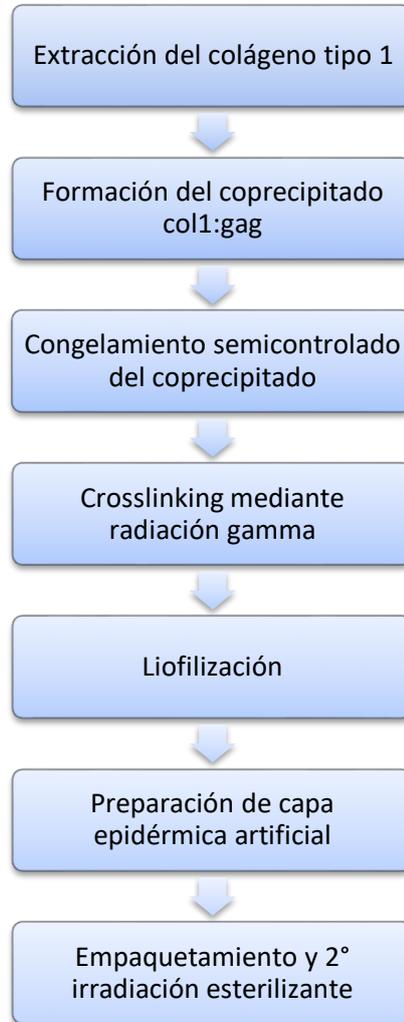
Al optar por esta técnica como método de esterilización final, existen algunos factores a tener en cuenta. Además de los posibles efectos que puede tener la radiación sobre las biomoléculas del andamio, debe también considerarse el nivel de tolerancia a la radiación que posee la porción epidérmica del mismo. Afortunadamente, se observa que

la mayoría de los elastómeros, entre los que se incluye el Silastic MDX4-4210, tienen una tolerancia hasta 200 kGy (Sterigenics, n.d.; Wessels, 2007), por lo que no significaría un problema para las dosis seleccionadas en este estudio.

Por otra parte, el material utilizado para el empaquetamiento del andamio puede también verse alterado por la radiación. Esto se debe a que los polímeros que se utilizan en el envoltorio interactúan con la radiación de una forma similar a como lo hacen los polímeros biológicos. En el presente estudio, las bicapas biopoliméricas se encuentran dentro de una placa de Petri de Poliestireno, el cual posee un nivel de tolerancia a la radiación de 1000 kGy. A su vez, estas placas son luego colocadas en una doble bolsa de celulosa sellada, cuyo nivel de tolerancia es de 50 kGy. Por tanto, sería factible pensar que el empaque utilizado para los andamios no se vería afectado por la dosis de radiación seleccionada en este estudio.

## SÍNTESIS DE LA MATRIZ COLAGÉNICA

Esta sección describe el protocolo final utilizado para la síntesis de los andamios de CG, el cual consiste en una serie de pasos secuenciales que se observan en la [Figura 1.4](#)



**Fig. 1.4: Esquema del protocolo de síntesis de las matrices de colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato.** Descripción de los pasos secuenciales que resultan en la creación de la bicapa polimérica.

### Metodología

#### *Extracción del colágeno tipo 1*

En primer lugar, se procedió a desgrasar 2 kg de tendón bovino previamente triturado y congelado mediante 3 lavados. El primer lavado se realizó con 3 L de solución salina (NaCl) de concentración 5 g/L durante 3 minutos, y luego se enjuagó con agua destilada.

A continuación, se adiciona una solución con acetona al 5% durante 3 minutos, y finalmente se realizaron 3 lavados con 3 L de agua destilada de 3 minutos cada uno para retirar el remanente de acetona y grasa.

Se procedió a preparar 30 L de una solución de HAc 0.1 M y se colocaron en una olla de acero inoxidable. A continuación, se adicionó el tendón desgrasado triturado y se homogeneizó la suspensión. Dicha suspensión se mantuvo durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego, se procedió a separar el tendón del resto de la solución primeramente mediante un tamiz ([Figura 1.5](#)), y en segundo lugar la solución resultante se filtró mediante un tull para eliminar posibles restos de tendón y otras impurezas.

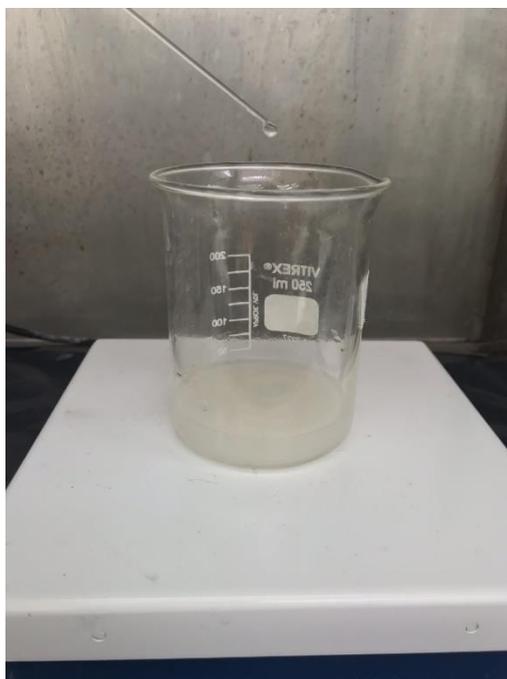


**Fig. 1.5: Extracción del colágeno.** En la imagen se observa la etapa de separación del tendón del resto de la solución acética mediante un tamiz.

El colágeno soluble se precipitó adicionando NaCl al 5% a la solución obtenida, y se llevó a cámara de frío a 4 ° C durante por lo menos 24 horas para permitir que el precipitado sedimente. Luego se extrajo el solvente para concentrar la suspensión del precipitado mediante centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos. A posteriori, el precipitado obtenido se dializó contra una solución HAc 0.1M durante 96 horas cambiando la dicha solución 2 veces por día. Consecutivamente, se determinó el contenido de colágeno soluble del precipitado mediante diferencia de masa con evaporación de solvente, verificando la concentración de proteína total mediante determinación de absorbancia a 280 nm.

#### **Formación del co-precipitado CG**

Una vez determinada la concentración de colágeno de la muestra, la misma es diluida con solución HAc 0,1M, para lograr una concentración final de 0.5%. La reticulación primaria se efectuó mediante el agregado en agitación de GAG a una relación 92:8 m/m al colágeno soluble. Para ello se diluyó previamente el GAG en solución HAc 0.1M, y luego fue adicionada gota a gota a la suspensión de colágeno ([Figura 1.6](#)). El pH fue controlado y llevado a 3.2 antes y después del agregado de GAG. A continuación, el co-precipitado CG se deja en agitación magnética (400 rpm) durante 90 minutos.



**Fig. 1.6: Preparación del coprecipitado de colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato.** Adición gota a gota de la solución Acética y GAG a la suspensión de colágeno.

#### **Congelamiento semicontrolado del co-precipitado**

Se trasvasa la solución resultante a placas de Petri de 12cm de diámetro a razón de 25ml por placa. Las placas se identifican debidamente y se congelan hasta los -80° C en un sistema de elaboración propia que permite un congelamiento más lento ([Figura 1.1](#)). El mismo consistió en un baño de alcohol isopropílico 100% dentro de una caja de poliuretano. Para ello, se adicionan 2 L de alcohol isopropílico 100% a la caja, luego se

coloca una bandeja de metal sobre la que irán colocadas las placas de Petri con el co-precipitado. Finalmente, la caja se cierra lo más herméticamente posible, se envuelve en papel film y se coloca en el freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

#### ***Entrecruzamiento mediante radiación gamma***

Una vez congelada las muestras, estas fueron irradiadas como método de reticulación físico, mediante el equipo *Gamma cell 220* (Nordion, Canadá) en coordinación con el Instituto Nacional de Donación y Trasplante (INDT) ([Figura 1.7](#)). Para esto, los co-precipitados congelados fueron irradiados en atmósfera ambiente y rodeadas de hielo seco para evitar su descongelamiento. Con el fin de determinar cuál dosis de radiación *gamma* generaba las matrices con mejores propiedades, se seleccionó un rango de dosis a evaluar (5, 15 y 25 kGy).



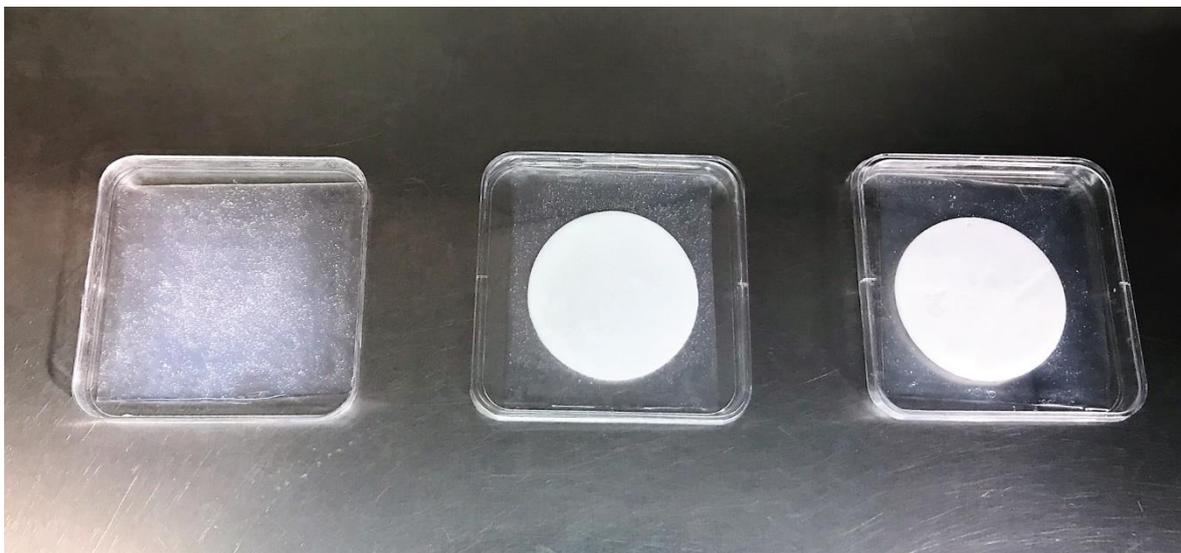
**Fig. 1.7: Equipo Gammacell 220 Excel con el que se llevaba a cabo la irradiación gamma. Para generar entrecruzamiento entre las moléculas, las muestras se irradiaban congeladas.**

### *Liofilización*

La sublimación del hielo de los co-precipitados, se llevó a cabo mediante la liofilización. Las placas irradiadas fueron liofilizadas a  $-60^{\circ}\text{C}$  y 0.03 mbar durante 96 horas, para asegurar la sublimación de los cristales de hielo, obteniéndose así matrices porosas de Col1 y GAG. Culminada la liofilización, las matrices fueron guardadas en desecador para evitar la rehidratación.

### *Preparación de capa epidérmica artificial*

La porción "epidérmica" del andamio de reposición tisular era conformada por una delgada capa de silicona de grado médico (Silastic MDX4-4210 Medical Grade Elastomer Base, Dow Corning©). Para sintetizar dicha capa, se procedió a mezclar la silicona con su correspondiente agente reticulante en proporción m/m de 10:1 (silicona:curing agent) y luego se homogeneizó hasta hacer desaparecer la producción gaseosa. Después se esparció una fina película de dicha mezcla sobre un papel de acetato, para facilitar la remoción de la capa una vez que haya polimerizado (Wessels, 2007). A continuación, se colocaron cuidadosamente las matrices liofilizadas sobre la mezcla húmeda de Silastic®. El proceso de polimerización se realizó a temperatura ambiente durante 48 horas, colocando las matrices y el papel de acetato en placas de Petri cuadradas (120 x 120 mm) ([Figura 1.8](#)).



**Fig. 1.8: Polimerización de la capa epidérmica artificial.** En la imagen de la izquierda se observa claramente la porción epidérmica artificial húmeda y esparcida por el papel de acetato. En las otras dos imágenes se observa además la porción artificial dérmica colocada sobre la preparación de la silicona de grado médico.

### ***Empaquetamiento y Esterilización final***

Finalizado el período de cura de Silastic®, la ahora bicapa de colágeno fue separada del papel de acetato y retirado el excedente de silicona polimerizada, es decir, lo que quedara por fuera de los bordes de la porción colagénica. La bicapa polimérica fue colocada en una placa de Petri, para luego ser situada dentro de una doble bolsa de celulosa sellada con calor. La esterilización final se efectuó mediante una segunda dosis de radiación con *Gamma cell 220* (Nordion, Canadá) a 5 kGy.

Por último, las matrices fueron almacenadas en desecador a temperatura ambiente hasta su utilización.

### ***Resultados y discusión***

En el presente trabajo se logró sintetizar la matriz Co1:GAG como bicapa polimérica ([Figura 1.9](#)). Las modificaciones realizadas al protocolo anterior, dieron lugar a una matriz que a simple viste parecería tener un aspecto más poroso y homogéneo



**Fig. 1.9: Bicapa polimérica de colágeno tipo I y condroitín-6-sulfato al final del proceso de síntesis.** Las imágenes muestran la matriz desarrollada en este trabajo previo al momento de empaquetado (derecha), y luego de ser empaquetados y esterilizados con radiación gamma.

Entre los cambios más significativos que se realizaron, se destacan el congelamiento semicontrolado y la utilización de la radiación *gamma* como método de entrecruzamiento. De hecho, este último es quizás la característica más distintiva del producto en comparación a los productos que ya existen en el mercado. Si bien las dosis de radiación que se efectuaron como método de entrecruzamiento también actúan como método esterilizante, debido a que luego de la liofilización de las MC estas son manipuladas para adicionar la capa de silicona, se lleva a cabo una segunda irradiación con 5 kGy para garantizar la esterilización del andamio una vez que está empaquetado.

Para evaluar cómo estos cambios influenciaron la estructura y las propiedades de la matriz, se sintetizaron matrices con algunas diferencias entre sí para luego compararlas ([Tabla 1.1](#)). Las diferentes variaciones metodológicas permitieron obtener 10 tipos de matrices con diferentes características. Por tanto, en las secciones posteriores se analizará cómo éstas influyen las distintas propiedades de la matriz y se seleccionarán la más adecuadas para cumplir con los requerimientos de andamio de reparación tisular.

**Tabla 1.1: Distintos tipos de matrices sintetizadas en el estudio.** Descripción de las características en composición, dosis de radiación gamma y presencia o ausencia de descenso semicontrolado de temperatura, de los andamios elaborados en el trabajo.

Nombre	Composición	Dosis de radiación <i>gamma</i> (kGy)	Descenso Semicontrolado de Temperatura (DCT)
NoGAG	Col1	0	NO
0 kGy –NoGAG	Col1	0	SI
0kGy_sDCT	Col1:GAG	0	NO
5kGy_sDCT	Col1:GAG	5	NO
15kGy_sDCT	Col1:GAG	15	NO
25kGy_sDCT	Col1:GAG	25	NO
0 kGy	Col1:GAG	0	SI
5 kGy	Col1:GAG	5	SI
15 kGy	Col1:GAG	15	SI
25 kGy	Col1:GAG	25	SI

## Conclusiones

Las modificaciones efectuadas en el protocolo de síntesis original permitieron producir diferentes tipos de matrices de Col1 y GAG. Dichas matrices observaron un aspecto más poroso y homogéneo que las producidas mediante el protocolo anterior. De todas formas, las distintas matrices resultantes de diferentes variaciones metodológicas serán evaluadas comparativamente para seleccionar la más adecuada de acuerdo a su potencial uso como andamio para la reparación tisular.

La utilización de la radiación *gamma* como método de entrecruzamiento constituye el carácter más novedoso del producto, en comparación con los andamios de similar composición y elaboración existentes en el mercado.

## CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA MATRIZ COLAGÉNICA

### *Generalidades*

Los andamios tridimensionales sintetizados mediante ingeniería tisular son idealmente dispositivos análogos a la matriz extracelular presente en diversos tejidos corporales. De hecho, estos constructos actúan tanto como soporte físico, así como reguladores de la actividad celular (Harley & Gibson, 2008). Por lo tanto, los biomateriales utilizados para interacción directa con tejido biológico deben cumplir con ciertas propiedades biológicas, físicas y químicas (Colorado et al., 2013). En efecto, está ampliamente demostrado que la microestructura de estos andamios (porosidad, forma y tamaño medio de poro e interconectividad de capas) junto con sus propiedades mecánicas han demostrado tener una influencia significativa en los comportamientos de las células, tales como la supervivencia, adhesión, proliferación y diferenciación (Harley et al., 2008; O'Brien et al., 2005b; O'Brien et al., 2004; Yannas et al., 2010). Consecuentemente, resulta de suma importancia y prioridad lograr especificar los parámetros microestructurales, mecánicos y químicos para diseñar efectivamente biomateriales que imiten la matriz extracelular, y puedan en consecuencia tener aplicaciones clínicas como sustitutos tisulares (Roeder et al., 2002).

Con esto en mente, el objetivo del presente capítulo fue caracterizar física y químicamente las distintas matrices colagénicas resultantes de los procesos de síntesis realizados y descritos en el capítulo 1 ([Tabla 1.1](#)). La finalidad de dicha caracterización será describir estas propiedades para determinar cuál de los procesos de síntesis propuestos origina matrices más adecuadas para su posterior utilización como producto de reposición dérmica.

Particularmente, se efectuarán estudios de la morfología y la microestructura de las matrices, junto con sus propiedades biomecánicas. Además, se analizarán ciertos parámetros químicos, tales como la resistencia a la degradación enzimática, su temperatura de desnaturalización. A su vez, se evaluarán las interacciones moleculares resultantes de los distintos protocolos de síntesis, y la posible influencia de los métodos de entrecruzamiento seleccionados sobre estas propiedades.

Una vez seleccionado el proceso de síntesis que origine el producto más adecuado posible, se llevará a cabo la evaluación biológica del producto (capítulo 3) con el fin de corroborar el correcto desempeño como potencial constructo para ingeniería de tejidos, teniendo en cuenta la funcionalidad preestablecida que se le ha adjudicado.

### *Metodología*

#### Caracterización Física

##### *Análisis morfológico y tamaño de poro*

La observación arquitectural de la matriz junto con la determinación del tamaño de poro de las mismas fue efectuada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Para cada tipo de matriz analizada se cortaron diez muestras de 0,8cm de diámetro con un

*punch* de biopsia. Cinco de ellos, fueron utilizados para la observación de la superficie de la matriz, mientras que los otros cinco fueron cortados al medio con un bisturí para observar la sección transversal de la misma. Todas las muestras fueron montadas sobre los taquillos utilizando cinta de carbón y recubiertas por una capa ultrafina de oro durante dos minutos a 30 mA en Denton Vacuum Desk II Sputter Coater. Luego, las muestras fueron analizadas con el Microscopio JEOL JSM- 5900LV a 20 Kv, estudiando 5 campos en cada muestra. Las micrografías obtenidas fueron analizadas cualitativamente observando la morfología de la matriz: porosidad, interconectividad entre capas, presencia de distintas estructuras colagénicas (ramas, fibras o láminas). El análisis cuantitativo de las imágenes se llevó a cabo mediante la evaluación del tamaño de poro a través del programa ImagePro© Software Versión 10.0 para Windows (Media Cybernetics, Maryland, USA). En cada micrografía se evaluaron los diámetros Máximos de Feret de los poros. El diámetro de Feret representa la distancia entre dos líneas paralelas que son tangenciales al contorno del poro (Lourenço et al., 2015), por tanto el diámetro máximo, va a estar dado por la distancia entre dos líneas paralelas que son tangenciales al eje mayor del poro. Los resultados obtenidos fueron resumidos en histogramas que reportan el porcentaje de poros con diámetros de Feret en ciertos intervalos.

Las matrices que se analizaron fueron las producidas con y sin descenso semicontrolado de temperatura, y con o sin exposición a la radiación *gamma* (Tabla 2.1). Para facilitar la distinción entre los distintos tipos de matrices, en este análisis en particular se denominarán con la sigla "DCT" a aquellas matrices que hayan sido congeladas mediante un descenso semicontrolado de temperatura, y con la terminación "sDCT" a las que no fueron congeladas de esta forma, sino que se colocaron directamente en el freezer de -80°C.

**Tabla 2.1: Descripción y denominación de las matrices colagénicas evaluadas.** Las matrices son denominadas primero por la dosis de radiación que reciben (0 kGy, 5 kGy, 15 kGy o 25 kGy) y luego se indica si durante su síntesis fueron congeladas mediante un descenso controlado de temperatura, indicándose con la sigla DCT para las que sí poseen esta forma de congelamiento y sDCT para las que no fueron congeladas de forma controlada.

Dosis de radiación <i>gamma</i>	Con Descenso de semicontrolado de Temperatura (DCT)	Sin Descenso de semicontrolado de Temperatura (sDCT)
0 kGy	0kGy_DCT	0kGy_sDCT
5 kGy	5kGy_DCT	5kGy_sDCT
15 kGy	15kGy_DCT	15kGy_sDCT
25 kGy	25kGy_DCT	25kGy_sDCT

### **Análisis biomecánico**

En este ensayo se evaluaron matrices colagénicas de distinta composición (con y sin GAG) y sometidas a distintas dosis de irradiación (0, 5, 15, y 25 kGy) para determinar la influencia de los agentes reticulantes en las propiedades mecánicas de la matriz colagénica.

Con este fin se llevaron a cabo ensayos de tensión uniaxial mediante la utilización de un texturómetro (TA.XT Plus, Stable Micro System Ltd., Surrey, UK) perteneciente a la cátedra de Alimentos de la Facultad de Ingeniería (UDELAR, Montevideo, Uruguay). En dichos ensayos se evaluaron 2 matrices de cada condición a estudiar y hasta 5 muestras de cada matriz. Cada muestra consistía en una tira en forma rectangular (6 cm x 1 cm) de las distintas matrices a evaluar. Todas las muestras fueron sometidas a tracción hasta su ruptura con una velocidad constante de 30 mm/min y a 21°C. Para ello, cada muestra fue posicionada verticalmente sujetadas entre dos *grips* dejando una distancia inicial entre ellos de 25mm, quedando aproximadamente 17,5 mm de la muestra dentro de cada *grip*.

Para cada muestra, se obtuvieron gráficos de la fuerza de tensión a la que fue sometida en función del estiramiento de la misma, mediante la utilización del Software Exponent® versión 6.1.12.0 de Stable Micro Systems®. En base a estos datos se llevó a cabo el cálculo de dos parámetros: Esfuerzo Tensil Máximo (ETM) y el Porcentaje de Elongación Máximo (%EM).

El ETM fue calculado mediante la división de la fuerza de tensión máxima que soporta cada muestra (N) entre el área de la sección transversal de la misma. El área de la sección transversal resulta de multiplicar el ancho de la tira (10 mm) por el grosor de la misma. El grosor promedio de cada tira de matriz fue medido previamente con un calibre digital. Para ello se colocó la muestra horizontalmente entre 2 reglas de plástico, se midió el grosor total y se restó el grosor de las 2 reglas juntas. Se realizaron 5 medidas por cada muestra y se calculó el promedio.

El %EM es la medida de la cantidad de matriz que fue estirada durante el ensayo, por lo tanto, se calculó dividiendo la deformación de la muestra que ocurre cuando está sometida a la fuerza de tensión máxima, entre la longitud inicial de la muestra, es decir es decir, la separación inicial que tenían los *grips* que agarraban la matriz (25 mm). La separación final es aquella que existe en el momento que esta la tensión máxima, o sea un instante antes de romperse.

Para cada uno de los tipos de matrices evaluados se reportaron los valores medios de ETM y %EM con su correspondiente desviación estándar. A su vez, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de ambos parámetros para cada tipo de matriz evaluada utilizando el Software GraphPad Prism® versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.), seguido de test pos-hoc Student Neuman Keuls para la comparación múltiple. La significancia estadística se estableció a  $p < 0,05$ .

## Caracterización Química

### **Degradación Enzimática**

La MMP-1, también llamada colagenasa I, es la más ubicua de la región intersticial y es capaz de degradar colágeno tipo I, entre otros (Arakaki et al., 2009). Por tal motivo fue seleccionada para el estudio con el fin de simular, en parte, las condiciones enzimáticas a las cuales se sometería el constructo colagénico al ser implantado en el lecho de la herida. Los ensayos in vitro de degradación enzimática permiten evaluar el grado de entrecruzamiento de las fibras así como el mecanismo de degradación de andamios colagénicos, bajo condiciones definidas de estudio (temperatura, pH, tiempo) (Helling et al., 2017).

Para este ensayo en particular, se efectuó la degradación enzimática mediante la exposición de la matriz colagénica a la Colagenasa I (Sigma-Aldrich). La concentración de dicha enzima fue determinada experimentalmente mediante la observación del grado de degradación de las muestras durante 24 horas y se reportó en unidades enzimáticas (U)/ml. De esta forma, se seleccionó la concentración de la enzima que generara una degradación significativa pero no completa dentro de dicho período de tiempo, tal como se reporta en otros estudios (Pek et al., 2004).

El ensayo se llevó a cabo mediante la determinación de la pérdida de masa de las matrices en función de la degradación enzimática tal como lo realizan otros estudios (Capella-Monsonís et al., 2018; Helling et al., 2017; Ma et al., 2004; H. M. Wang et al., 2013). Para ello, se analizaron muestras de ~5 mg de matriz colagénicas de distinta composición (con y sin GAG) y sometidas a distintas dosis de irradiación (0, 5, 15, y 25 kGy). El peso inicial de cada muestra junto con el envase que la contenía era nuevamente registrado. Esto fue realizado en triplicado, manteniendo un peso consistente entre réplicas y muestras. A continuación, las muestras se sometieron a la degradación en Tampón fosfato salino (PBS) con la concentración sugerida de la Colagenasa I a pH 7.4. Las muestras control fueron expuestas solamente a PBS a pH 7.4. Luego, todas las muestras fueron incubadas en *shaker* a 150 rpm y a temperatura fisiológica (37° C) durante los siguientes intervalos de tiempo: 1, 3, 6 y 24 horas. La degradación fue discontinuada en los intervalos de tiempo mencionados al colocar la muestras y sus respectivos controles en baño de hielo (Ma et al., 2003), e inmediatamente se agregaban 0.2 ml de PBS-EDTA 0.25 M en cada muestra. A posteriori, se procedió a centrifugar 2 veces las muestras a 3500 g por 10 minutos a 4° C, intercalados con un lavado de 1 ml de agua destilada. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado congelado a -20° C. Una vez obtenidas todas las muestras, con una aguja limpia se realizó un orificio en la tapa del eppendorf que contenía cada muestra, y luego estas fueron liofilizadas a -92° C y 0.01 mBar por al menos 12 horas. Finalizada la liofilización, las muestras y sus controles se masaron nuevamente para determinar la masa post-degradación. Se calculó el porcentaje de masa remanente con respecto al peso inicial ( $W_0$ ), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$W = \left[ \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \right] 100$$

siendo  $W_0$  la masa inicial de la muestra junto a su correspondiente envase; y  $W_t$  representa la masa luego de la degradación enzimática.

### ***Calorimetría diferencial de barrido***

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), constituye una herramienta termodinámica que permite la evaluación directa de la absorción energética de calor que ocurre en una muestra al ser sometida a variaciones de temperatura reguladas (Gill et al., 2010).

En este ensayo se examinó la incidencia de los distintos tipos de entrecruzamiento utilizados en este estudio sobre la estabilidad térmica de los andamios, haciendo uso de DSC. Esta técnica constituye un método sensible para evaluar cambios moleculares, tales como entrecruzamiento, escisión peptídica, conformación del colágeno, contenido de la triplehélice y fibrilogénesis (Miles et al., 2005; Sun & Leung, 2008). En particular, la transición estructural endotérmica del colágeno, de la forma helicoidal a una superenrollada puede ser detectada mediante un típico pico en los termogramas resultantes del DSC (Capella-Monsonís et al., 2018). Por tanto, la desnaturalización del colágeno que compone los andamios en cuestión fue analizada mediante DSC (Shimadzu DSC60, Mettler Toledo©), de acuerdo a lo establecido en el trabajo de Capella-Monsonís et al. (2018). Dicho estudio resalta la importancia de trabajar con muestras completamente hidratadas, ya que de esta forma se pueden analizar valores fisiológicamente más relevantes.

Las matrices analizadas en este estudio fueron las siguientes: 0 kGy-NoGAG, 0 kGy, 5 kGy, 15 kGy y 25 kGy. En primer lugar, se masaron en triplicado ~5 mg de cada tipo de matriz, manteniendo un peso consistente entre réplicas y muestras. Luego dichas muestras fueron hidratadas mediante la incubación en PBS durante 24 horas a 4° C. A continuación, el PBS era descartado y se removía el agua no ligada mediante papel absorbente. Cada muestra fue colocada en un crisol de aluminio (s201-53090, Shimadzu), de manera que quedase correctamente esparcida sobre el fondo de la cápsula, y su peso era registrado nuevamente. A continuación, a cada cápsula se le colocó la tapa correspondiente sellándose herméticamente mediante una prensa. Como referencia se utilizó un crisol cerrado y vacío, el cuál era colocado en la posición correspondiente en el calorímetro. Las muestras eran escaneadas a una tasa de calentamiento de 10° C/min desde 21 a 150° C, en atmósfera estática. Una vez alcanzada la temperatura final, se retiraban las cápsulas y se procedía al análisis de datos. Los termogramas resultantes fueron analizados mediante el software TA-60WS (versión 2.20, Shimadzu Corporation©, Oceanía). Dicho análisis consistió en el seguimiento del pico endotérmico, para determinar la temperatura a la cual ocurre la máxima absorción de calor durante la desnaturalización ( $T_d$ ). Los termogramas se realizaron tomando los valores promedios para cada tipo de matriz.

### ***Análisis con Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)***

El estudio mediante FT-IR se llevó a cabo con el fin de describir los grupos funcionales e interacciones moleculares presentes tanto en los componentes del constructo, así como en los que resultaran de los procesos de entrecruzamiento. Para ello se utilizó el

espectrofotómetro Shimadzu Prestige 21 (Shimadzu, Japón) a temperatura ambiente, luego de una previa dilución de las muestras con KBr y la peletización correspondiente. Para este ensayo se utilizó la técnica de reflectancia difusa en la región del medio infrarrojo ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) promediando 20 muestreos, con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Las principales bandas de vibración fueron identificadas en relación con los grupos químicos presentes. Previo a la lectura de los espectros, se analizaron cubreobjetos vacíos para determinar el ruido de fondo. Las muestras analizadas fueron: GAG, colágeno tipo I liofilizado (Col1), mezcla física de GAG y Col1 y la matriz colagénica con GAG e irradiada con 15 kGy.

#### **Análisis con Espectroscopía Raman Confocal**

Este análisis se llevó a cabo en matrices colagénicas sin irradiar (0 kGy) y con dosis de 15 kGy de radiación *gamma*, para determinar posibles cambios microestructurales asociados a cambios moleculares resultantes de dicha irradiación. Los mismos se efectuaron mediante el Microscopio Raman Confocal Alpha 300-RA (WITec®, Alemania). En dicho dispositivo, se acopla la espectroscopía Raman al microscopio confocal, permitiendo en cada *pixel* de una imagen obtener un espectro Raman, constituyendo así un sistema de imagenología química de buena resolución y definición. A su vez, este dispositivo permite la adquisición de espectros Raman en áreas seleccionadas (microRaman). Particularmente, en este experimento se utilizó un láser con una longitud de onda de excitación de 532 nm con una potencia eléctrica  $<10\text{ mW}$  para evitar la descomposición de la muestra. Cada espectro Raman fue obtenido promediando un set de 400 espectros en un tiempo de integración de 0.2 segundos. A su vez, se tomaron imágenes con el microscopio confocal de las muestras en general, y en áreas seleccionadas de estas, con sus correspondientes espectros Raman.

#### **Análisis de datos**

Los gráficos y análisis estadísticos de los distintos ensayos se efectuaron en el programa GraphPad Prism® versión 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), excepto los termogramas que fueron efectuados mediante el Software Origin 9.1.0 (Origin Lab Corporation). En todos los análisis se utilizó un nivel de significancia estadística de  $p < 0.05$ .

Todas las propiedades de las matrices se determinaron al menos por triplicado para cada tipo de matriz utilizada. Los parámetros ténsiles fueron comparados mediante análisis de varianza con el método Newman Keul para comparaciones múltiples. El tamaño de poro fue analizado mediante histogramas de distribución de frecuencia de tamaños, y comparados entre los distintos tipos de andamios mediante el test Kruskal-Wallis seguido del test post hoc de comparación múltiple de Dunn. En el estudio de degradación enzimática, se muestran los valores medios del porcentaje de masa remanente junto con sus correspondientes desviaciones estándar, y la comparativa entre las distintas matrices se realizó mediante análisis de varianza con el método Newman Keul para comparaciones múltiples. Para el estudio de la estabilidad térmica mediante DSC, los valores promedio de las Td fueron comparados mediante análisis de varianza, con el método Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

## Resultados y Discusión

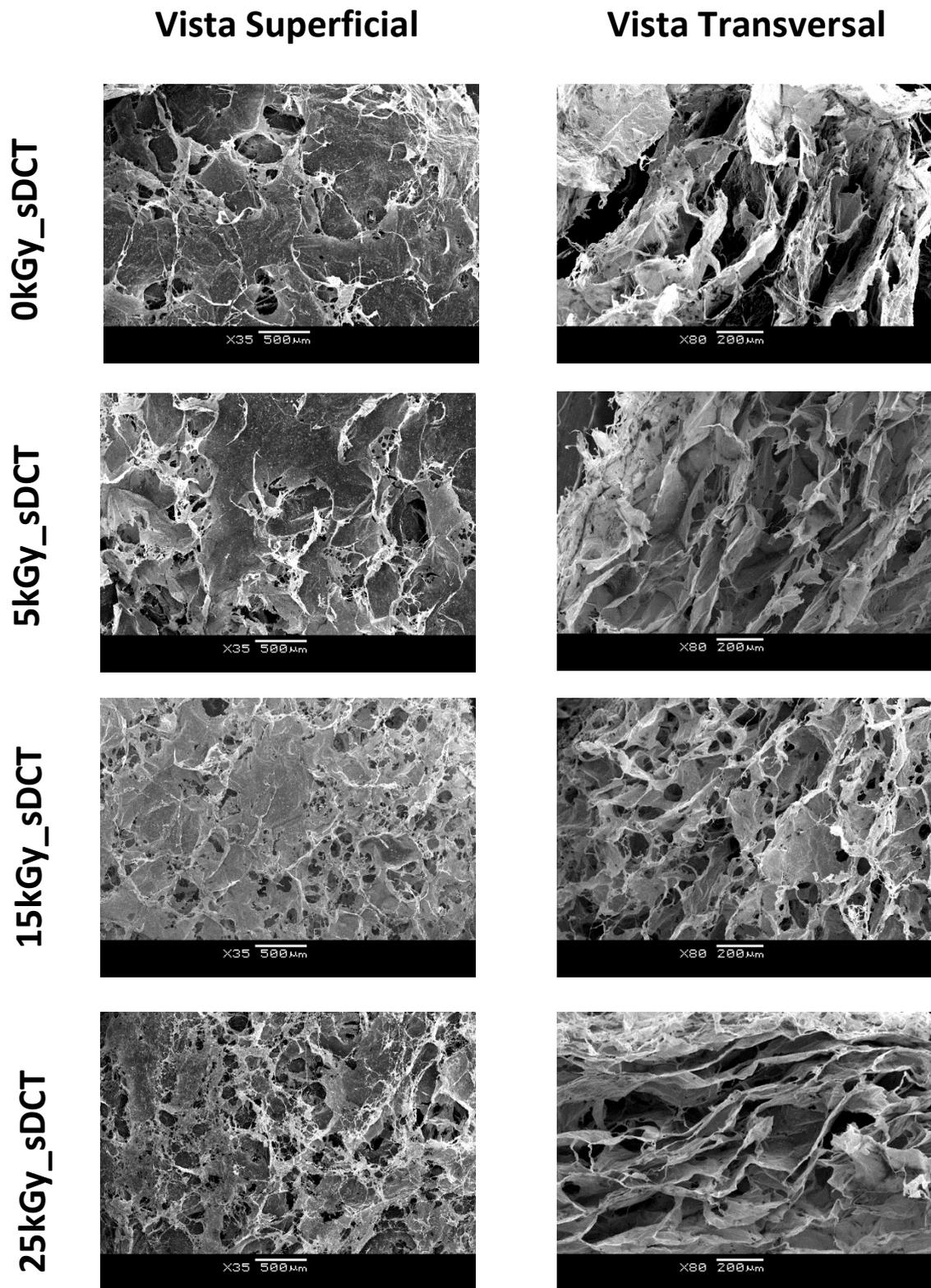
### Caracterización Física

#### *Análisis morfológico y tamaño de poro*

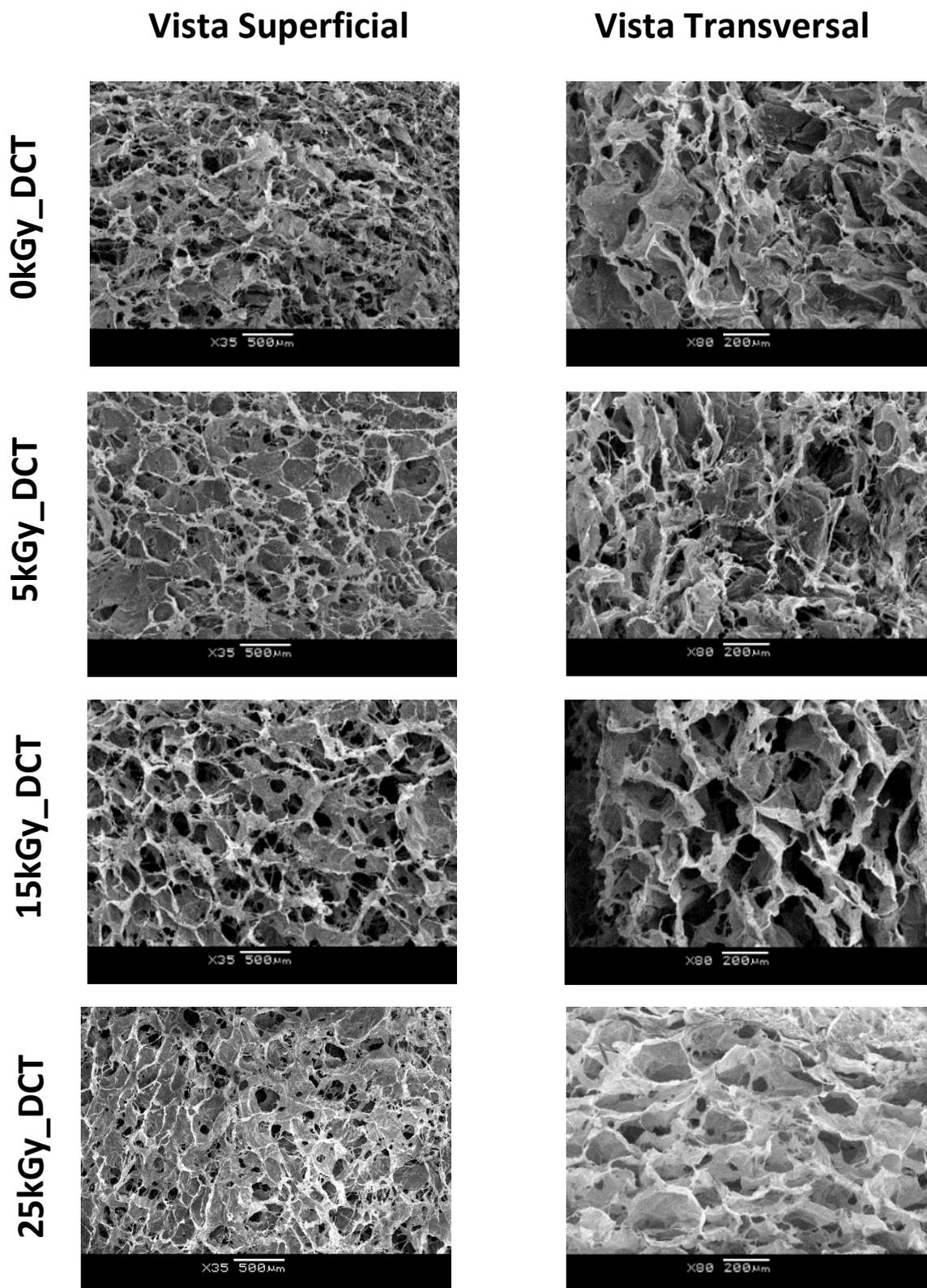
Las micrografías tomadas con SEM de las distintas matrices evaluadas permitieron analizar cualitativamente su estructura, detectando la presencia de poros y formaciones de colágeno, así como también la interconexión entre capas. Primeramente, es importante destacar que no se advirtieron cambios aparentes en el grosor de la matriz o en su estructura durante la manipulación. En segundo lugar, las micrografías obtenidas revelan que las matrices sintetizadas resultaron porosas en su amplia mayoría. De esta forma, fue posible detectar ciertas diferencias desde el punto de vista cualitativo en las distintas estructuras colagénicas y la interconectividad de capas.

En términos generales, las matrices preparadas sin el DCT ([Figura 2.1](#)) observaron un aspecto más compacto junto con una menor cantidad de poros e interconectividad de capas, que las matrices congeladas con DCT. A su vez, en cuanto a las estructuras de colágeno presentes, se advirtió una predominancia de láminas de colágeno sobre los agregados de fibras o hebras. De igual forma, se observa en las muestras sin DCT la presencia de una capa superficial poco porosa, sobre la que se detectan algunas agrupaciones de fibras conformando una símil red.

En base a las micrografías de las matrices que fueron congeladas mediante DCT ([Figura 2.2](#)), se pudo observar una estructura característica dependiendo de la dosis de irradiación recibida. De hecho, las matrices no irradiadas (0 kGy) al igual que las irradiadas con 5 kGy, mostraron una estructura relativamente más compacta que aquellas irradiadas con dosis mayores. Estas últimas observaron una porosidad superior, con poros de formas más poligonales, mientras que las matrices que no recibieron



**Fig. 2. 1: Micrografías tomadas con Microscopio Electrónico de barrido de las matrices colagénicas congeladas sin descenso controlado de temperatura en su síntesis. Cada tipo de matriz se visualiza superficial y transversalmente. Las matrices observadas fueron congeladas sin descenso semicontrolado de temperatura sin irradiación gamma (0kGy\_sDCT), e irradiadas con 5 kGy (5kGy\_sDCT), 15kGy (15kGy\_sDCT), 25kGy (25kGy\_sDCT). Barra columna izquierda: 500 μm. Barra columna derecha: 200 μm**



**Fig. 2. 2: Micrografías tomadas con Microscopio Electrónico de barrido de las matrices colagénicas resultantes de las distintas condiciones de síntesis.** Cada tipo de matriz se visualiza superficial y transversalmente. Las matrices observadas fueron congeladas mediante descenso controlado de temperatura sin irradiación gamma (0kGy\_DCT), e irradiadas con 5 kGy (5kGy\_DCT), 15kGy (15kGy\_DCT), 25kGy (25kGy\_DCT). Barra columna izquierda: 500 µm. Barra columna derecha: 200 µm

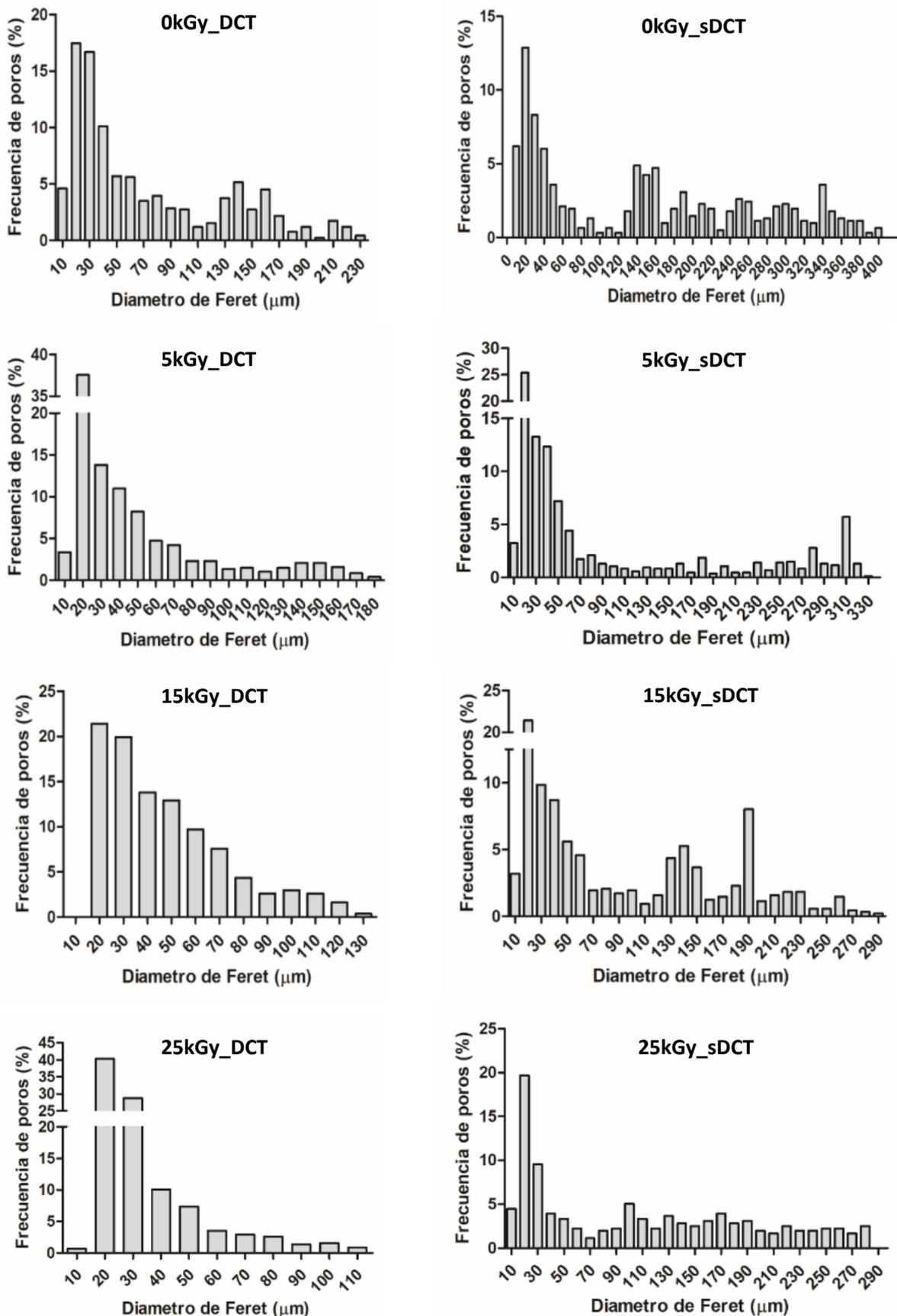
radiación *gamma* exhibieron una cantidad de poros reducida y mayormente de formas irregulares. De hecho, la matriz irradiada con 15 kGy presenta la mejor estructura en términos generales, ya que mostró una mejor proporción entre hebras, agregados de fibras y láminas de colágeno, junto con una mejor interconectividad entre las distintas capas.

El análisis cuantitativo a través del software ImagePro© Software Version 10.0 de las micrografías obtenidas mediante SEM permitió determinar el rango de tamaño de poros observados en las imágenes ([Figura 2.3](#)).

En lo que respecta a las matrices con DCT en su síntesis, se observa que el rango de diámetros de Feret es menor que para las matrices sin DCT (13.07 – 229.42  $\mu\text{m}$  Vs 8.60  $\mu\text{m}$  - 401.62  $\mu\text{m}$ ), y a su vez poseen una menor desviación estándar ([Tabla 2.2](#)). Asimismo, se determinó que al menos el 71.43% de los poros de estas matrices poseen diámetros dentro del rango ideal para permitir la reparación tisular, es decir entre 20  $\mu\text{m}$  y 120  $\mu\text{m}$  (Yannas et al., 2010). En particular, las matrices 0kGy\_DCT, observaron un rango de diámetros entre 13.07  $\mu\text{m}$  - 229.42  $\mu\text{m}$ , siendo el mayor rango para las matrices con DCT, y su media fue la más alta entre las matrices con DCT, ubicándose en 72.08  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, los valores de diámetro de Feret resultaron estadísticamente distintos al resto de las matrices con DCT, y también con respecto a 0kGy\_Sdct y 25kGy\_sDCT, no siendo así con respecto a 5kGy\_sDCT y 15kGy\_sDCT. Por su parte, las matrices con DCT e irradiadas con 5 kGy obtuvieron un rango de valores entre 14.36  $\mu\text{m}$  -179.16  $\mu\text{m}$  y una media de 46.65  $\mu\text{m}$ , ubicándose en segundo lugar dentro de las matrices con DCT. Estos andamios observaron valores estadísticamente distintos al resto de las matrices evaluadas ( $p < 0.05$ ). Las matrices con DCT y 15 kGy de irradiación, observaron un rango de valores un tanto más acotado (16.37  $\mu\text{m}$  – 129.45  $\mu\text{m}$ ) y una media de 47.37  $\mu\text{m}$ , difiriendo estadísticamente del resto de matrices evaluadas.

A su vez, las matrices 15kGy\_DCT tuvieron el porcentaje más alto de poros con tamaño dentro del rango óptimo para la reparación tisular (99.63%). Por último, las matrices 25kGy\_DCT fueron las que obtuvieron el intervalo más acotado de diámetros de Feret (14.43  $\mu\text{m}$  – 109.37  $\mu\text{m}$ ), junto con la menor media (37.87  $\mu\text{m}$ ) y el menor desvío estándar (20.04) de todas las matrices analizadas. Dichas matrices también lograron diferenciarse estadísticamente del resto de las matrices evaluadas en el estudio ( $p < 0.05$ ).

Por su parte, las matrices que en su proceso de síntesis no fueron congeladas mediante el DCT obtuvieron diámetros de poro mayores, y a su vez resultaron ser más polidispersas que las matrices con DCT. El rango de diámetros de Feret más amplio fue el obtenido para la matriz 0kGy\_sDCT, siendo entre 8.60  $\mu\text{m}$  y 401.62  $\mu\text{m}$ . A su vez, este tipo de matriz obtuvo la media de diámetro más alta de todas las matrices evaluadas (148.66  $\mu\text{m}$ ), y también se diferenció estadísticamente del resto de los andamios estudiados. Las matrices sin DCT, pero con una dosis de radiación de 5 kGy observaron un rango de valores un tanto más reducido (entre 10.88  $\mu\text{m}$  y 329.69  $\mu\text{m}$ ) y una media de 93.25  $\mu\text{m}$ . Los diámetros medidos en dicha matriz no resultaron estadísticamente distintos de los medidos en las matrices 15kGy\_sDCT, pero sí de las 25kGy\_sDCT.



**Fig. 2.3: Histogramas con la distribución de los diámetros de Feret (a lo largo del eje mayor del poro) calculados a partir de las micrografías.** Estos poros pertenecen a: las matrices sintetizadas con descenso controlado de temperatura (columna izquierda, DCT) y sin descenso controlado de temperatura (columna derecha, sDCT), y con distintas dosis de radiación gamma: 0 kGy (sin irradiación), 5 kGy, 15 kGy y 25 kGy.

Tanto las 15kGy\_ sDCT como las 25kGy\_ sDCT obtuvieron un rango de valores muy similares, por lo que no resultaron estadísticamente distintos entre sí. Sin embargo, al compararlas con matrices expuestas a mismas dosis de radiación, pero con DCT, se observó que la cantidad de poros que se encontraban dentro del rango óptimo para reparación tisular se redujo considerablemente, cayendo a 60.36% y 54.76% respectivamente. De esta forma puede observarse que, si bien no hay grandes diferencias entre las matrices irradiadas y sin DCT, estas sí se diferencian de las matrices que no fueron expuestas a la radiación *gamma* (0kGy\_ sDCT).

**Tabla 2.2: Estadísticos calculados para los diámetros de Feret de las diferentes matrices evaluadas.** Ente estos se incluyen: los diámetros máximos y mínimos, media con su correspondiente intervalo de confianza (IC) al 95%, desviación estándar y la proporción de poros que se encuentran dentro del rango óptimo para la reparación tisular (20-120  $\mu\text{m}$ )

Estadísticos	Con descenso controlado de temperatura				Sin descenso controlado de temperatura			
	0kGy_ DCT	5kGy_ DCT	15kGy_ DCT	25kGy_ DCT	0kGy_ sDC T	5kGy_ s DCT	15kGy_ sDCT	25kGy_ sDCT
Valor Mínimo ( $\mu\text{m}$ )	13.07	14.36	16.37	14.43	8.60	10.88	13.40	13.35
Valor Máximo ( $\mu\text{m}$ )	229.42	179.16	129.45	109.37	401.63	329.69	289.37	280.68
Media ( $\mu\text{m}$ )	72.09	46.64	47.37	33.87	148.66	93,25	91.69	108.26
[IC 95%]	[68.37-75.80]	[44.12-49.17]	[45.57-49.16]	[32.55-35.19]	[139.29-158.03]	[86.54-99.97]	[86.72-96.67]	[99.48-117.04]
Desviación estándar	57.09	39.57	25.90	20.04	118.14	100.33	74.91	84.25
Porcentaje de poros entre 20-120 $\mu\text{m}$ (%)	71.43	88.08	99.63	99.32	38.17	70.12	60.37	54.78

En base a los resultados obtenidos sobre la microestructura de las matrices, a grandes rasgos puede observarse que varias de las matrices sintetizadas observaron un tamaño de poro mayormente adecuado para la reparación tisular; y que, si bien poseen ciertas similitudes, fue posible detectar diferencias resultantes de las distintas condiciones de síntesis.

Con respecto a la cantidad de poros cuyo tamaño se encuentra dentro del rango óptimo para permitir la reparación tisular, es importante subrayar que al menos el 71.43% de los poros de las matrices con DCT se encuentran en dicho rango. No obstante, este porcentaje se torna considerablemente menor en matrices con las mismas dosis de radiación, pero sin DCT.

En relación al rango de diámetros obtenidos, fue fácilmente observable que las matrices que sí tuvieron un DCT en su proceso de síntesis exhibieron no solamente un menor rango de tamaño de poro, lo cual las hace más homogéneas, sino también tamaños máximos de poro menores que cuando no hay DCT. Dicho resultado concuerda con lo esperado y con otros estudios previos como el de O'Brien et al. (2004), en el que se establece que las condiciones de congelamiento de la suspensión CG son las más importantes cuando se trata de definir la estructura del poro. De hecho, tal como se menciona anteriormente, se ha comprobado que cuando la etapa de congelamiento no se controla, los poros que se originan son altamente polidispersos en diámetro (O'Brien et al., 2004; Yannas et al., 2010). Esto se debe a que al regular el congelamiento de la suspensión, se controla la formación y crecimiento de los cristales de hielo, lo cual resulta en andamios CG con estructuras de poro más homogéneas (Murphy & O'Brien, 2010). Dicha situación también se encuentra reflejada en los resultados, ya que se detectaron diferencias estadísticas entre matrices con la misma dosis de radiación pero que diferían en la presencia o ausencia de DCT, lo cual indica que ese proceso genera un cambio en la microestructura de la matriz. Por otro lado, no se detectaron grandes diferencias entre las matrices irradiadas y sin DCT, pero estas sí se diferenciaron de las matrices que no fueron expuestas a la radiación *gamma*. Esto también podría estar reforzando el hecho de que, si bien la radiación genera una modificación estructural, la presencia o ausencia de DCT resultaría fundamental al momento de determinar la microestructura de las matrices.

De esta forma, tal como se ha demostrado en otros trabajos, este estudio también advierte que la porosidad, la morfología y el tamaño de poro en matrices liofilizadas pueden ser determinadas mediante el control de la tasa de congelamiento y la temperatura de congelamiento final (Harley et al., 2007; Harley & Gibson, 2008; Kane & Roeder, 2012; O'Brien et al., 2005a; Yannas et al., 2010). En este sentido, el procedimiento por el cual se realiza el congelamiento de la suspensión CG, determina no solo el promedio del tamaño de poro, sino la uniformidad de dicho tamaño (Yannas et al., 2010). Por otro lado, tal como se menciona anteriormente, la radiación ionizante es una de las mayores causantes de alteraciones de la estructura interna de polímeros, generando consecuentemente una serie de cambios interrelacionados en sus propiedades fisicoquímicas (You et al., 2013). Este aspecto también fue corroborado por el estudio ya que se observan diferencias entre las matrices irradiadas con distintas dosis. No obstante, se determinó que la tasa de congelamiento resulta un factor más preponderante que la radiación *gamma* en cuanto a su influencia en la estructura de la matriz.

Por otro lado, cabe destacar que, debido a la falta de accesibilidad a ciertas técnicas, no fue posible medir cuantitativamente la porosidad de las matrices. Por tanto, futuros ensayos podrían incluir otras técnicas de medición de porosidad para obtener valores precisos de este parámetro, tales como porosimetría de mercurio o microtomografía computada (Loh & Choong, 2013).

Por último, en base a los resultados obtenidos, puede establecerse que la matriz con las mejores características, en cuanto a su microestructura y el tamaño de sus poros, para potencialmente promover la reparación tisular sería aquella que en su proceso de síntesis posee DCT y además una dosis de radiación *gamma* de 15 kGy (15kGy\_DCT).

### **Análisis biomecánico**

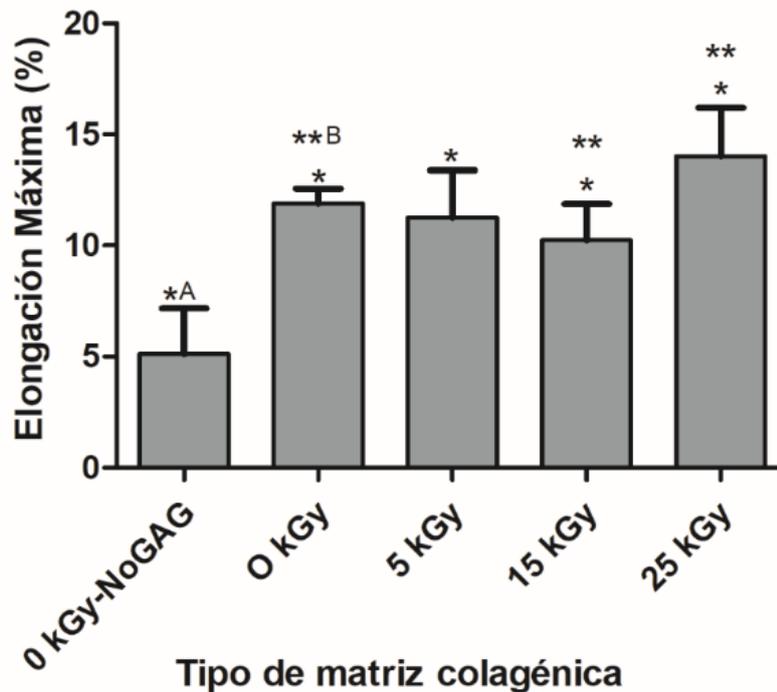
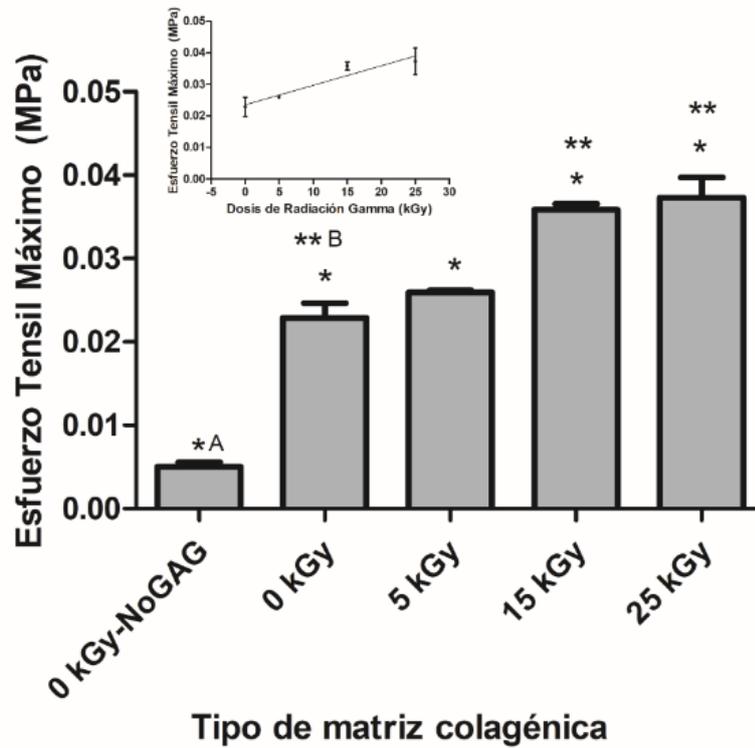
En el presente ensayo, se analizaron matrices sintetizadas con diferentes estrategias de entrecruzamiento para determinar la influencia de dicho parámetro en las propiedades mecánicas de los constructos ([Figura 2.4](#)).

En primer lugar, los resultados indican que los valores medios de ETM obtenidos rondaron entre 0.006 y 0.037 MPa. Al comparar dichos valores con los que figuran en la literatura de matrices con similar composición ([Tabla 2.3](#)), por un lado resultaron ser considerablemente menores que algunos (Angele et al., 2004; Fritz et al., 2012), pero a su vez, mayores que otros andamios (Roeder et al., 2002). De todas formas, las comparaciones entre estudios resultan a menudo ineficaces, ya que los valores de las propiedades mecánicas dependen en gran medida de las condiciones del propio estudio, tales como la velocidad de tracción y de la preparación de las muestras previo al ensayo (Joodaki & Panzer, 2018). Además, para que las comparaciones entre andamios sean pertinentes, se deben tener en cuenta las propias características de la matriz, como su composición y su metodología de síntesis.

En cuanto a las distintas matrices evaluadas en este estudio, se observó que la diferencia más evidente ocurrió con los MC que no contenían GAG, los cuales adquirieron el valor de ETM más bajo (0.006 MPa). Por su parte, las matrices con GAG pero sin irradiación obtuvieron valores de ETM estadísticamente menores ( $p < 0.05$ ) que aquellas con dosis de radiación altas (15 kGy y 25 kGy), pero no se diferenciaron de las que fueron irradiadas con 5 kGy. A su vez, se detectó cierta tendencia al aumento de los valores de ETM a medida que se incrementan las dosis de radiación *gamma* ( $R^2 = 0,9158$ ).

Por otra parte, los valores medios de %EB de las distintas condiciones de síntesis se ubicaron entre 5.12 y 14.02 %. Estos valores resultaron dentro del rango que se reporta en la literatura, siendo similares a los obtenidos en ciertos estudios (Angele et al., 2004) aunque también inferiores a otros (Fritz et al., 2012). Nuevamente, las matrices sin GAG fueron considerablemente inferiores al resto de las matrices. A su vez, se detectaron diferencias entre los valores medios de %EB de las matrices que no habían sido irradiadas (0 kGy) con respecto a las que sí. Sin embargo, no se observa una tendencia clara con respecto al efecto de las dosis de irradiación en este parámetro. De hecho, las matrices irradiadas con dosis de 15 kGy obtuvieron un valor medio de %EB más bajo que las que no fueron irradiadas (10.24 % vs 11.89 %). No obstante, ambos valores se encuentran dentro del rango reportado en otros trabajos (Angele et al., 2004). Por otra parte, las matrices irradiadas con 25 kGy fueron las que reportaron los valores más altos de %EM (14.02 %).

Los resultados en ambos parámetros indicaron que la adición del GAG fue el agente de entrecruzamiento que causó el impacto más preponderante en las propiedades mecánicas evaluadas. De hecho, la incorporación de GAG en la suspensión de colágeno tuvo un efecto positivo, generando una mejora en dichas propiedades. Esto se debe a que se observaron incrementos significativos en el ETM y %EM de las matrices evaluadas que incorporaron el GAG en su proceso de síntesis. Dichos resultados coincidieron con lo esperado, ya que se ha reportado ampliamente en la literatura que la presencia GAG incrementa las propiedades mecánicas de los andamios (Osborne et al., 1998; Wessels, 2007; Zou et al., 2004).



**Fig. 2.4.: Propiedades mecánicas de las matrices colagénicas.** Se graficaron los valores medios (y desviación estándar correspondiente) del Esfuerzo Tensil Máximo (MPa) (A) y el porcentaje de Elongación Máxima (B) para los siguientes tipos de matrices colagénicas: matrices sin condroitín 6-sulfato (GAG) ni irradiación gamma (0 kGy –NoGAG), matrices con GAG pero sin irradiar (0 kGy), y matrices con GAG y distintas dosis de radiación gamma en su proceso de síntesis (5 kGy, 15 kGy and 25 kGy). Las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) se especifican entre (\*A) y (\*) o entre (\*\*B) y (\*\*) para cada imagen. En el inset se representa la tendencia al incremento del Esfuerzo Tensil Máximo dentro del rango dosis de radiación gamma testeado (5 kGy, 15 kGy and 25 kGy) ( $r^2 = 0,9158$ ).

**Tabla 2.3: Comparación bibliográfica de propiedades biomecánicas.** La presente tabla muestra los rangos de valores presentes en la literatura del Esfuerzo Tensil Máximo (ETM) y el Porcentaje de Elongación Máximo (%EM) que corresponden tanto a piel humana como a matrices colagénicas de similar composición a las evaluadas en este estudio. EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida); NHS: N-hidroxisuccinimida. (\*) valor medio  $\pm$  desviación estándar.

Producto/Tejido	ETM (Mpa)	%EM	Fuente
Matriz de colágeno tipo I bovino con entrecruzamiento mediante EDC/NHS	0.158 – 0.113	9 - 12	Angele et al., 2004
Matriz de colágeno bovino y GAG (Integra TM)	1.201 $\pm$ 0.5383*	50 - 60	Fritz et al., 2012
Matrices de colágeno tipo I bovino	0,00541 - 0,00954	1.94 - 2.72	Roeder et al., 2002
Piel humana	1 - 20	30 - 70	Holzapfel (2000)

Por su parte, la radiación *gamma* también dio lugar a andamios con diferentes comportamientos mecánicos, pero estas diferencias no tuvieron consecuencias tan abruptas, como sí lo fue la adición de GAG. Sin embargo, en términos generales la utilización de la radiación *gamma*, tanto como agente de entrecruzamiento como esterilizante, no tuvo un impacto significativamente negativo en las propiedades mecánicas a diferencia de lo reportado en la literatura (Faraj et al., 2011). Una posible explicación podría ser que la radiación *gamma* de la suspensión congelada de colágeno:GAG, no solamente genera ruptura de enlaces en las moléculas de colágeno, sino que también induce el entrecruzamiento entre ambos componentes (You et al., 2013), de forma que se estaría compensando la fragmentación de las proteínas que se produce con la irradiación (Faraj et al., 2011). De hecho, los valores promedio de ETM incluso muestran una tendencia creciente dentro del rango de irradiación utilizado, de manera que podría establecerse que esta propiedad se encuentra en parte influenciada positivamente por la dosis de irradiación *gamma*.

Por otra parte, el incremento en la %EB al agregar GAG podría explicarse debido a que las fuerzas ténsiles de los andamios están asociadas a su arquitectura fibrosa y al gran número de puntos de entrecruzamiento que dan lugar a fuerzas cohesivas intrínsecas (Sarkar et al., 2013). Esta asociación fisicoquímica implica la incorporación de nuevas microfibras como resultado del entrecruzamiento, lo cual produciría un incremento en el deslizamiento entre cadenas al someterlas bajo tensión y, por tanto, un aumento en la capacidad de deformación del constructo (Sarkar et al., 2013). Este escenario también podría dilucidar el incremento en el %EB de las matrices irradiadas con 25 kGy. Por otra parte, la reducción en %EB que ocurre con las dosis más bajas de irradiación podría estar atribuida a que el balance entre el entrecruzamiento y la fragmentación proteica

resultante para dichas dosis ocasiona un bloqueo entre fibras y restringe el deslizamiento entre cadenas (Sarkar et al., 2013).

En términos generales, a pesar de las mejoras que los distintos tipos de entrecruzamiento les proporcionaron a las matrices evaluadas, sus propiedades mecánicas no se encuentran en un rango similar al de la piel humana (Holzapfel, 2000). No obstante, estas diferencias podrían no constituir un impedimento para su correcta utilización como andamio para la reparación dérmica. Por un lado, esto se debe a que las funciones mecánicas de la piel resultan complejas de evaluar y comparar (Pereira, 2012), ya que son estrechamente dependientes de diversos factores tales como la región corporal, la edad y género del individuo (Hermanns-lê et al., 2004). Consecuentemente, el rango de valores de ETM y EM% reportados en la literatura es bastante amplio. A su vez, cabe señalar que la piel humana es considerada un material anisotrópico de viscoelasticidad no lineal, cuyas propiedades mecánicas se encuentran estrechamente ligadas a la velocidad de deformación con las que se analicen (Holzapfel, 2000; Joodaki & Panzer, 2018; Orgill & Blanco, 2009). Por ende, las diferencias de las propiedades mecánicas entre la piel y los andamios en cuestión podrían no ser un fiel reflejo de la realidad, ya que el rango de valores para comparar es muy amplio y depende de múltiples factores, tanto del propio tejido como de las condiciones de experimentación.

Ahora bien, existe una cantidad considerable de trabajos publicados donde se demuestra la influencia de las propiedades mecánicas en la actividad celular, de manera tal que estas determinan, en parte, la funcionalidad del constructo de ingeniería tisular (Engler et al., 2006; Gurusurthy & Janorkar, 2021; Haugh et al., 2009; Orgill & Blanco, 2009). Generalmente se establece que los andamios idealmente deben tener propiedades mecánicas análogas a las del tejido nativo en el que van a ser utilizadas (Chan & Leong, 2008; Hutmacher, 2000). No obstante, cabe destacar que otros autores establecen que dichas propiedades no constituyen un único requerimiento para ser un material idóneo en muchas aplicaciones de ingeniería tisular (Haugh, 2009) sino que la clave del éxito de estos materiales es el balance entre las propiedades mecánicas y la arquitectura porosa de los andamios, el cual debe ser suficiente para permitir la infiltración celular y vascularización (O'Brien, 2011). A su vez, no debemos olvidar que los tratamientos estándar para reparar tejidos utilizan soportes como la fijación y suturas para soportar la tensión mecánica durante la cicatrización y la rehabilitación (Haugh, 2009). Por tanto, a la hora de ponderar la influencia de las propiedades mecánicas en la funcionalidad biológica de los andamios de reposición dérmica, es más importante que estas permitan la adecuada adherencia y direccionamiento celular, para que promuevan tanto la producción de la MEC como la regeneración del tejido. Dicha situación resulta más crítica para su funcionalidad, que las propiedades requeridas para que los constructos soporten la carga cuando se implanten; siempre y cuando estas sean suficientes para sobrevivir a la implantación quirúrgica y al ambiente *in vivo* (Haugh, 2009; O'Brien, 2011). Por tanto, cabe destacar que la caracterización biomecánica de las matrices colagénicas resulta crítica, ya que estas propiedades juegan un rol preponderante en impartir la estabilidad durante la integración de tejidos y la formación de neot Tejido (Sarkar et al., 2013).

Por último, en base a los resultados obtenidos en este estudio podría establecerse que, en términos generales, las condiciones de síntesis que obtuvieron las propiedades biomecánicas más altas fueron las matrices con GAG y que a su vez se irradiaron con 25 kGy. Sin embargo, las matrices con GAG e irradiadas con 15 kGy, observaron valores de ETM similares a las de 25 kGy, y obtuvieron valores de %EM similares a los reportados en otros estudios, por lo que también es posible considerar que resultarían adecuadas para su utilización como andamios de reposición dérmica. Adicionalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización morfológica, y el grado de suma importancia que ésta tiene para determinar la funcionalidad de la matriz (Tripathi et al., 2021), se establece que la matriz irradiada con 15 kGy es la mejor opción de las disponibles para desempeñarse como constructo de reposición dérmica. De todas formas, si bien la diferencia entre estas 2 matrices no resulta tan contundente, es importante recordar que las dosis de irradiación mayores incrementan la posibilidad de que junto con el entrecruzamiento ocurra la fragmentación de enlaces, y, por tanto, de degradación de la estructura del colágeno. Además, aún si no hubiera habido ninguna diferencia entre estas matrices, por cuestiones del tiempo requerido para la irradiación, también resulta más rentable seleccionar la dosis menor de irradiación.

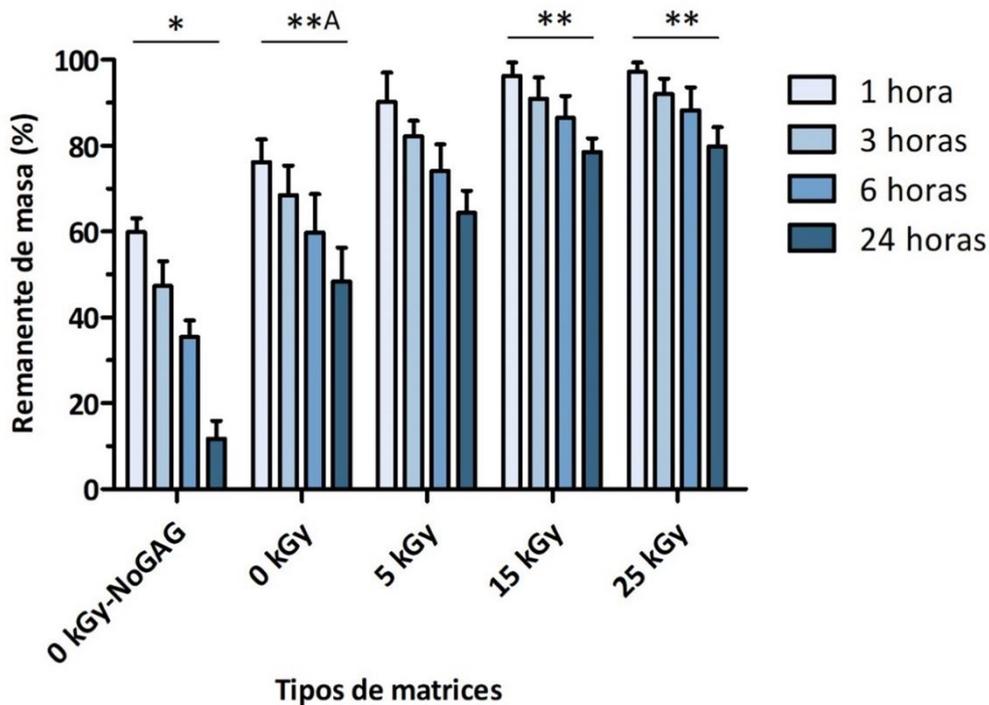
## Caracterización Química

### Degradación Enzimática

Las matrices obtenidas con diferentes métodos de entrecruzamiento fueron degradadas mediante la exposición a una solución con colagenasa. La concentración de la enzima utilizada en el ensayo, es decir, la que generó una degradación significativa pero no completa dentro de las 24 horas, fue de 0,1 mg/ml (12,5 U/ml).

En primer lugar, puede observarse que en las condiciones del ensayo todas las matrices analizadas mostraron distintos niveles de sensibilidad a la enzima colagenasa I utilizada ([Figura 2.5](#)). Las diferencias más evidentes en cuanto a la capacidad de resistir a la degradación enzimática ocurrieron en las matrices que no tenían GAG. Dichas matrices fueron las que observaron la menor resistencia a la degradación en todos los tiempos analizados diferenciándose estadísticamente del resto de las matrices estudiadas. De hecho, se observa que esta matriz se degradó a casi el 60% de la masa inicial con tan solo una exposición a la enzima de 1 hora, y aproximadamente al 12% luego de 24 horas de exposición. Sin embargo, las matrices que sí contenían GAG tuvieron una resistencia a la degradación considerablemente mayor que las matrices 0kGy-NoGAG (siendo  $p < 0.05$ ). De hecho, las matrices con GAG pero sin irradiación *gamma* advirtieron un porcentaje de masa remanente cercanas al 76 % y 48 % al ser expuestas a la degradación enzimática durante 1 y 24 horas respectivamente. A su vez, estas matrices mostraron una resistencia enzimática estadísticamente menor a las matrices irradiadas con 15 y 25 kGy, pero similar a las irradiadas con 5 kGy. Por otra parte, las matrices con GAG e irradiadas con 15 y 25 kGy, fueron las que observaron la mayor resistencia a la degradación enzimática. Ambos tipos de matrices mostraron un comportamiento muy similar ante la degradación enzimática con la colagenasa I, siendo las únicas que se diferenciaron estadísticamente de las matrices no irradiadas. De hecho, puede observarse que las matrices 15 kGy mantienen aproximadamente el 96 % de su masa

luego de 1 hora de exposición mientras que las 25 kGy mantienen el 97 %. A su vez, a las 24 horas de exposición a la colagenasa dichas matrices resultaron degradadas alrededor de un 21% y 20% respectivamente. Las matrices 5 kGy por su parte, lograron mantener aproximadamente entre un 90 % y un 64% de su masa al ser expuestas a dicha enzima entre 1 y 24 horas, respectivamente.



**Fig. 2.5: Degradación enzimática de las matrices colagénicas.** El gráfico muestra el porcentaje de masa remanente de las distintas matrices luego de ser sometidas a la degradación enzimática con colagenasa durante 1, 3, 6 y 24 horas. Dicho ensayo se realizó en los siguientes tipos de matrices colagénicas: matrices sin condroitín 6- sulfato (GAG) ni irradiación gamma (0 kGy –NoGAG), matrices con GAG pero sin irradiar (0 kGy), y matrices con GAG y distintas dosis de radiación gamma en su proceso de síntesis (5 kGy, 15 kGy and 25 kGy). Las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) se indican entre (\*) y el resto de las matrices, o entre (\*\*A) y (\*\*).

En base a los resultados obtenidos puede observarse que las muestras que no tenían ningún tipo de entrecruzamiento (NoGAG) mostraron un mayor grado de degradación al ser expuestas a la colagenasa, en cada uno de los tiempos evaluados. Contrariamente, las matrices con algún tipo de entrecruzamiento en su síntesis, ya sea GAG y/o radiación *gamma*, exhibieron una mayor resistencia a la degradación, lo cual concuerda con lo establecido en otros estudios (Helling et al., 2017; Pek et al., 2004). Por consiguiente, se determinó que todas las matrices mostraron ser sensibles a esta enzima, lo cual resulta de vital importancia para su correcto funcionamiento como andamios de reparación tisular. Esto se debe a que los biomateriales utilizados como andamios para ingeniería tisular deben proveer un ambiente adecuado para la supervivencia, proliferación,

diferenciación y funcionalidad celular, y en la mayoría de los casos también deben ser biodegradables (Lungu et al., 2011). En efecto, la digestión mediante colagenasa puede representar una medida *in vitro* de la degradación para un implante biológico, incluso pese a las diferencias en el mecanismo de acción de la colagenasa bacteriana, la cual corta el colágeno en varios fragmentos pequeños mientras que la colagenasa mamífera lo corta solamente en 2 (Alberti & Xu, 2016; Lungu et al., 2011). Por tanto, es válido utilizar el análisis *in vitro* como mecanismo preliminar para determinar el comportamiento de degradación de estos andamios. No obstante, cabe destacar que la determinación de la durabilidad de la matriz mediante ensayos *in vivo*, podrá ayudar a confirmar la eficiencia del andamio como matriz de reparación tisular (Alberti & Xu, 2016).

Por otra parte, tal como se muestra en otros estudios, la radiación *gamma* puede utilizarse como una herramienta para modificar la biodegradabilidad de los andamios (Kawasaki et al., 2010; Khang, 2017). Dichos estudios muestran que la biodegradabilidad de ciertos andamios decrece en función de la dosis de radiación *gamma* utilizada como método de esterilización. Sin embargo, esto resulta contrario a lo observado en el presente estudio, ya que las matrices con dosis de irradiación más altas fueron las más resistentes a la degradación colagénica. Esto podría explicarse debido a que, al realizar la irradiación de las muestras congeladas, se generan distintas reacciones entre las que predomina el entrecruzamiento (Faraj et al., 2011; Hara, 2006). Si estos nuevos entrecruzamientos ocurren muy cerca de los sitios de corte de la enzima, la integridad de triple hélice podría preservarse (Cheung et al., 1990). En efecto, es sabido que la ruptura de un enlace peptídico en la molécula de colágeno debilita la estructura helicoidal, y por ende, permite una degradación enzimática más rápida de toda la molécula (Cheung et al., 1990). Por tanto, sería factible considerar que la causa de que algunos materiales irradiados fueran más susceptibles a la degradación podría ser que la dosis de radiación seleccionada generó una cantidad insuficiente de entrecruzamiento adicionales cerca de los sitios de corte, y por tanto, la enzima logró clivar la triple hélice colagénica (Cheung et al., 1990), tal como ocurrió con la matriz 5 kGy del presente estudio.

Por último, si bien los resultados del estudio indican que la degradación es mayor a otras reportadas para matrices análogas (Yannas et al., 2010) estos ensayos *in vitro* deben tomarse únicamente como indicativos de lo que sería el comportamiento *in vivo* del andamio. Por tanto, una correcta evaluación de la performance de la MC en este aspecto, debe hacerse en simultáneo con estudios *in vitro* e *in vivo*, para corroborar efectivamente el comportamiento de la MC en las condiciones fisiológicas del lecho de una herida. Entre los ensayos *in vitro*, se encuentran técnicas analíticas de mayor precisión tales como el ensayo de hidroxiprolina, o ensayos colorimétricos para la determinación del contenido de colágeno, tales como el ensayo BCA o Sircoll (Capella-Monsonís et al., 2018).

#### **Calorimetría diferencial de barrido**

La estabilidad térmica de las distintas matrices se evaluó mediante DSC. La temperatura en la que ocurre el desdoblamiento de la estructura de la proteína de colágeno fue determinada como el pico máximo del correspondiente fenómeno endotérmico

observado en el termograma DSC (Chen et al., 2005). Los resultados de dicha temperatura de muestran en la [Tabla 2.4](#) y los termogramas en la [Figura 2.6](#).

Durante el ciclo de calentamiento, todas las muestras analizadas exhibieron un pico endotérmico característicos del colágeno centrado en un rango entre 49.44 y 53.96 °C. A su vez, se observaron diferencias entre estabilidad térmica de las matrices dependiendo del tipo de entrecruzamiento que poseían. En particular, se observa que las matrices sin GAG ni irradiación exhibieron los valores de Td estadísticamente más bajos de todas las muestras analizadas ( $p < 0.05$ ), con un valor promedio de 49.44 °C. Por otro lado, las matrices que sí contenían GAG, mostraron valores de Td estadísticamente mayores. Entre éstas, las matrices sin irradiación y las que se irradiaron con 5 kGy obtuvieron valores muy similares de Td (51.43° C y 51.93° C respectivamente). Por su parte, las matrices con mayores dosis de irradiación fueron las que presentaron las mayores temperaturas de fusión: 53.87 °C (15 kGy) y 53.96 °C (25 kGy), siendo ambas estadísticamente mayores que las matrices no irradiadas.

De esta forma, si bien todas las muestras analizadas mostraron valores dentro de un rango no muy amplio, estos resultaron similares a lo reportado en otros estudios con andamios previamente hidratados (Angele et al., 2004b; Capella-Monsonís et al., 2018; Metzmacher, 2005). A su vez es importante subrayar que todos los valores de Td obtenidos para las matrices resultaron superiores a 37 °C, lo cual es crucial para resistir a las condiciones fisiológicas en caso de ser implantados en el organismo (Sun & Leung, 2008).

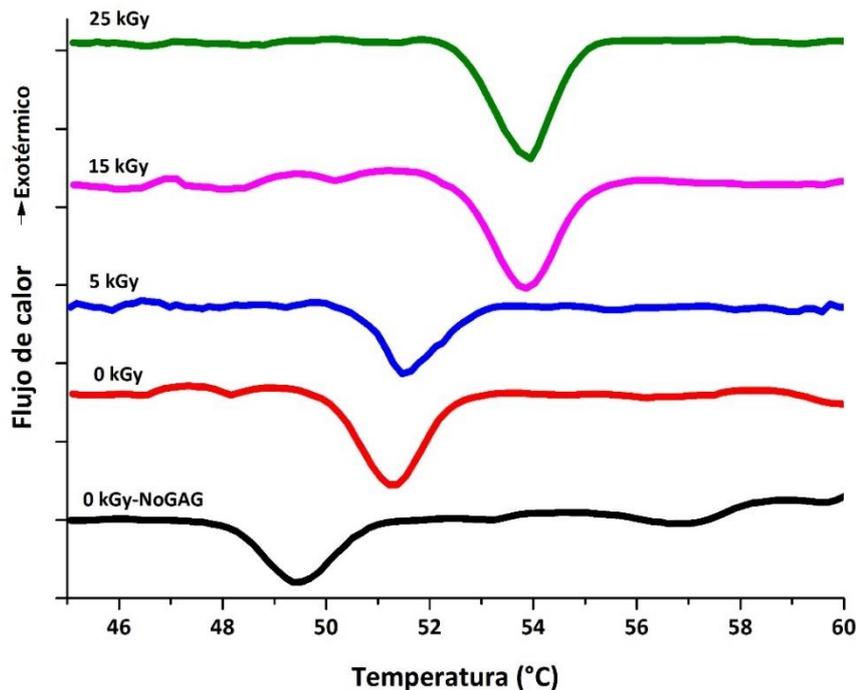
**Tabla 2.4: Temperaturas de Desnaturalización (Td) resultantes de los estudios de calorimetría diferencial de barrido.** La tabla muestra los valores promedio  $\pm$  desvío estándar de la Td obtenidas para los siguientes tipos de matrices colagénicas: matrices sin condroitín 6- sulfato (GAG) ni irradiación gamma (0 kGy –NoGAG), matrices con GAG pero sin irradiar (0 kGy), y matrices con GAG y distintas dosis de radiación gamma en su proceso de síntesis (5 kGy, 15 kGy and 25 kGy). Las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) se indican como (\*) con respecto a (A), y (\*\*) con respecto a (B).

Tipo de matriz	Td (°C)
<b>0 kGy-NoGAG</b>	49.44 $\pm$ 0.49 <sup>A</sup>
<b>0 kGy</b>	51.47 $\pm$ 0.63 <sup>B *</sup>
<b>5 kGy</b>	51.93 $\pm$ 0.56 *
<b>15 kGy</b>	53.87 $\pm$ 0.20 * **
<b>25 kGy</b>	53.96 $\pm$ 0.40 * **

En base a los resultados obtenidos puede observarse que las Td de las matrices con entrecruzamiento se corrieron hacia temperaturas más altas. Dicho parámetro se atribuye a una termo-transición en la que ocurre la ruptura de interacciones agua/proteína, ruptura de enlaces hidrógeno y la evaporación y vaporización de agua

ligada (Chen et al., 2005). Como consecuencia, cuando las moléculas de colágeno alcanzan su temperatura de desnaturalización, sufren una transición irreversible de una estructura de triple hélice altamente organizada a una superenrollada al azar, lo cual resulta en un encogimiento de la molécula de colágeno (Haugh et al., 2009; Sun & Leung, 2008). Por ende, el perfil de desnaturalización de la molécula en cuestión, se ve afectado por la hidratación, la conformación molecular, el entrecruzamiento inter e intramolecular y la fibrilogénesis (Sun & Leung, 2008). Es por esto que el punto de fusión permite detectar indirectamente y cualitativamente el grado de entrecruzamiento de los andamios, de manera que, el incremento en la temperatura de desnaturalización es interpretado como una consecuencia del entrecruzamiento, mientras que una reducción en ésta se interpretaba como escisión peptídica y desestabilización molecular (Capella-Monsonís et al., 2018; Metzmacher, 2005).

Teniendo esto en mente, los resultados obtenidos en el presente estudio indicarían que la estabilidad térmica de los andamios mejora, en primer lugar, con la adición del GAG y también con el incremento de las dosis de radiación de hasta 25 kGy, lo cual concuerda con lo detectado en la literatura (You et al., 2013). Esto podría explicarse debido a que, durante el proceso de irradiación, ocurren principalmente dos reacciones de forma simultánea en el andamio: reacciones de entrecruzamiento y de acordamiento de cadenas peptídicas, y ambas reacciones contribuyen al aumento de la Td. El efecto del

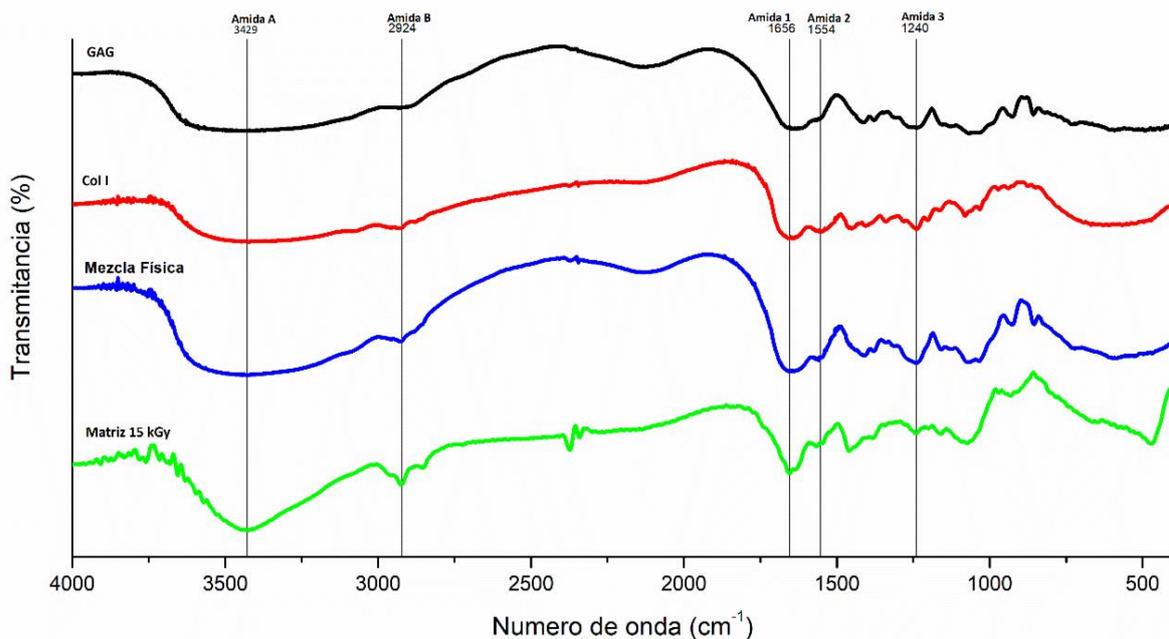


**Fig. 2.6: Termogramas obtenidos del estudio de las propiedades térmicas de las matrices colagénicas.** El gráfico muestra los picos endotérmicos obtenidos para cada una de las matrices evaluadas: matrices sin condroitín 6- sulfato (GAG) ni irradiación gamma (0 kGy –NoGAG), matrices con GAG pero sin irradiar (0 kGy), y matrices con GAG y distintas dosis de radiación gamma en su proceso de síntesis (5 kGy, 15 kGy and 25 kGy).

entrecruzamiento sobre las fibras se menciona más arriba. Por su parte, el acortamiento de cadenas ocasiona una ruptura macromolecular de las cadenas, y, por tanto, también produce un incremento en la Td, muy probablemente debido a un empaquetamiento apretado y al rearrreglo de las cadenas poliméricas cortas resultantes. (You et al., 2013).

### *Análisis con Espectroscopía de Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) y Espectroscopía Raman Confocal*

Los espectros FT-IR de las muestras analizadas se muestran en la [Figura 2.7](#). En primer lugar, se observa que tanto la muestra Col1, así como la mezcla física y la matriz 15 kGy, mostraron las típicas bandas descritas para el colágeno. En efecto, los espectros IR se encuentran dominados por la contribución proveniente de las vibraciones de los grupos amida, y sus bandas características. Por ejemplo, la Amida A, que está dada por una extensión N–H unida a un enlace de hidrógeno, fue detectada a  $\sim 3429\text{ cm}^{-1}$ , tal como se indica en otros estudios (Sadeghi-avalshahr et al., 2017; Sionkowska & Kozłowska, 2010). Por otro lado, la Amida B, una vibración de extensión C–H asimétrica se presentó a  $\sim 2924\text{ cm}^{-1}$  (Rahman et al., 2019; Riaz et al., 2018; Sionkowska & Kozłowska, 2010). A su vez, la Amida I se ubicó a  $\sim 1656\text{ cm}^{-1}$ , a la cual regularmente se le asigna a una extensión C=O (León-Mancilla et al., 2016; Rahman et al., 2019; Riaz et al., 2018; Sionkowska & Kozłowska, 2010; Tripathi et al., 2021; Vázquez-Zapién et al., 2019). La Amida II por su parte, que corresponde a una flexión N–H unida a una extensión C–H, fue asignada a  $\sim 1554\text{ cm}^{-1}$  (León-Mancilla et al., 2016; Rahman et al., 2019; Riaz et al., 2018; Sionkowska & Kozłowska, 2010; Tripathi et al., 2021; Vázquez-Zapién et al., 2019). La banda de la Amida III, asignada a flexión N–H unida a una extensión C–N, se encontró



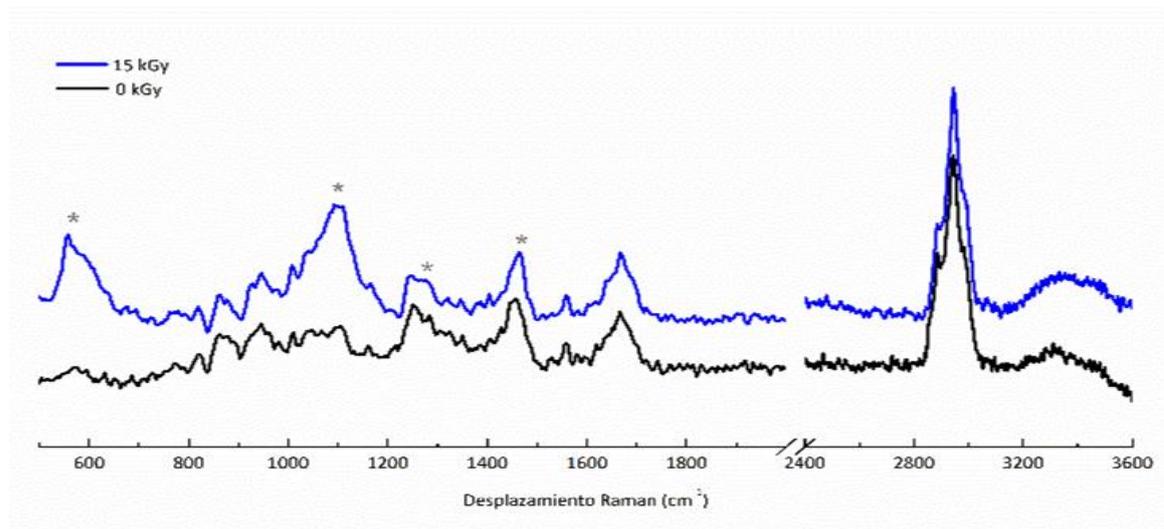
**Fig. 2.7: Espectroscopía de Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) de las matrices colagénicas y sus componentes.** El gráfico muestra el espectro FT-IR de: GAG (Condroitin-6-Sulfato)(negro), colágeno type I bovino liofilizado (Col 1)(rojo), mezcla física(GAG y Col 1)(azul) y la matriz de colágeno y GAG irradiada con 15 kGy (Matriz 15 kGy)(verde). Los grupos funcionales de las Amidas se encuentran identificados en el gráfico (A, B, I, II, III).

a  $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$  (León-Mancilla et al., 2016; Sadeghi-avalshahr et al., 2017; Sionkowska & Kozłowska, 2010; Tian et al., 2012; Tripathi et al., 2021). Al comparar las distintas muestras, puede observarse que no existen grandes diferencias entre ellas. Sin embargo, se detectó un pequeño corrimiento en la banda de la Amida II en el espectro de la matriz colagénica, de  $1554\text{ cm}^{-1}$  a  $1567\text{ cm}^{-1}$ . A su vez, el espectro IR de la mezcla física muestra dos picos a  $1030\text{ cm}^{-1}$  y  $1080\text{ cm}^{-1}$ , los cuales provienen de  $\nu(\text{C}-\text{O})$  y  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$  asociadas a la absorción de porciones de carbohidratos (Baker et al., 2014; Belbachir et al., 2014). Por el contrario, el espectro resultante de la muestra de matriz colagénica solamente mostró el segundo de estos picos, con un pequeño corrimiento a  $1070\text{ cm}^{-1}$ .

En lo que respecta al espectro IR de GAG, se advirtieron algunas similitudes con las bandas asignadas a los grupos amida, pero a su vez reveló bandas a  $\sim 1377\text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 1412\text{ cm}^{-1}$ , las cuales representan respectivamente vibraciones de extensión de  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{C}-\text{O}$  de los grupos carboxilo ionizados. En efecto, la banda a  $1380\text{ cm}^{-1}$ , relacionada con las vibraciones simétricas de flexión correspondientes a los GAG (Guerrero-Robles, 2017), se observa en todos los espectros a excepción de la muestra Col1, lo cual era de esperarse ya que no contiene este componente. Asimismo, cabe destacar que los picos de absorción característicos del GAG incluyeron no solo vibraciones de extensión de  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{O}-\text{H}$ , sino también de  $\text{S}=\text{O}$  a  $\sim 1239\text{ cm}^{-1}$  (Garnjanagoonchorn et al., 2007; Tian et al., 2012), los cuáles también se detectaron en este estudio.

El espectro Raman colectado para las matrices 15 kGy and 0 kGy se muestran en la [Figura 2.8](#). Dichos espectros exhibieron algunas de las vibraciones características de las bandas asignadas a los grupos de amidas (Bonifacio & Sergio, 2010). En particular, la banda a la amida I fue asignada a  $\sim 1666\text{ cm}^{-1}$ , junto con el doblete de picos correspondientes a la Amida III en  $\sim 1249$  y  $1270\text{ cm}^{-1}$ . Además, también se logró observar el grupo de bandas asignadas vibraciones de extensiones  $\text{C}-\text{C}$  de los residuos de Pro y Hyp en la región  $800-1000\text{ cm}^{-1}$  (Bonifacio & Sergio, 2010; Hwang & Lyubovitsky, 2012).

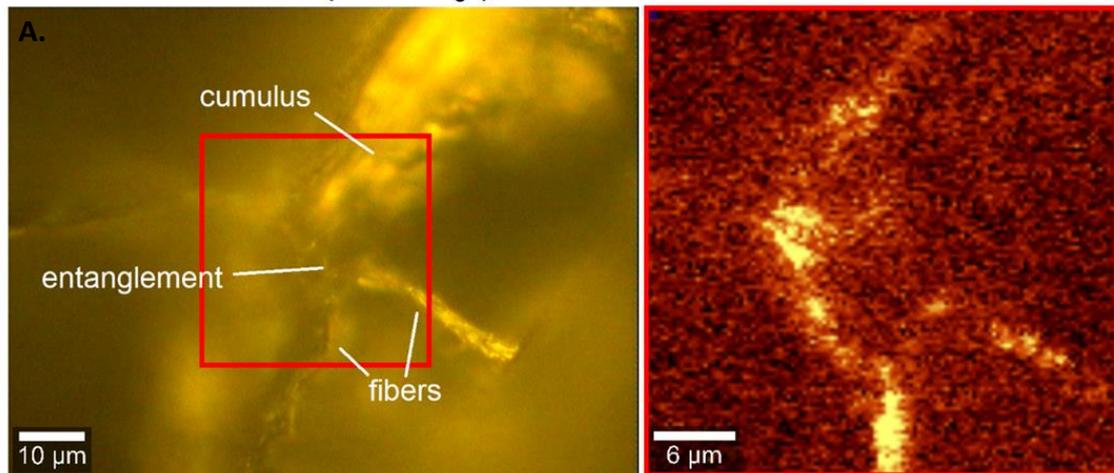
Por otro lado, se detectaron algunas diferencias entre los espectros de ambas muestras. En la muestra irradiada, se observó un pequeño corrimiento de  $1454$  a  $1465\text{ cm}^{-1}$ . De acuerdo a lo reportado en la literatura, este pico podría asociarse a un cambio en residuos de Lys y/o Arg, lo cual podría ocasionar cambios en el modo de deformación de grupos  $\text{CH}_2$  (Hwang & Lyubovitsky, 2012). Adicionalmente, otras diferencias espectrales fueron detectadas en la región de la Amida III, en donde la muestras 15 kGy observaron un pico en forma de hombro alrededor de  $1270\text{ cm}^{-1}$ . Estas diferencias espectrales estarían referidas a la estructura secundaria de las proteínas colagénicas (Martinez et al., 2019). A su vez, la matriz 15 kGy mostró un pico bien definido cerca de  $550\text{ cm}^{-1}$ , el cual se supone que es un indicador de la presencia de puentes disulfuro (Gniadecka et al., 1998; Martinez et al., 2019), y que además podría estar relacionado con un incremento en el entrecruzamiento de la matriz de colágeno. Dicha matriz irradiada también mostró un pico exaltado a  $\sim 1090\text{ cm}^{-1}$ , lo cual podría estar relacionado con  $\nu(\text{S}=\text{O})$  (Bergholt et al., 2016) y posiblemente exponiendo el entrecruzamiento del colágeno (Hwang & Lyubovitsky, 2012). Del mismo modo, también se advirtió un hombro a  $1630\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de la muestra 15 kGy, el cual es una característica de la triple hélice como estructura secundaria (Martinez et al., 2019), además de un posible indicador de la presencia de láminas beta (Gullekson et al., 2011).



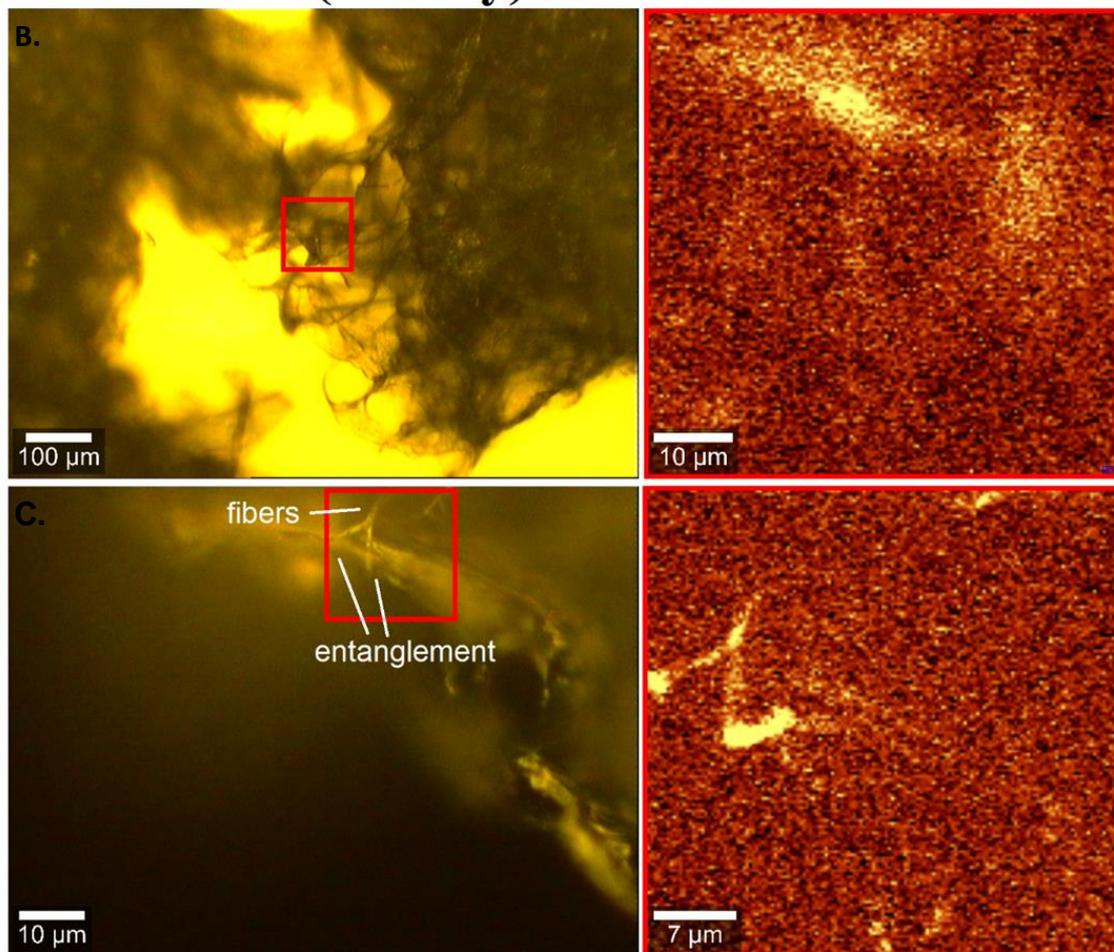
**Fig. 2.8: Espectroscopía Raman de matrices colagénicas.** La imagen muestra los correspondientes espectros Raman de las matrices de colágeno y condroitin-6-sulfato irradiadas con 15 kGy (15 kGy, azul) y sin irradiación gamma (0 kGy, negro). Los (\*) marcan los puntos donde se observaron las diferencias más claras entre los espectros de las muestras.

Las imágenes tomadas con el Raman confocal y sus correspondientes áreas seleccionadas se muestran en la [Figura 2.9.1](#) y [2.9.2](#). La microestructura de la matriz sin irradiar resultó muy heterogénea, lo cual se evidenció por la marcada presencia de grandes cúmulos no fibrosos (del inglés “*cumulus*”) y por zonas de enredo de fibras (del inglés “*entanglement*”), que se detectaron claramente en panel superior izquierdo (A.) de la [Figura 2.9.1](#). Por el otro lado, en los paneles izquierdos B y C de dicha figura se logró apreciar que las muestras irradiadas con 15 kGy mostraron una microestructura más homogénea compuesta principalmente por finas fibras (del inglés “*fibers*”), con algunas zonas de enredo de fibras, pero sin la marcada presencia de acumulaciones no fibrosas observadas en las muestras sin irradiar. Dichas características arquitecturales se encuentran en concordancia con lo observado y analizado mediante SEM, descritas en secciones anteriores del trabajo. Las áreas seleccionadas de las imágenes Raman se muestran en los paneles derecho de la [Figura 2.9.1](#), mientras que los respectivos espectros Raman de dichas áreas seleccionadas se muestran en la [Figura 2.9.2](#). En términos generales, tanto para las muestras 0 kGy como de las 15 kGy, los espectros de las fibras y las zonas de enredo mostraron tendencias similares a las discutidas anteriormente, y se muestran marcados con asteriscos en la [Figura 2.7.2](#). No obstante, también fue posible detectar algunas variaciones en los espectros. En particular, el incremento en el espectro Raman de la intensidad relativa en los modos del esqueleto carbonado por debajo de los  $600\text{ cm}^{-1}$  fue evidente para las matrices 15 kGy, junto con la presencia de un pico a  $\sim 1090\text{ cm}^{-1}$  y el otro en forma de hombro a  $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$ . Asimismo, otras diferencias sutiles fueron detectadas, tales como la reducción de la intensidad Raman en el pico a  $\sim 1160\text{ cm}^{-1}$ , que podría estar asociado a cambios conformacionales en el ambiente de residuos de Tyr del colágeno (Hwang & Lyubovitsky, 2012).

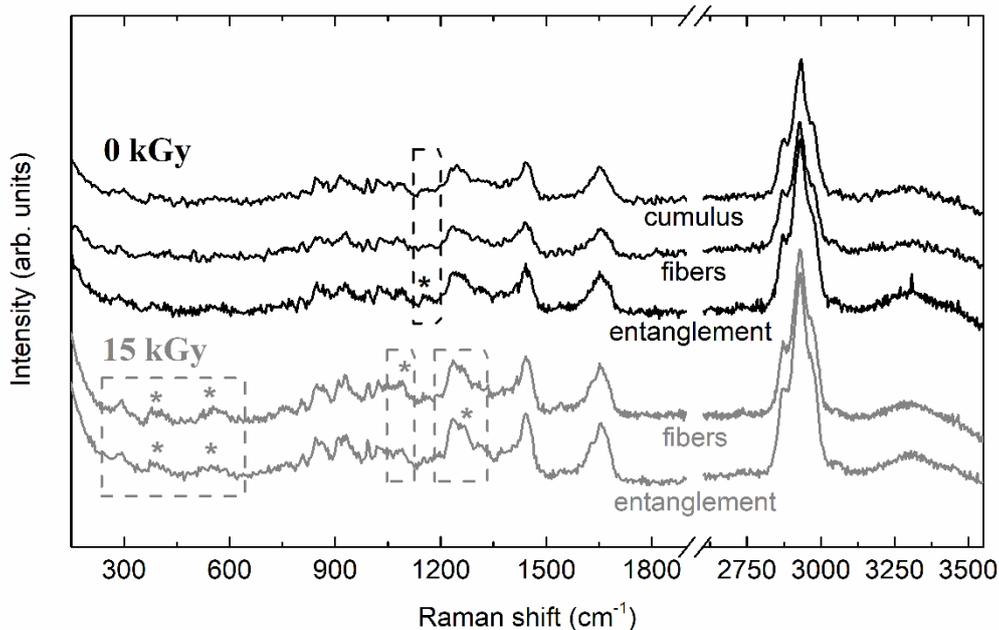
## CG scaffold (0 kGy)



## CG scaffold (15 kGy)



**Fig. 2.9.1: Imágenes de Microscopía Raman Confocal de las matrices colagénicas.** Se observan las micrografías obtenidas mediante Microscopía Raman Confocal y sus correspondientes áreas seleccionadas para las matrices de colágeno y condroitin-6-sulfato sin irradiación (0 kGy) (Fila A.) y con 15 kGy de radiación gamma (15 kGy) (Fila B. y C.) en su proceso de síntesis. Las imágenes fueron obtenidas filtrando la intensidad Raman del modo de extensión del CH<sub>2</sub> del colágeno, definiendo así las zonas brillantes de las muestras.



**Fig. 2.9.2: Espectro Raman confocal de las áreas seleccionadas de las matrices.** El gráfico muestra los espectros Raman de las áreas seleccionadas en las imágenes obtenidas con microscopía Raman confocal para las matrices de colágeno y condroitin-6-sulfato sin irradiación (0 kGy) y con 15 kGy de radiación gamma (15 kGy).

Los espectros FT-IR y Raman de las muestras analizadas en este trabajo homologaron la composición de los productos obtenidos, ya que se detectaron los picos característicos del colágeno y GAG. De hecho, todas las muestras adquirieron espectros similares. Tal como se expresa en otros estudios, es importante recordar que cuando se analizan espectros IR del colágeno y GAG algunas de las posiciones de sus bandas de absorción se encuentran muy cerca unas de otras (Tian et al., 2012). Consecuentemente, esto puede dificultar asignarle, al colágeno o al GAG, las bandas que aparecen en las muestras que contienen ambos componentes (mezcla física y la matriz 15 kGy) (Tian et al., 2012).

No obstante, se detectaron ciertas diferencias sutiles entre los espectros de la mezcla física y de la matriz 15 kGy, tales como el pequeño desplazamiento de la Amida II o del corrimiento del pico de 1080 a 1070  $\text{cm}^{-1}$ . Dichas diferencias podrían ser una posible indicación de entrecruzamiento o de cambios conformacionales resultantes de la formación de nuevos enlaces, respectivamente.

Las diferencias espectrales detectadas en el análisis por Raman, permitieron divisar posibles modificaciones en la estructura química de las muestras. Por ejemplo, cambios en la cantidad o longitud de los grupos CH de los residuos de Arg y Lys (Hwang & Lyubovitsky, 2012). Por su parte, las diferencias en la banda asignada a la Amida III, a la que comúnmente se le asocian las modificaciones en la estructura secundaria de las proteínas de colágeno, podrían estar indicando una reorganización en la orientación de

las fibras proteicas del colágeno a causa del entrecruzamiento (Martinez et al., 2019). También cabe destacar que la aparición del pico a  $560\text{ cm}^{-1}$ , tanto en el espectro Raman como FT-IR de la matriz 15 kGy, podría estar sugiriendo un cambio en los modos cooperativos de red como resultado de la deformación del esqueleto de las moléculas de colágeno. Los cambios detectados por las diferencias espectrales entre las muestras podrían estar respaldando el hecho de que la radiación *gamma* resulta en cambios conformacionales, formación de nuevos enlaces y la reorganización de las fibras de colágeno. Adicionalmente, puede observarse que tanto del espectro Raman como del IR en las muestras irradiadas, se mantienen las señales características relativas a la estructura de colágeno, lo cual estaría sugiriendo que la dosis de radiación seleccionada no resulta en una degradación significativa de la estructura colagénica.

## Conclusiones

En primer lugar, cabe señalar que la caracterización efectuada en este estudio permitió seleccionar aquella que tuviera las propiedades fisicoquímicas más adecuadas, de acuerdo a la aplicación buscada, para luego ser evaluada biológicamente como andamio de reposición dérmica. Simultáneamente, se logró analizar la influencia de los distintos tipos de entrecruzamiento seleccionados sobre dichas propiedades.

En primer lugar, se determinó que la mayoría de las matrices sintetizadas en este estudio resultaron porosas, y fue posible detectar ciertas diferencias desde el punto de vista cualitativo en cuanto a la morfología y microestructura que originaron los diferentes protocolos de síntesis. Particularmente, la estrategia adoptada en este estudio como forma de realizar un congelamiento semicontrolado, logró influenciar no solo el tamaño y sino la uniformidad de los poros que conforman la microestructura del andamio. De hecho, se pudo establecer que las matrices preparadas sin el DCT presentaron un aspecto mucho más compacto, junto con una menor cantidad de poros e interconectividad de capas, que las matrices congeladas con DCT. A su vez, la microestructura de este tipo de matrices no poseía un balance correcto entre estructuras colagénicas. Por otra parte, el rango de dosis de radiación *gamma* utilizadas generó matrices con diferencias en su microestructura, aunque estas fueron menos evidentes que las resultantes del DCT.

En lo que respecta al tamaño de poros, los resultados indican que varias de las matrices sintetizadas presentaron un tamaño de poro mayormente adecuado para la reparación tisular. Las matrices sintetizadas sin DCT alcanzaron diámetros de poro mayores, con valores más polidispersos y una menor cantidad de éstos se encontraba dentro del rango establecido como óptimo para la reparación tisular, en comparación con las matrices con DCP.

En línea con lo demostrado en otros trabajos, este estudio logró corroborar que la porosidad, la morfología y el tamaño de poro en matrices liofilizadas puede ser determinada mediante el control del congelamiento y la temperatura de congelamiento final de la suspensión CG. De hecho, se determinó que el proceso de congelamiento resulta un factor más preponderante que la radiación *gamma* en cuanto a su influencia en la estructura de la matriz. Consecuentemente, se decidió adoptar el paso del DCT en el protocolo de síntesis de las matrices, por lo que los ensayos de caracterización posteriores se llevaron a cabo en matrices con DCT en su proceso de síntesis.

Dentro de las matrices que sí habían sido congeladas de forma semicontrolada, se determinó que la matriz irradiada con 15 kGy presentó la mejor estructura en términos generales, ya que mostró la mejor proporción entre hebras, agregados de fibras y láminas de colágeno, junto con una buena interconectividad entre las distintas capas. Dicha matriz además fue la que adquirió el tamaño de poro considerado más adecuado para la reparación tisular, es decir, entre 20 y 120  $\mu\text{m}$ .

En relación a las propiedades biomecánicas de los andamios puede constatarse que entre las estrategias de entrecruzamiento evaluadas, la presencia de GAG fue la que ocasionó el impacto más preponderante en las propiedades mecánicas evaluadas. En efecto, la incorporación de GAG en la suspensión de colágeno tuvo un efecto positivo, generando una mejora en dichas propiedades. Por su parte, la radiación *gamma* también dio lugar a andamios con diferentes comportamientos mecánicos, pero estas diferencias no fueron tan abruptas. De hecho, contrariamente a lo reportado en otros estudios, la utilización de la radiación *gamma* como agente de entrecruzamiento no causó un impacto significativamente negativo en las propiedades mecánicas. Al ponderar ambas propiedades biomecánicas, las matrices con GAG e irradiadas con 15 kGy y 25 kGy fueron las matrices que tuvieron mejores resultados. A pesar de que la matriz 25 kGy fue la que adquirió los valores más altos para ambas propiedades, la matriz 15 kGy obtuvo valores de ETM similares a las de 25 kGy y valores de %EM cercanos a los reportados en otros estudios. Por ende, también es razonable considerar que resultarían adecuadas para su utilización como andamios de reposición dérmica.

Por otra parte, los resultados de las propiedades biomecánicas obtenidos en este estudio se encuentran en línea con lo reportado en algunos estudios. No obstante, si bien no se encuentran en un rango similar al de la piel humana, estas diferencias no constituirían un impedimento para su correcta utilización como andamio para la reparación dérmica. Para establecer con certeza si las propiedades biomecánicas de estas matrices son apropiadas, se deberán estudiar *in vivo*, para determinar si logran resistir tanto la manipulación durante la implantación, así como la adherencia al lecho de la herida.

Con respecto a la capacidad de las matrices de resistir a la degradación enzimática, se constató que todas las matrices analizadas mostraron sensibilidad ante la colagenasa, lo cual permite considerar que estas puedan ser degradadas al ser implantadas en el lecho de una herida. Esta sensibilidad a la enzima, se vio disminuida al incluir los distintos agentes de entrecruzamiento en el proceso de síntesis de las matrices. Dicha disminución fue más evidente al agregar el GAG que para la adición de la radiación *gamma*, pese a que se observa una mejoría considerable para las matrices con las dosis de radiación más altas (15 y 25 kGy). Sin embargo, al observar los resultados preliminares del perfil de degradación de las matrices, se indicaría que posee una menor resistencia en comparación a otras matrices similares. En suma, con el fin de determinar de forma más exacta la capacidad de resistencia a la degradación enzimática de la MC, a futuro deberán realizarse ensayos *in vitro* de mayor precisión para determinar la cantidad de colágeno degradado, en conjunto con estudios *in vivo*.

Por su parte, las propiedades térmicas de las matrices también se mostraron ligadas a los tipos de entrecruzamiento seleccionados. Sin bien los valores de las Td obtenidos

mediante DSC observaron valores dentro de un rango acotado, estos se encontraron en línea con lo reportado para matrices previamente hidratadas. Cabe señalar también que los valores de Td obtenidos en el estudio resultaron superiores a 37 °C, siendo esto crucial para resistir a las condiciones fisiológicas en caso de ser implantados en el organismo. Asimismo, y en concordancia con los resultados obtenidos en el resto de los test de caracterización, la presencia de GAG fue el factor más preponderante en la determinación de la estabilidad térmica de las matrices. No obstante, la irradiación *gamma* también ocasionó modificaciones en dichas propiedades, aumentando la estabilidad térmica de las matrices con las dosis más altas evaluadas (15 y 25 kGy).

En definitiva, la evaluación de las distintas propiedades fisicoquímicas de las matrices mostró cierta concordancia entre sí. Primeramente, de entre las modificaciones realizadas al protocolo original puede establecerse que el DCT resultó un cambio significativo que mejoró ampliamente en la estructura de la matriz. Por su parte, al comparar los métodos de entrecruzamiento evaluados, los resultados de la caracterización indican en términos generales que la presencia de GAG constituye el factor más influyente en las propiedades fisicoquímicas de las matrices. De acuerdo a lo esperado, la utilización de dicho componente como agente de entrecruzamiento generó un mejoramiento notorio de las propiedades fisicoquímicas de las matrices. Igualmente, la irradiación también mostró ser capaz de efectuar una mejoría en la mayoría de las propiedades evaluadas, aunque de manera menos marcada que el GAG. Esto ocurrió a diferencia de lo citado en algunos trabajos, y posiblemente sucedió, tal como se menciona anteriormente, a causa de la que irradiación se llevó a cabo en presencia de agua, lo cual resultaría en predominio de la formación de enlaces sobre la escisión de cadenas.

Teniendo en cuenta la totalidad de resultados de la caracterización, y ponderando la importancia de cada uno de los test realizados en los distintos tipos de matrices, se establece que la matriz con GAG e irradiada con 15 kGy sería la mejor opción entre las producidas para desempeñarse como constructo de reposición dérmica. Si bien se observaron pocas diferencias con respecto a la matriz 25 kGy, también cabe señalar que las dosis de irradiación mayores incrementan la posibilidad de que junto con el entrecruzamiento ocurra la fragmentación de enlaces, y en consecuencia, la degradación de la estructura del colágeno. De todas formas, con el fin de optimizar tiempo y dinero, resulta más rentable seleccionar la menor dosis de irradiación entre las que generen las mejores cualidades para el andamio. Conviene subrayar también que, considerando los resultados obtenidos en la caracterización morfológica, y el grado de suma importancia que esta tiene para determinar la funcionalidad de la matriz, la matriz irradiada con 15 kGy resultaría la mejor opción de las disponibles para desempeñarse como constructo de reposición dérmica.

Por este motivo, los estudios mediante FT-IR y Raman confocal, se efectuaron únicamente en la matriz seleccionada (15 kGy) y la matriz con GAG pero sin irradiación *gamma* (0 kGy). Los espectros FT-IR y Raman de las muestras analizadas en este trabajo confirman la composición de los andamios producidos, puesto que se detectaron los picos característicos del colágeno y GAG. Si bien los distintos productos analizados presentaron espectros muy similares, se lograron detectar algunas diferencias. Algunas de esas diferencias espectrales estarían indicando cambios en el modo de deformación y de la estructura secundaria de las proteínas colagénicas. Dichas modificaciones

podrían ser indicadores de entrecruzamiento o de cambios resultantes de la formación de nuevos enlaces. Los resultados obtenidos mediante micro Raman, mostraron diferencias entre la microestructura de las matrices irradiadas y las que no lo estaban, lo cual resulta en concordancia con lo observado en el análisis morfológico mediante SEM. Las diferencias espectrales detectadas en dicho análisis, permitieron divisar posibles modificaciones en la estructura química de las muestras. En suma, estos cambios detectados por las diferencias espectrales entre las muestras podrían estar respaldando el hecho de que la radiación *gamma* de las matrices contribuye al entrecruzamiento de las moléculas, el cual se ve reflejado en cambios conformacionales, formación de nuevos enlaces y/o la reorganización de las fibras de colágeno. Por último, pero no menos importante, corresponde señalar que tanto en el espectro Raman como el IR en las muestras irradiadas, fue posible detectar las señales características relativas a la estructura de colágeno, lo cual estaría sugiriendo que la dosis de radiación de 15 kGy no supone una degradación significativa de la estructura colagénica.

En términos generales, se pudo observar que como consecuencia de la aplicación de las distintas estrategias de entrecruzamiento seleccionadas se obtuvieron matrices con una microestructura más adecuada y homogénea, mejores propiedades biomecánicas, más resistentes a la degradación enzimática y más estables térmicamente, dentro de las condiciones en las que fueron evaluadas. La caracterización fisicoquímica permitió seleccionar la matriz con las propiedades más adecuadas para su potencial uso como andamio de reposición dérmica.

## CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA MATRIZ COLAGÉNICA

### **Generalidades**

Es importante destacar que una adecuada caracterización biológica resulta crucial para determinar si el andamio es compatible con los sistemas en los que se plantea que va a ser utilizado (Mahboob et al., 2014). Esto se debe en parte a que, si bien una de las ventajas de utilizar biomateriales de origen natural es que son similares a materiales que resultan familiares para el organismo (Davis, 2003), no debemos ignorar la posibilidad de producir cierta toxicidad. Esto se debe a que dichos materiales pueden poseer sitios de unión a proteínas específicos u otras señales bioquímicas que pueden desencadenar mecanismos inflamatorios e inmunológicos (Ågren, 2016a). A su vez, algunos biomateriales naturales, como las proteínas, constituyen un excelente medio de cultivo para los microorganismos. Es por esto que, a pesar de que la esterilización puede producir efectos adversos en la estructura o las propiedades del material, es fundamental para evitar su contaminación (Mahboob et al., 2014).

En los capítulos anteriores, se procedió a describir el desarrollo de la matriz colagénica, y el estudio de las propiedades fisicoquímicas que resultaban de los distintos procesos de síntesis, con el fin de determinar cuál de las dichas matrices adquirió las características más adecuadas para ser evaluado como andamio de reposición dérmica. Los resultados obtenidos indicaron que la matriz con propiedades fisicoquímicas más aptas para este fin es aquella sintetizada con GAG y una dosis de radiación *gamma* de 15 kGy (denominada “matriz CG” de aquí en más).

En consecuencia, el presente capítulo tiene el objetivo de evaluar desde el punto de vista biológico dicha matriz seleccionada. Esta caracterización biológica del andamio consistió en determinar la biocompatibilidad e interacción de la matriz con diversos sistemas biológicos, para lo cual se llevaron a cabo distintos ensayos *in vitro* e *in vivo*. Particularmente, los ensayos *in vitro* se efectuaron con el fin de determinar la citotoxicidad del constructo, la adherencia celular y su capacidad como andamio para la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Los ensayos *in vivo* se realizaron como primera aproximación para evaluar la toxicidad del andamio y el comportamiento del mismo en el lecho de la herida.

Los ensayos *in vitro* de este trabajo emplearon las siguientes líneas celulares: BJ (Línea de Fibroblastos de prepucio humano), MS-5 (línea celular estromal de médula ósea de origen murino), NIH-3T3 (Línea de Fibroblastos de origen murino). A su vez, también se utilizaron células obtenidas de cultivo primario, como BMSC (Células estromales mesenquimales de médula ósea obtenidas de donante cadavérico).

### **Aspectos éticos**

Todos los estudios con animales contaron con la aprobación de los respectivos Comité de Ética y Experimentación Animal (Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA). Los ensayos que hicieron uso de células humanas obtenidas de donantes fallecidos contaron con la aprobación del Comité de Ética del INDT y del Hospital de Clínicas.

## Metodología

### Evaluación in vitro

En términos generales, en todos los ensayos de cultivo celular se procedió de la forma que se detalla a continuación. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en los frascos de cultivo con los medios de cultivo y complementos correspondientes (ver más adelante) y propagados hasta alcanzar el 70-80% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron decoladas y cuantificadas para iniciar con los ensayos o bien se procedía al subcultivo o congelamiento de éstas.

### *Estudio de citotoxicidad celular in vitro con extracto de la matriz colágena*

El objetivo de este ensayo fue evaluar la citotoxicidad de la matriz debido al posible desprendimiento de sus propios componentes una vez que se encuentra sumergida en un fluido. Para ello se prepararon extractos de las matrices colagénicas, teniendo como referencia el trabajo de Wessels & Pretorius (2008). De esta manera, se procedió a incubar durante 24 horas a 37°C, fragmentos de la matriz (10 mm X 10 mm) en tubos falcon estériles conteniendo 10 ml del correspondiente medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina (P-S).

La evaluación de la citotoxicidad del extracto se realizó mediante el método de viabilidad celular por MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], empleando 3 líneas celulares: BJ, MS-5 y NIH-3T3. El ensayo colorimétrico MTT determina la capacidad de las células viables de convertir la sal de tetrazolio soluble, a un precipitado insoluble de cristales de formazán (Gerlier & Thomasset, 1986), cuya concentración está en relación con la cantidad de células viables presentes en la muestra analizada.

El proceso del ensayo se detalla a continuación. En primer lugar, las tres líneas celulares (BJ, MS-5 y NIH-3T3) fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pocillo, sembrando una línea celular por placa. Las mismas fueron incubadas por 48 horas (a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>) en su correspondiente medio suplementado con 10% de SFB y 1% de P-S: MEM (Medio esencial mínimo) para la línea BJ, RPMI (Medio Roswell Park Memorial Institute) para la línea MS-5 y DMEM-HG (Medio de Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa) para la línea NIH-3T3. Pasadas las 48 horas de la siembra, el medio de cultivo de las células fue reemplazado por el extracto de la muestra y se incubaron nuevamente durante otras 48 horas. Por otro lado, el grupo control recibió su correspondiente medio suplementado fresco con 10% de SFB y 1% de P-S en vez del extracto de la muestra, y se incubó durante 48 horas.

A continuación, se realizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad de las células sembradas. Para esto, se procedió a remover los medios de cultivo, y se agregó una solución de medio de cultivo conteniendo MTT (concentración final = 0,5 mg/ml) a cada pocillo y se incubó por 3 horas (a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente, la solución fue removida y los cristales de formazán se disolvieron con DMSO (dimetilsulfóxido). Finalmente, la absorbancia de cada pocillo fue medida a 570 nm en un lector de placas. Se determinó la absorbancia promedio de los triplicados de cada tratamiento y se calculó el porcentaje de células viables según la siguiente ecuación empleando los pocillos controles como 100 %, según la siguiente ecuación:

$$A = \left( \frac{OD_T - ODB}{OD_C - ODB} \right) \times 100$$

Siendo (A) el porcentaje de viabilidad celular, (OD<sub>T</sub>) la absorbancia promedio de los pocillos con el tratamiento; (OD<sub>B</sub>) la absorbancia o fluorescencia promedio de blancos; y (OD<sub>C</sub>) la absorbancia o fluorescencia promedio control de crecimiento.

Cabe destacar que dicho ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio del Departamento Básico de Medicina del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” (Montevideo, Uruguay)

#### **Adherencia de células a la matriz**

Con el propósito de evaluar cualitativamente la adherencia de las líneas celulares sobre la MC, se llevó a cabo el ensayo denominado “Live/Dead”. Este estudio consiste en una marcación simultánea de dos sondas fluorescentes: Diacetato de Fluoresceína (FDA) y Ioduro de Propidio (PI). La sonda FDA es deacetilada por esterasas citoplasmáticas dando lugar a un metabolito fluorescente de color verde (fluoresceína) que se acumula dentro de las células viables. Por otra parte, el PI ingresa al núcleo celular atravesando áreas desorganizadas de la membrana celular de células muertas. Una vez allí, se intercala en la doble hebra del ADN emitiendo una fluorescencia de color rojo. Por tanto, este ensayo permite discriminar las células vivas (verdes) de las muertas (rojas) en una misma población (Jones & Senft, 1985; Yokoyama et al., 1997) .

En particular, este ensayo se utilizó para analizar de manera cualitativa la adherencia de las líneas celulares BJ, MS5 y NIH-3T3, sobre la MC. Con este fin, se procedió a cultivar  $5 \times 10^5$  células sobre fragmentos de 15mm x 15mm de la matriz, colocados en placas de cultivo p30 durante 24 horas (a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Pasadas las 24 horas de incubación se procedió a preparar la solución de marcado con las sondas correspondientes ([Tabla 3.1](#)). A continuación, se retiró el medio de cultivo de la placa y se adicionó la solución de marcado, y se dejó incubando durante 5 minutos. Posteriormente, dicha solución fue removida y se lavó con PBS. Finalmente, se adicionaron 3 ml medio de cultivo sin SFB y se analizó mediante microscopio confocal de fluorescencia (Olympus, Modelo: BX61, módulo confocal FV300). La sonda PI se observó con el filtro de Rhodamina utilizando el láser HeNe con excitación a 542 nm, mientras que la sonda FDA se observó mediante un filtro de fluoresceína con láser de argón con excitación a 488 nm. Se tomaron fotografías a un aumento de 40X en 3 campos a distintas profundidades en cada muestra.

**Tabla 3.1: Composición de la Solución de Marcado para el ensayo Live/Dead.** Dicha solución se componía de Diacetato de Fluoresceína (FDA) y Ioduro de Propidio (PI).

Componente	Volumen
Medio de cultivo sin SFB	5 ml
FDA (5mg/ml)	8 µl
PI (2mg/ml)	50 µl

Las células incubadas sobre el fragmento de matriz fueron comparadas con su correspondiente grupo control, es decir, con la misma cantidad de células, pero sembradas directamente en la placa, e incubadas durante 24 horas. Este estudio se

realizó en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, en colaboración con el Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología.

### **Proliferación celular en la matriz colagénica**

La sonda CFSE (diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil) es un marcador celular basado en fluoresceína que penetra fácilmente a través de la membrana plasmática y se fija covalentemente en el interior celular, logrando un marcaje celular fluorescente luego de varios días en un ambiente de cultivo celular y permite evaluar proliferación celular (Quah & Parish, 2010). Al dividirse la célula, el CFSE presente en el citoplasma se reparte con gran fidelidad entre las células hijas, por lo que la intensidad de fluorescencia disminuye en consecuencia a la mitad (Arbós et al., 2013). Debido a que la señal fluorescente disminuye con el número de divisiones celulares que han tenido lugar desde el marcaje, las células que menos emiten son aquellas que más rápido han proliferado. De esta forma, la sonda admite un seguimiento de la proliferación celular permitiendo la identificación de hasta 10 generaciones celulares (Lyons, 2000). Además su fluorescencia es mantenida luego de ser fijadas con formaldehído y/o alcohol, pudiendo ser fácilmente detectada por microscopía fluorescente o por citometría de flujo con filtros compatibles con la detección de la fluoresceína ( $\lambda_{\text{excitación (máx)}}=492 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión (máx)}}=517 \text{ nm}$ ) (Arbós et al., 2013; Lyons, 2000)

En este caso se llevó a cabo el marcado de las células BMSC humanas obtenidas de donante fallecido para evaluar su adherencia a la MC. Las células fueron decoladas y cosechadas en PBS 1X a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ml. A continuación, se adicionó la sonda CFSE (Sigma) a una concentración final de  $10 \mu\text{M} / \text{ml}$  y luego se agitó la suspensión con vórtex. Posteriormente, se incubó dicha suspensión con el CFSE durante 15 minutos en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\% \text{ CO}_2$ . Luego se procedió a centrifugar la suspensión a 1200 rpm durante 5 minutos. Inmediatamente se descartó el



**Fig. 3.1: Cámara Millicell EZ Slide 8 pocillos (Millipore Corporation, 2009).**

Ilustración de la cámara Millicell y su ensamblado

sobrenadante y se incubó el precipitado generado con medio de cultivo completo durante 30 minutos. Nuevamente, se descartó el sobrenadante y se volvió a re suspender el precipitado celular en medio de cultivo completo. En este ensayo, se hizo uso de la cámara de cultivo denominada Millicell® EZ Slide ([Figura 3.1](#)). Dicha cámara

consiste en un portaobjetos de vidrio sobre el cual se coloca una serie de celdas de polipropileno, lo cual da lugar a 8 pocillos de 0,7 cm<sup>2</sup> de área. Dentro de estos pocillos, las células pueden proliferar, fijarse y teñirse; de manera que permiten la observación directa con microscopía sin necesidad de ser trasladadas a otro dispositivo (Millipore Corporation, 2009).

Previo al sembrado de las células, se cortaron fragmentos de la MC de 8 x 2 cm y se colocaron entre el porta-objeto y las celdas de la Millicell® EZ Slide. Luego se procedió a sembrar las BMSC marcadas con CFSE sobre la matriz de colágeno ( $3 \times 10^4$  BMSC por pocillo, cultivándolas durante 6 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, con un cambio de medio completo cada 3 días. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído y observadas con el Microscopio de Fluorescencia (Nikon TiS).

Dicho ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio del Departamento Básico de Medicina del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” (Montevideo, Uruguay)

### *Capacidad de multidiferenciación de las BMSC sobre matrices colagénicas*

Con el fin de determinar si la matriz de colágeno puede oficiar como andamio para que ocurra la diferenciación de las BMSC a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, se llevaron a cabo una serie de experimentos los cuales se detallan a continuación.

En todos los casos las BMSC fueron sembradas sobre la matriz que fue colocada previamente en las Millicell de 8 pocillos ([Figura 3.1](#)). En principio, dichas células fueron incubadas en su medio de cultivo completo no inductor ( $\alpha$ -MEM, SFB, L-Glutamina y P-S) hasta lograr la confluencia deseada, realizando recambios de medio cada 3 días. Una vez alcanzada la confluencia requerida, las BMSC fueron expuestas durante 21 días a distintos medios inductores de la diferenciación a los linajes correspondientes.

#### *Diferenciación al linaje Osteogénico*

En primer lugar, se procedió a sembrar las BMSC sobre las matrices a una densidad de  $4,2 \times 10^3$  BMSC/cm<sup>2</sup>. Las células fueron incubadas en su medio de cultivo completo no inductor hasta llegar al 70% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se expuso a las células al medio inductor de la diferenciación osteogénico ([Tabla 3.2](#)) durante 21 días, realizando cambios de medio cada 3 días. En cambio, los pocillos control negativo recibieron medio de cultivo completo no inductor durante esos 21 días. A su vez, se llevó a cabo también un control del medio de inducción, mediante la siembra de las BMSC directamente en la placa sin la MC.

Una vez finalizado el período de 21 días, las células fueron fijadas. Para ello se procedió a eliminar el medio de cultivo y lavar las células con PBS. A continuación, se añadió en cada pocillo formalina al 10% y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a teñir cada pocillo con una solución del colorante Alizarin Red S (ARS). Por tanto, las células se lavaron 2 veces con agua destilada durante 5 minutos, luego fueron incubadas con una solución de ARS 40 mM durante 4 minutos y después se volvió a lavar 3 veces con agua destilada durante 5 minutos. A su vez, las

células sembradas sobre la matriz fueron contrateñidas con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1 µg/ml) para visualizar los núcleos celulares.

**Tabla 3.2: Composición del Medio Inductor Osteogénico.** (α-MEM: medio mínimo esencial de Eagles alfa; SFB: Suero Fetal Bovino).

Reactivo	Concentración final
α-MEM	89,00%
SFB	10,00%
Penicilina (100 U/ml), Estreptomocina (100 µg/ml )	1,00%
Dexametasona 0,1 mM	0,0001 mM
B-glicerolfosfato 1000 mM	10 mM
Ácido L-Ascórbico 100.000 µM	50 µM

La utilización de esta técnica colorimétrica se fundamenta en la formación de complejos poco solubles y coloreados entre el colorante ARS, y metales en estado iónico como el calcio (Puchtler et al., 1969). Por consiguiente, este colorante es ampliamente utilizado para evidenciar depósitos de dicho mineral en cultivos osteogénicos tiñéndolos de color rojo (Lysdahl et al., 2013).

Por su parte, el DAPI es un marcador específico del ADN que forma un complejo fluorescente al unirse al surco menor de secuencias ricas en adenina y timina del ADN (Kapuscinski, 1995). Por tal motivo, es ampliamente utilizado en la microscopía de fluorescencia para visualizar ADN nuclear, tanto en células vivas como en células fijadas (Tarnowski et al., 1991)

Por último, las células son observadas mediante Microscopía Óptica de campo claro y de epifluorescencia (Olympus CK2) y se compara la coloración rojiza que evidencia la presencia de complejos de calcio en las células inducidas al linaje osteogénico con respecto al grupo control.

#### Diferenciación al linaje Adipogénico

Primeramente, se llevó a cabo el sembrado de las BMSC a una densidad de 21000 BMSC/cm<sup>2</sup>. Dichas células fueron incubadas con medio no inductor hasta alcanzar el 100% de confluencia. A continuación, se reemplazó el medio por el inductor a la diferenciación adipogénica (Tabla 3.3), el cuál fue reemplazado cada 3 días durante 21 días.

Finalizado el período de diferenciación, se removió el medio y se realizaron 2 lavados con PBS. A continuación, se fijaron las células con una solución de formalina 10% v/v en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvieron a realizar 2 lavados con PBS y luego se agrega una solución de saponina (0.2% m/v en PBS), que a su vez contenía las sondas de marcado DAPI y Nile Red (preparado en metanol) a una concentración final de 1 µg/ml en cada caso. Se incubaron las células durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, y luego se efectuaron 3 lavados con PBS.

**Tabla 3.3: Composición del Medio Inductor Adipogénico ( $\alpha$ -MEM: medio mínimo esencial de Eagles alfa).**

Reactivo	Concentración final
$\alpha$ -MEM	89,00%
L-Glutamina 200 mM	2 mM
SFB	17,00%
Penicilina (100 U/ml), Streptomina (100 $\mu$ g/ml )	1,00%
3-Isobutil1-metilxantina (IBMX) 50 mM	0,5 mM
Dexametasona 0,1 mM	0,0005 mM
Indometacina 50 mM	0,05 mM

El Nile red (o rojo nilo, NR) (9-dietilamino5H-benzo [ $\alpha$ ] fenoxazina-5-ona) es un colorante que fluoresce intensamente cuando se encuentra en presencia de solventes orgánicos y lípidos hidrofóbicos. Por este motivo, el NR es comúnmente utilizado para la detección y visualización de gotas intracelulares de lípidos neutros (Fowler & Greenspan, 1985a; Greenspan et al., 1985; Zulian, 2008).

Una vez teñidas, las células fueron observadas mediante Microscopio confocal espectral (Leica modelo TCS SP5 II) perteneciente a la Unidad de Microscopía Confocal de Facultad de Medicina (UdelaR). Para ello, las millicells fueron desensambladas, conservando el portaobjetos con los fragmentos de matrices y las células allí sembradas. Posteriormente, se agregó el medio de montaje (ProLong™ Gold Antifade). La observación de las células se realizó mediante el procedimiento z-stack, en el que se tomaron 20 fotografías cada 1  $\mu$ m en dos canales, usando el láser de 405 nm (para observar en azul la sonda DAPI,) y el láser de 543 nm (para observar en rojo el colorante Nile red).

#### Diferenciación al linaje Condrogénico

En primer lugar, se llevó a cabo la siembra de las BMSC a razón de  $2,86 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> sobre las matrices previamente colocadas en las millicells. Las células fueron incubadas en su medio de cultivo completo no inductor hasta llegar al 70% de confluencia. Alcanzada esta confluencia, las células a inducir fueron incubadas con el medio inductor (Tabla 3.4) durante 21 días con cambios de medio cada 3 días, mientras que las células del grupo control fueron incubadas en medio no inductor ( $\alpha$ -MEM, SFB 15%, P-S 1%).

Al final del período de incubación se procedió a fijar las células. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo correspondiente y se lavó con PBS 2 veces durante 5 minutos en cada caso. A continuación, se adicionó formalina al 10% v/v en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Una vez fijadas, se llevó a cabo la inclusión de las células y la matriz en bloques de parafina. Para ello, se procedió a deshidratar la muestra colocándola en etanol 70% durante 5 minutos, luego en etanol 96% y por último en isopropanol. Posteriormente se coloca la muestra en parafina fundida dentro de una incubadora a 60 °C durante 10

minutos. Después se transfirió la muestra al molde de metal en donde se realizó el bloque de parafina.

Finalizado el bloque, se realizan cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se dejan en plancha a 60 °C durante 15 minutos. Subsiguientemente, los preparados se colocan en Xilol dentro de un coplin durante 15 minutos a 60 °C. Luego se lleva a cabo una rehidratación de los preparados realizando pasajes dobles en isopropanol, luego en etanol 96% y etanol 70%, finalizando con agua destilada. Posteriormente los preparados se tiñen con Azul de Toluidina (AT) durante 5 minutos, luego de los cual son lavadas con agua corriente y deshidratadas nuevamente. Finalmente, los cortes se lavan con Xilol durante 5 minutos y se montan con histomount.

**Tabla 3.4: Composición del Medio Condrogénico.** (DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco; ITS+: suplemento celular general compuesto por una mezcla de insulina, transferrina humana y selenito de sodio; TGB-3: factor de crecimiento transformante beta 3).

Reactivo	Concentración final
DMEM	96%
TGF-b3 100000 ng/ml	10 ng/ml
Dexametasona 0,1 mM	0,0001 mM
Ácido L-ascórbico 100 mM	0,1 mM
Piruvato 100 mM	1 mM
ITS+	10 $\mu\text{l/ml}$
Glutamina	2 mM
Penicilina (100 U/ml), Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$ )	1,00%

El AT es un colorante acidofílico y metacromático que pertenece al grupo de las tiacidas (AlaejoS et al., 1996). Su característica principal es que tiñe selectivamente componentes ácidos de los tejidos, tales como sulfatos y radicales fosfatos (Sridharan & Shankar, 2012). Esta agrupación de los cationes del colorante en sitios del tejido con una alta densidad de grupos aniónicos genera que la longitud de onda máxima de la luz transmitida aumenta, de manera que el color observado es rojo-violáceo en vez de azul (Kumar & Kiernan, 2010). La polimerización del colorante puede ocurrir en distintos grados, se considera que cuanto mayor sea la polimerización del colorante, más fuerte será la metacromasia (Sridharan & Shankar, 2012) ([Tabla 3.5](#)).

**Tabla 3.5: Formas de Metacromasia del Azul de Toluidina**

Tipo	Color	Estructura	Resultado
$\alpha$ -Ortocromático	Azul	Monomérica	Negativo
$\beta$ -Metacromático débil	Violeta	Dimérica y Trimérica	Positivo débil
$\gamma$ -Metacromático fuerte	Rojizo	Polimérica	Positivo fuerte

En este estudio, el AT se utilizó para detectar la presencia de proteoglicanos y glicosaminoglicanos característicos de la matriz cartilaginosa. De esta forma, la observación de la metacromasia violácea en los cortes evidencia la inducción de las BMSC al linaje condrogénico.

### Evaluación preliminar de biocompatibilidad de la matriz en modelo murino

Los estudios *in vivo* efectuados en este trabajo fueron realizados como primera aproximación para determinar tanto la toxicidad del constructo, así como la capacidad de cicatrización de las heridas en las que fue colocado. Con este fin, se llevaron a cabo los ensayos *in vivo* en el Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología del IIBCE, con la previa aprobación del Comité de Ética del Instituto.

Se utilizaron tres ratones CD1 machos adultos con cuatro meses de edad y con peso de aproximadamente 42.5g. Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con una combinación de Ketamina (100mg/kg) y Xilacina (10mg/kg) para realizar el procedimiento. En este experimento se utilizó el modelo de herida por escisión, ya que permite una mejor evaluación de los mecanismos involucrados en la cicatrización, tales como la epitelización, formación del tejido granular y cicatrizal, contracción y angiogénesis (Galiano et al., 2004).

En primer lugar, se procedió a realizar el afeitado del pelo del lomo, para luego marcar las zonas donde se efectuarían las heridas. Se realizaron dos escisiones dermo-epidérmica de 0,6cm de diámetro en el lomo del animal mediante un punch de biopsia. En ambas heridas se le agregó suero fisiológico estéril, y en la herida derecha además se implantó la MC. La herida izquierda sin matriz actúa como control de la cicatrización del individuo. Ambas heridas fueron recubiertas con tegaderm 3M, gasa y cinta, las cuales son cambiadas cada 3 días. A continuación, los animales fueron individualmente colocados en cajas de plástico en un cuarto con temperatura controlada bajo un régimen de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, con libre acceso a agua y comida.

Los animales fueron sacrificados a los 21 días, y se tomaron muestras con un punch 0,6mm de la misma zona donde se habían hecho las heridas iniciales.

La evaluación macroscópica de la cicatrización del animal se realizó mediante el registro fotográfico mediante una cámara digital (COOLPIX P530, Nikon) con los parámetros F/3, 1/40-1/60s. Se realizó una comparación fotográfica del tamaño de las heridas al comienzo del estudio (día 0) y a los días 7, 10, 14 y 21, para lo cual se utilizó el software de análisis de imagen ImageJ (Schneider et al., 2017)

Dicha comparación fue cuantificada por medio del porcentaje de cierre de la herida (%C), la cual se determinó a través del área de las heridas mediante la siguiente ecuación (Wang et al., 2013):

$$\%C = \frac{(\text{Área inicial} - \text{Área día } N)}{\text{Área inicial}} \times 100$$

Por otra parte, se tomaron muestras de las heridas para realizar el análisis histológico de las mismas. Particularmente, dichas muestras fueron fijadas en formaldehído al 3%, para luego ser teñidas con hematoxilina y eosina.

## ***Análisis de datos***

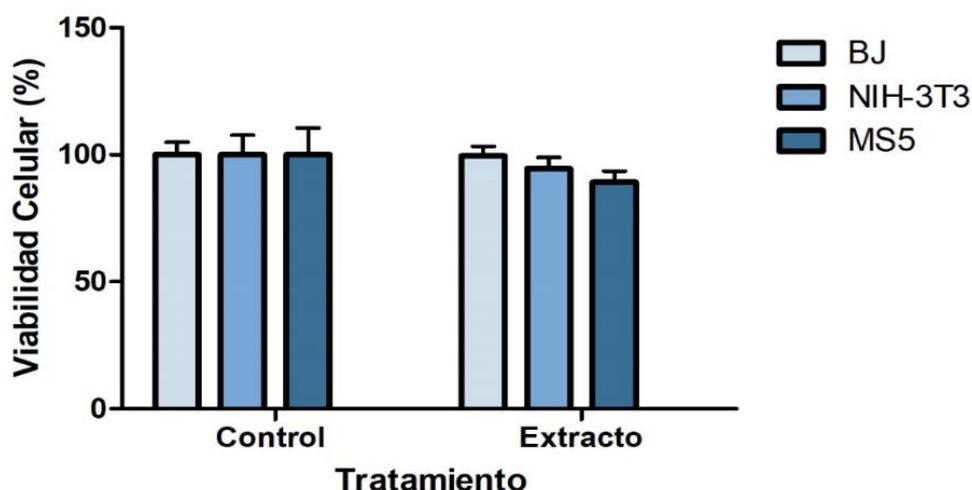
Los gráficos y análisis estadísticos de los distintos ensayos de este capítulo se efectuaron en el programa GraphPad Prism® versión 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). En todos los análisis se utilizó un nivel de significancia estadística de  $p < 0.05$ .

## Resultados y Discusión

### Citotoxicidad de la MC

Los valores promedio de viabilidad de las células expuestas al extracto de la matriz se observan en la [Figura 3.2](#). Todas las líneas celulares mostraron altos valores de viabilidad al ser cultivadas con el extracto de la MC; de hecho, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a su grupo control ( $p < 0.05$ ). En particular, la línea celular BJ fue en la que se observó el valor más alto de viabilidad celular (99.52%). Las NIH-3T3 por su parte, adquirieron valores de citotoxicidad de 94.56%, mientras que las MS5 fueron las que obtuvieron la viabilidad más baja de las células evaluadas (89.19%).

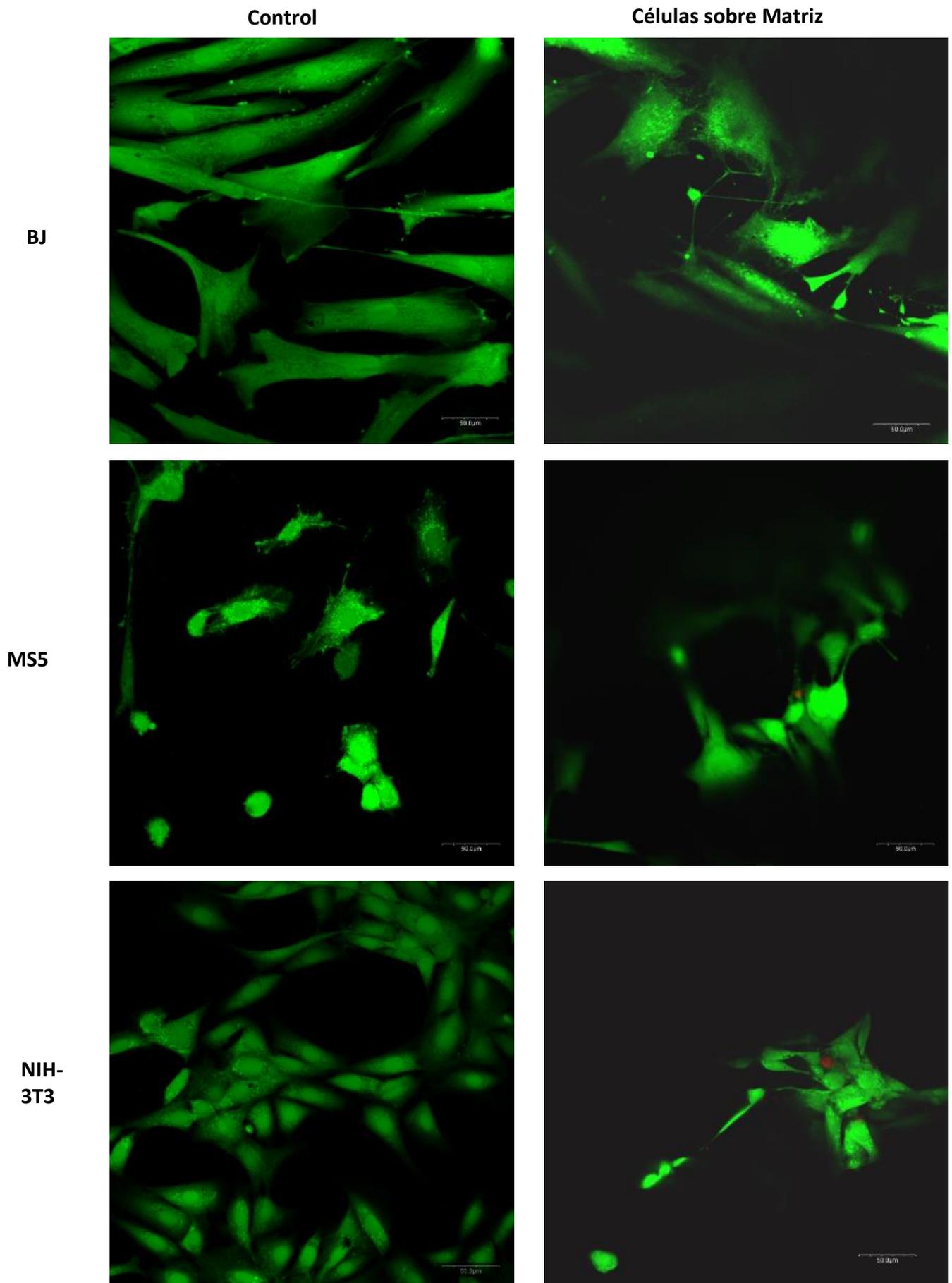
Los altos valores de viabilidad obtenidos indican que los extractos de las matrices no resultaron citotóxicos para las líneas celulares evaluadas. Por lo tanto, es posible establecer que, para los distintos grupos celulares evaluados, no se generó un desprendimiento de componentes tóxicos cuando la matriz celular interacciona con los respectivos medios de cultivo. Dichos resultados se correlacionan con los obtenidos en el trabajo de Wessels & Pretorius (2008).



**Fig. 3.2: Viabilidad celular de las líneas BJ, MS5 y NIH-3T3.** Todas las células fueron incubadas con el extracto de la matriz (derecha) o en ausencia de la matriz con su correspondiente medio de cultivo como control (izquierda).

### Adherencia de células a la matriz

En el estudio realizado mediante ensayo de Live/Dead se observó que todas las líneas celulares evaluadas lograron adherirse a la membrana colagénica ([Figura 3.3](#)). A su vez, se detectó que dichas células también lograron penetrar a distintas profundidades de la matriz en los planos observados. Además, estas células mostraban una morfología



**Fig.3.3: Estudio con microscopía confocal del cultivo de líneas celulares con y sin matriz colagénica.** Imágenes obtenidas con microscopía confocal de las líneas celulares BJ, MS5 y NIH-3T3 marcadas con FDA (verde) e IP (rojo) incubadas durante 24 horas sobre un fragmento de membrana o directamente en la placa de cultivo (Control). La barra equivale a 50,0 µm.

similar a la de su respectivo control (células sembradas directamente en la placa).

Por otro lado, en todas las líneas celulares se detectó una menor cantidad de células adheridas a la matriz en comparación a su correspondiente grupo control. Dicho resultado podría ser una consecuencia de las propias condiciones del experimento. Esto se debe a que la placa sobre la que se colocó el trozo de matriz es especialmente tratada para conseguir la adherencia celular, por tanto, existe la posibilidad de que las células hayan migrado de la matriz a la placa o también haber sido arrastradas al agregar el medio de cultivo sobre la matriz. Además, cabe destacar que como la MC constituye una estructura tridimensional, las células tienen una mayor superficie sobre la cual distribuirse, y esto podría dificultar la detección de las células en un solo plano. En consecuencia, se detecta una menor cantidad de células que cuando estas se encuentran sembradas en 2 dimensiones sobre un plástico tratado.

Por otra parte, si bien en algunas líneas se pueden observar células marcadas por IP al ser cultivadas sobre la matriz, la amplia mayoría de las células se encuentra marcada con FDA, lo cual indica una buena viabilidad de las mismas al adherirse a constructo evaluado. En efecto, tal como se mencionó anteriormente, la tridimensionalidad de la matriz genera que tome más tiempo localizar las células sobre la matriz que sobre la placa. Estas diferencias en el tiempo de exposición durante el análisis, pudieron impactar sobre la interpretación de la viabilidad de las células (Boyd et al., 2008). Esto puede deberse a que con el correr del tiempo las células empiezan a morir por no estar expuestas a las condiciones de cultivo requeridas para su correcta supervivencia (temperatura, humedad y atmósfera de CO<sub>2</sub>). Dichas diferencias en los parámetros de la detección y obtención de la imagen pueden generar un incremento de la permeabilidad celular a ambos colorantes, provocando el marcado conjunto tanto de células vivas, apoptóticas y muertas (Boyd et al., 2008).

Por último, es importante destacar que, si bien este estudio tuvo un carácter cualitativo, en todas las líneas celulares evaluadas se percibieron células adheridas a la membrana con una morfología y prolongaciones considerables. Esto se encuentra en concordancia con estudios que demuestran que el colágeno como sustrato contribuye con el mantenimiento de la morfología y fenotipo adecuado de las células (Balasubramani et al., 2001). De hecho, es de amplio conocimiento que las interacciones mecánicas entre células y la matriz extracelular pueden influenciar y controlar el comportamiento y funcionalidad celular (Khalili & Ahmad, 2015). Por consiguiente, la adhesión de las células a su sustrato resulta esencial para la comunicación y regulación celular, y es de fundamental importancia en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos (Khalili & Ahmad, 2015). En suma, el hecho de que las líneas celulares evaluadas hayan podido adherirse correctamente a esta MC permite considerar que la misma puede constituir un andamiaje adecuado para su supervivencia y proliferación. Futuros estudios deberían incluir una cuantificación de las células observadas para obtener resultados más precisos.

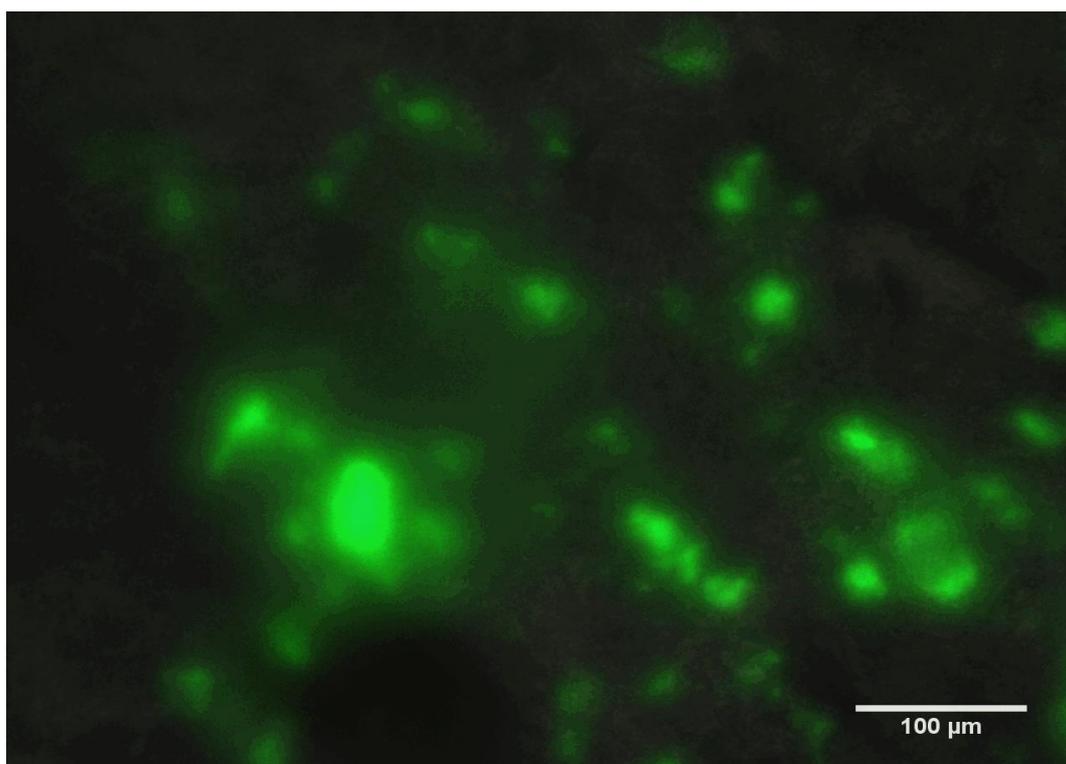
#### *Proliferación celular en la matriz colagénica*

Primeramente, es importante destacar que se logró determinar presencia de BMSC fluorescentes al final del ensayo ([Figura 3.4](#)). Este hecho sugiere que las células lograron sobrevivir y adherirse a la membrana durante el tiempo del estudio. A su vez, también fue posible detectar una disminución de la intensidad de fluorescencia observada en las

BMSC al final del ensayo. Teniendo en cuenta la técnica utilizada, sería posible considerar que dicha disminución fuese resultado de la proliferación de las células marcadas con CFSE al inicio del estudio. De hecho, la literatura establece que el tiempo de duplicación poblacional de las BMSC es aproximadamente 34,2 horas (Ren et al., 2015), de manera que dicha población sembrada sobre la matriz podría haberse dividido hasta 4 veces durante el ensayo, lo cual estaría en concordancia con la disminución en la intensidad de fluorescencia. No obstante, la tridimensionalidad de la propia matriz, que le otorga a las células una mayor superficie sobre la cual distribuirse, también podría haber influenciado en la intensidad de fluorescencia percibida.

De todas formas, este estudio tuvo un enfoque cualitativo sobre la adherencia y proliferación de las BMSC cultivadas sobre la MC. Para evaluar cuantitativamente la proliferación de estas células sobre la matriz, sería necesario despegar las células de la matriz y analizar la disminución secuencial de la fluorescencia mediante citometría de flujo y así monitorear la progresión de las divisiones celulares (Arbós et al., 2013).

Los andamios compuestos de colágeno tipo I juegan un papel importante en el control de la diferenciación de las BMSC en los distintos tipos celulares al transducir señales vía integrinas (Leitinger & Hohenester, 2007) y mediante señalizaciones mecánicas (Engler et al., 2006; Takitoh et al., 2014). Por este motivo, una vez que se logró observar la sobrevida, adherencia y proliferación de las BMSC en la matriz estudiada, se procedió a determinar si éstas lograban diferenciarse a los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico al cultivarse sobre este constructo.



**Fig. 3.4: Micrografía resultante de la tinción de las BMSC con CFSE (verde) que fueron sembradas sobre la matriz de colágeno y cultivadas durante 6 días. CFSE (diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil). Barra: 100  $\mu$ m**

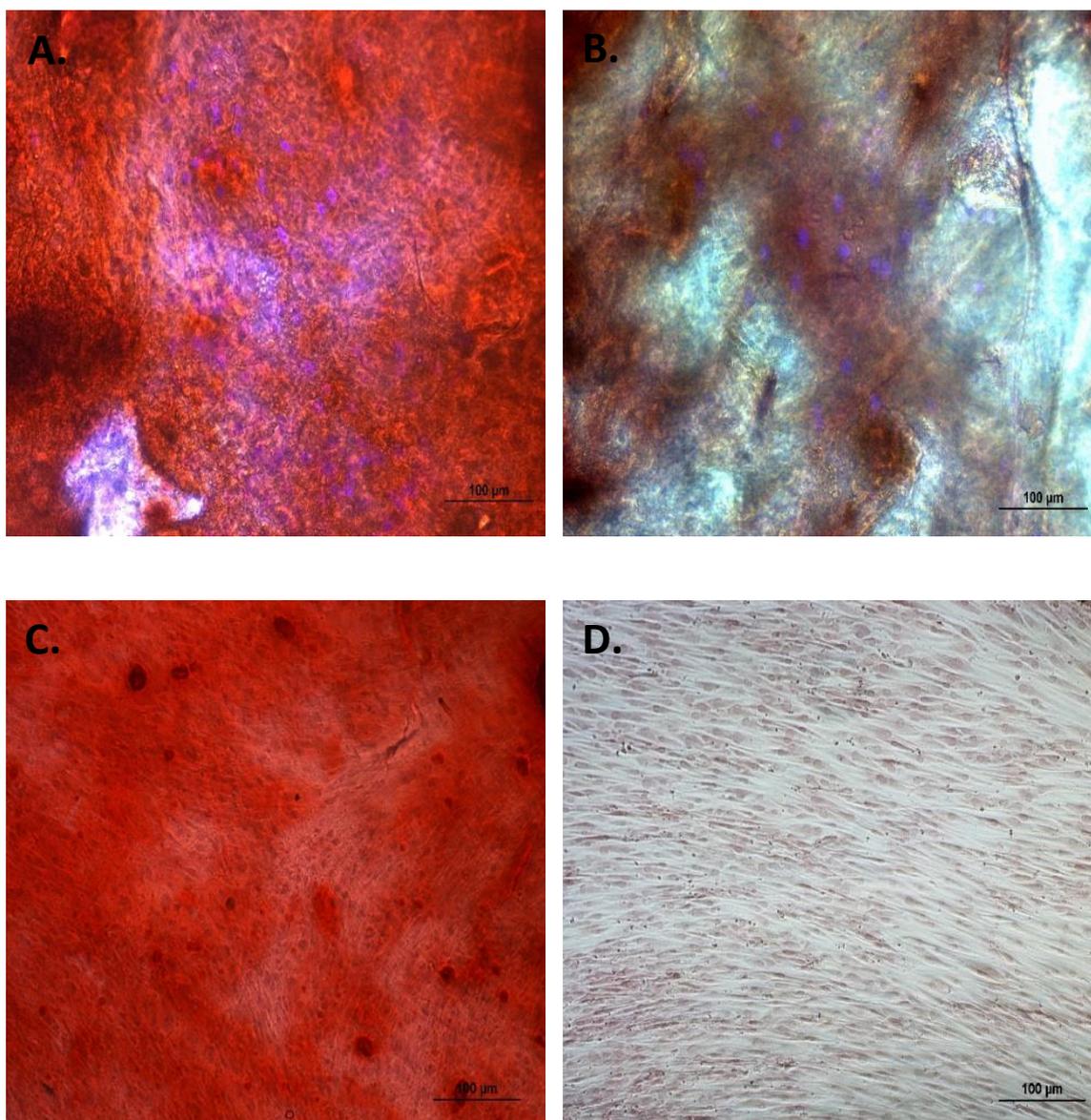
#### *Capacidad de multidiferenciación de las BMSC sobre matrices colagénicas*

La tinción con ARS reveló diferencias notorias a simple vista entre los distintos grupos de estudio. En primer lugar, al observar la [Figura 3.5](#) puede advertirse que los grupos tratados con el medio de cultivo osteogénico presentaron una coloración rojiza. Contrariamente, el grupo que no había sido tratado con estímulos diferenciadores no evidenció la presencia de dicha coloración, sino que apenas se observó una tinción mínima basal. Esta tinción histológica se basa en la capacidad del ARS en marcar los depósitos de calcio, y su aparición es considerada una expresión de la deposición de la matriz ósea (Donzelli et al., 2007; Gregory et al., 2004). Por lo tanto, teniendo en cuenta que las BMSC tratadas con el medio inductor observaron la coloración característica de los depósitos de calcio, podría establecerse que dichas células lograron diferenciarse al linaje osteogénico. A su vez, el hecho de que las BMSC tratadas con estímulos diferenciadores pero sembradas en distintas condiciones (directamente en la placa Vs sobre la MC) lograran diferenciarse al linaje osteogénico, es un indicador de que el medio diferenciador fue efectivo, y que las células se encontraban aptas para realizar dicho proceso. En definitiva, para el fin de este trabajo, dicho ensayo indicaría que la MC colagénica permite la diferenciación de las BMSC expuestas al medio diferenciador al linaje osteogénico.

Si bien esta técnica es la que habitualmente se utiliza para demostrar diferenciación osteogénica, a futuro se podrían adicionar ensayos de detección de marcadores

osteogénicos específicos para corroborar de forma más objetiva esta diferenciación. Algunos ejemplos de estos estudios pueden ser la detección de cambios de la actividad de la fosfatasa alcalina, o también la expresión de ciertas proteínas específicas, como la osteopontina y osteocalcina.

Por último, cabe mencionar que la tinción con DAPI facilitó en gran medida la localización de las BMSC sembradas sobre el matiz, logrando observarlas incluso entre los depósitos de calcio. Sin embargo, con el fin de optimizar recursos, no se realizó la doble tinción con DAPI en las células que se sembraron directamente sobre la placa porque eran fácilmente identificadas mediante microscopía.

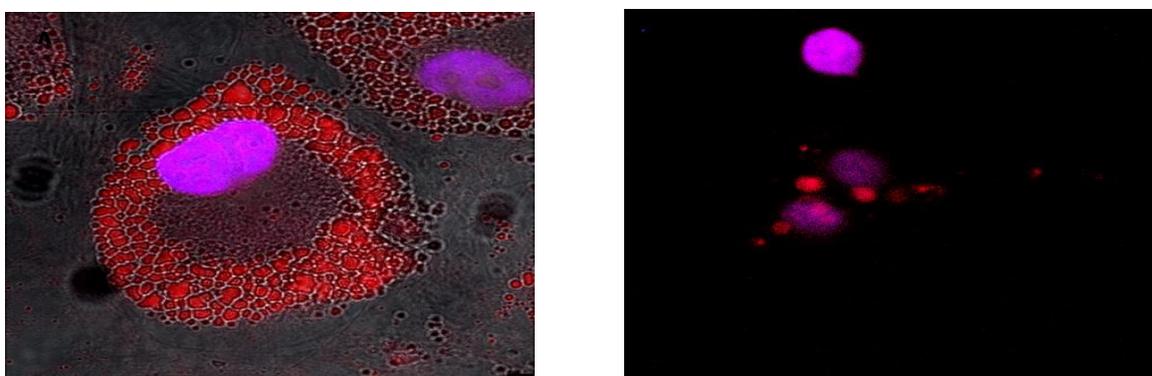


**Fig. 3.5: Diferenciación osteogénica de BMSC.** Micrografías resultantes del marcado con Alizarin Red S de BMSC cultivadas sobre la matriz colagénica (A & B) o directamente sobre la placa de cultivo (C & D) durante 21 días con medio osteogénico (A & C) o no inductor (B & D). Las BMSC sembradas sobre la matriz colagénica (A & B) fueron contrateñidas con DAPI dejando evidenciados sus núcleos de color azul. Barra: 100 µm.

En lo que respecta al ensayo para evaluar la diferenciación al linaje adipogénico, las imágenes resultantes ([Figura 3.6](#)) permitieron divisar estructuras globulares con el tamaño y la localización adecuadas como para ser consideradas gotas lipídicas. En efecto, se observó la presencia de estructuras fluorescentes globulares de hasta aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  ubicadas en el citoplasma de las células de forma perinuclear, todo lo cual indica que dichas estructuras constituyen las gotas intracelulares de lípidos neutros (Fowler & Greenspan, 1985a; Makrantonaki & Zouboulis, 2007). Por lo tanto, la presencia de estas gotas lipídicas estaría indicando que las BMSC lograron diferenciarse al linaje adipogénico al haber sido expuestas al medio inductor correspondiente.

Por otra parte, caber destacar que si bien el NR es una prueba ideal para la detección de lípidos, siendo comúnmente utilizado para la detección y visualización de gotas intracelulares de lípidos neutros, también puede llegar a detectar algunos lípidos de membranas intracelulares (Fowler & Greenspan, 1985a; Greenspan et al., 1985; Zulian, 2008). Con el fin de minimizar la interacción de la sonda con dichas membranas microsomales, en este estudio se analizaron las muestras con NR a longitudes de onda <570 nm. Bajo estas condiciones espectrales la fluorescencia de NR en presencia de membranas microsomales es un décimo observada para las lipoproteínas encontradas en los núcleos hidrofóbicos de los lípidos (Fowler & Greenspan, 1985b). Los resultados de este ensayo concuerdan con lo esperado ya que en las imágenes obtenidas no se detectaron estructuras membranosas marcadas con NR ([Figura 3.6](#)). Estos datos evidencian que la MC permite la diferenciación adipogénica de las BMSC bajo las condiciones evaluadas.

Por otra parte, las imágenes resultantes parecerían mostrar una diferencia entre la proporción de gotas lipídicas detectadas entre las células sembradas directamente sobre la placa y las sembradas sobre la matriz. Esto podría adjudicarse, al igual que en los ensayos anteriores, a que las células sembradas sobre la matriz se distribuyen en ella de manera tridimensional. Consecuentemente, la observación con el microscopio confocal de las gotas lipídicas resulta más dificultosa y menos evidente que en las células



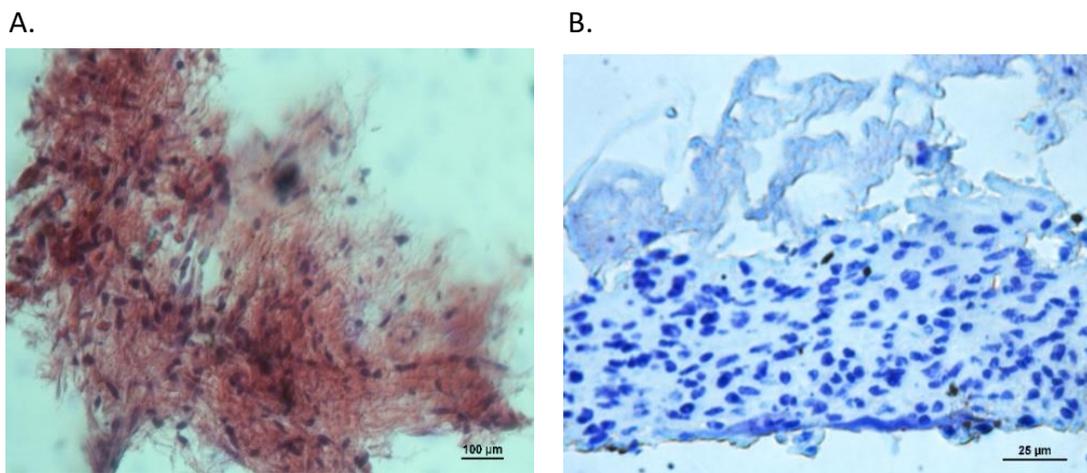
**Fig. 3.6: Diferenciación adipogénica de BMSC con y sin matriz colagénica.** Resultado de la diferenciación a adipocitos de las BMSC sembradas directo sobre la placa (A.) y sobre la matriz (B.). Se observan las gotas lipídicas marcadas en rojo con la sonda Nile red (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y los núcleos celulares marcados de color violáceo con la sonda DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las barras de referencia corresponden a 5  $\mu\text{m}$  en la Figura A y a 10  $\mu\text{m}$  en la figura B.

sembradas directamente en la placa. De todas formas, fue posible divisar dichas gotas en las condiciones de estudio.

Por otro lado, también es importante destacar que no se detectó una autofluorescencia significativa en las muestras evaluadas, a pesar de que en las condiciones espectrales utilizadas era posible que la sonda generase una tinción residual del citoplasma (Greenspan et al., 1985).

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo que evaluó la diferenciación al linaje condrogénico ([Figura 3.7](#)), se encontró que las muestras inducidas al linaje condrogénico mostraron un cambio de coloración del tipo Y-Metacromático fuerte, ya que se detectó una tinción rojiza de la matriz (Kumar & Kiernan, 2010). Tal como se describe anteriormente, el AT es un colorante básico metacromático que tiñe los proteoglicanos de la MEC cartilaginosa de color rojizo-violeta. Por ende, el hecho de haber detectado dicho cambio metacromático estaría indicando que en esas muestras se encuentran presentes sustancias cromóforas como los glicosaminoglicanos (Calvo, 2014).

Por otro lado, las muestras control que no fueron sometidas al medio inductor resultaron negativas al cambio en la coloración, ya que se observan de color azul. Este resultado permitió demostrar que, aunque la MC contiene en su composición condroitín sulfato, este no logró generar metacromasia cuando fue teñida con AT. Seguramente esto se debió a que la cantidad de condroitín sulfato es solo un 8% (m/m) del total, por lo que los grupos aniónicos presentes en la matriz no fueron suficientes para generar un cambio en la posición de las bandas espectrales del espectro de transmisión, de manera que no se produjo un cambio en la coloración (Sridharan & Shankar, 2012).



**Fig. 3.7: Micrografías resultantes del ensayo de diferenciación condrogénica.** Se observa la tinción con Azul de Toluidina de matrices colagénicas con células estromales mesenquimales cultivadas durante 21 días con medio condrogénico (A.) y no inductor (B.). Barra imagen (A.): 100 μm; Barra imagen (B.): 25 μm

En síntesis, la detección de la metacromasia en las matrices demuestra que las BMSC allí sembradas fueron efectivamente inducidas al linaje condrogénico. Esto se explica debido a que células inducidas a condrocitos poseen la capacidad de producir los componentes de la MEC cartilaginosa (Xu et al., 2016) entre los que se encuentran los GAG, que son los encargados de generar la metacromasia del colorante AT.

En suma, estos resultados muestran que la matriz permite la diferenciación de las BMSC en los tres linajes característicos. Esto refuerza los resultados anteriores, ya que para que ocurra la diferenciación es necesario que las células sobrevivan, adhieran y proliferen. Con estas consideraciones, es posible pensar que la MC es adecuada para permitir que las células cumplan funciones biológicas relevantes y tenga potencial para ser utilizada como andamio para diferentes aplicaciones biomédicas, como por ejemplo, la reparación de cartílago y hueso. De hecho, algunos procedimientos clínicos de la actualidad para la reconstrucción de cartílago incluyen la utilización de MC tridimensionales biodegradables que contienen físicamente a las células y se aplican en los sitios a reparar, para proveer un soporte temporario similar a la matriz cartilaginosa y promover la reparación del tejido (Johnstone et al., 2013).

#### ***Evaluación preliminar de biocompatibilidad de la matriz en modelo murino***

El presente ensayo *in vivo* tuvo carácter preliminar y fue realizado como una aproximación para estudiar la interacción de la MC con el lecho de una herida. De hecho, el objetivo principal de este ensayo fue obtener indicios de cómo sería la performance del andamio *in vivo*. Por este motivo, se utilizaron pocos animales y se focalizaron esfuerzos en realizar una evaluación cualitativa del estado de los animales y de las heridas, más que en determinar si el constructo genera o no, una mejora en la cicatrización del animal. A su vez, también se buscó evaluar la performance de la matriz en el lecho de la herida, es decir, su adherencia, resistencia a la degradación y desprendimiento de la bicapa de silicona.

En primer lugar, es importante mencionar que todos los animales sobrevivieron al estudio y ninguno mostró señales de infección a causa del tratamiento que le fue realizado. A su vez, todas las heridas cerraron completamente al día 21, lo cual concuerda con lo esperado (Wang et al., 2013). Sin embargo, se observó que algunos ratones se auto-infligieron algunas heridas alrededor de las zonas de estudio al intentar quitarse el vendaje, y si bien la cicatrización de dichas zonas no se vio comprometida, pudo haberse generado cierta inflamación en la zona que rodea las escisiones.

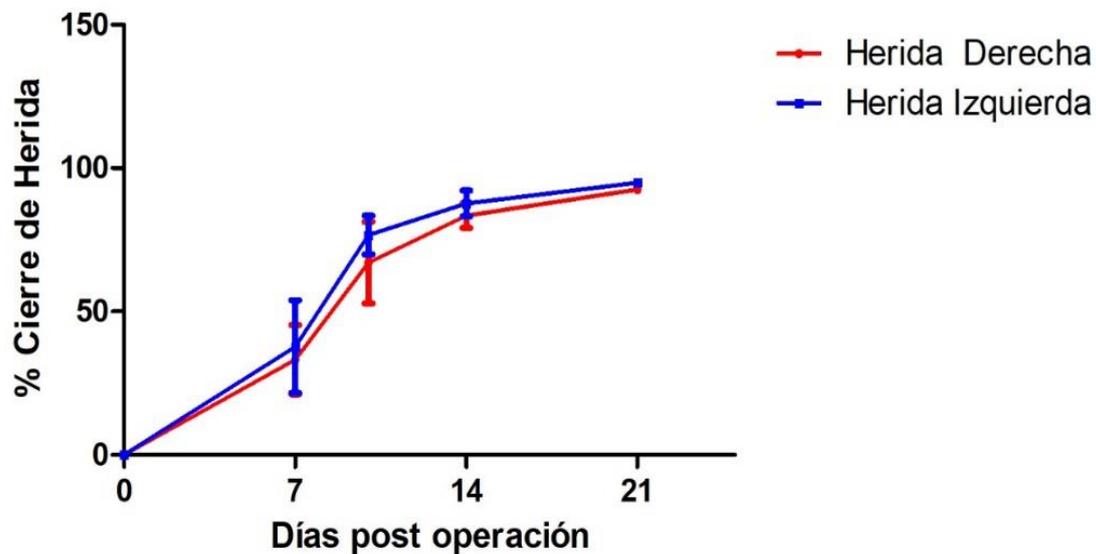
En la [Figura 3.8](#) se ejemplifica la evolución de los animales estudiados desde el día de la operación (día 0) hasta el día 21. En algunos animales se advirtió que las heridas habían cerrado casi completamente en el día 16 dificultando su correcta visualización fotográfica. En efecto, el análisis macroscópico de la superficie de la herida durante el proceso de cicatrización mostró una evolución normal. A su vez, no se observaron signos macroscópicos de reacciones de cuerpo extraño, trastorno en la cicatrización, formación de cicatriz hipertrófica o reacción inflamatoria en las heridas (Rahmanian-Schwarz et al., 2014).

Conjuntamente, cabe destacar que la matriz logró adherirse correctamente al lecho de las heridas, lo cual constituye un requerimiento crucial para los materiales de recubrimiento dérmico (Azad et al., 2004). Además, fue posible manipular fácilmente el andamio con las herramientas adecuadas, logrando una rápida adherencia al momento de ser implantado en la herida. Particularmente, en el control realizado en el día 7 postoperatorio se percibió que, si bien la matriz se encuentra presente en la herida, la misma posee signos de degradación. Al mismo tiempo, se detectó que la silicona se había desprendido de la matriz de colágeno, la cual se encontraba adherida al lecho de la herida. Sin embargo, en los controles realizados a partir del día 10 en adelante, la matriz no se observa a simple vista (ni en la herida ni en el vendaje), lo cual podría deberse a que ya se encuentra cubierta por la costra de la herida o a que pudo haberse degradado completamente debido a las enzimas que se encuentran naturalmente en el lecho de la herida. Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados del test de degradación enzimática junto con lo observado en el test *in vivo*, podría establecerse que la matriz duraría entre 7 y 10 días en el lecho de la herida. Esto resultaría menor a lo esperado y reportado por otros autores (Wessels, 2007; Yannas et al., 2010), por lo que se deberán considerar alternativas para incrementar la resistencia enzimática, como la combinación con polímeros sintéticos.

Por su parte, el análisis morfométrico a partir del registro fotográfico no reveló diferencias estadísticamente significativas entre la herida control (izquierda) y la tratada con la MC (derecha) ([Figura 3.8](#)), sino que ambas heridas mostraron un comportamiento similar en cuanto a la evolución de su contracción durante el período de estudio. Además, el análisis muestra que a los 10 días de realizada la lesión, el %C superó el 50% tanto en la herida control como en la que contenía la MC.

Con respecto al análisis microscópico, en este estudio se pretendía evaluar el tejido granular resultante a los 21 días de la escisión con y sin matriz. Particularmente, se buscaba analizar la cantidad y distribución de los fibroblastos, vasos sanguíneos y fibras colagénicas para determinar si el proceso de cicatrización había ocurrido de forma normal (Wang et al., 2013). Sin embargo, lamentablemente el análisis histológico de las muestras no se pudo llevar a cabo debido a dificultades técnicas durante el proceso de preparación de la muestra. Dicha situación comprometió el análisis de los resultados del estudio ya que la calidad de la composición celular del tejido de granulación podría haber proporcionado una información más precisa de la dinámica de reparación del tejido, que la propia información morfométrica (Gerharz et al., 2007).

Para este estudio *in vivo*, se optó por el modelo de herida por escisión en ratones debido a que era el mejor se adaptaba a la disponibilidad de los recursos del laboratorio (Laboratorio De Señalización Celular y Nanobiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable). En estos modelos por escisión, la cicatrización ocurre desde los márgenes de la herida, lo cual permite una amplia evaluación de los mecanismos involucrados en la cicatrización, incluyendo la reepitelización, formación del tejido granular y cicatrizal, contracción y angiogénesis (Galiano et al., 2004). Pese a esto, es importante subrayar que dicho modelo posee marcadas limitaciones debido a las diferencias en las características de la cicatrización cutánea entre ratones y humanos (Galiano et al., 2004). Los ratones tienen una piel móvil y el cierre de la herida se produce mayormente debido a la contracción del tejido; mientras que los humanos poseen la



**Fig. 3.8: Evolución de las heridas con y sin matriz colagénica.** Resultados obtenidos de los ensayos preliminares en ratones CD1, a los que se les efectuaron 2 escisiones dorsales. A la herida derecha se le adicionó una matriz de colágeno y la herida izquierda fue utilizada como control. Se observa un ejemplo del registro fotográfico que evidencia la evolución de las escisiones realizadas en los animales al inicio del estudio (día 0), y a los días 7, 10, 14 y 21. La gráfica muestra la progresión del cierre de las heridas izquierda y derecha durante los mismos días. No se observan diferencias estadísticas entre ambos tipos de heridas en el transcurso del experimento ( $p > 0.05$ )

piel unida al tejido subcutáneo, y las heridas cicatrizan mediante la generación de tejido nuevo (Orgill & Blanco, 2009; Wang et al., 2013). Otra de las limitaciones del modelo es que la contracción de la piel que rodea la herida se ve afectada por varios factores, como la postura, la movilidad del animal, e incluso los vendajes que se coloquen sobre ella, todo lo cual genera una variabilidad importante en el cierre de la herida (Wang et al., 2013). Por consiguiente, las limitaciones del modelo utilizado, hacen necesario la repetición de los ensayos *in vivo*, utilizando un modelo de cicatrización de heridas distinto, que produzca resultados reproducibles y más adecuados para evaluar la aplicación de la matriz desarrollada. A modo de ejemplo, se podrían utilizar sujetos de estudio que posean un mecanismo de cicatrización más similar a los humanos, tales como conejos o cerdos. En caso de volver a utilizar roedores, se les podría adicionar una férula en forma de anillo que se adhiere a la piel alrededor de la herida y evita que la misma cierre por contracción, permitiendo así que la herida cicatrice por granulación y reepitelización (Wang et al., 2013). Por último, el objetivo de utilizar modelos animales de cicatrización es para replicar la fisiología humana y poder predecir resultados terapéuticos (Galiano et al., 2004). Sin embargo, muchas veces el modelo animal

seleccionado es el que se tiene disponible, lo cual no siempre resulta el más adecuado para los fines del experimento (Ansell et al., 2012).

De todas formas, corresponde señalar nuevamente que este estudio *in vivo* fue de carácter preliminar, en el que se utilizó un tamaño de muestra muy pequeño y el modelo experimental no fue el ideal. A futuro deberemos evaluar un mejor modelo con un número mayor de animales para poder evaluar correctamente el comportamiento de la MC *in vivo*.

## Conclusiones

El objetivo principal de realizar la caracterización biológica de la MC fue determinar su biocompatibilidad con diferentes sistemas biológicos que estuvieran presentes en la piel y/o relacionadas con el proceso de cicatrización. Los resultados de este trabajo permitieron inferir información sobre la toxicidad de la matriz, la sobrevida, adherencia y diferenciación celular, además de establecer una primera aproximación a la biocompatibilidad del producto en un organismo vivo. Por otro lado, es necesario subrayar que ciertas características fisicoquímicas de la matriz, tales como la tridimensionalidad y enmallado, dificultaron la realización de algunos ensayos de caracterización biológica. Consecuentemente, algunos de estos ensayos deberían ser repetidos utilizando otras estrategias de abordaje.

Con respecto a los ensayos de toxicidad, se pudo observar que la MC no resultó citotóxica puesto que no generó un desprendimiento de componentes perjudiciales al interactuar con las respectivas líneas celulares evaluadas.

Por otra parte, todas las líneas celulares evaluadas lograron adherirse a la membrana, y a su vez, penetrar a distintas profundidades de esta. Específicamente, los ensayos con CFSE sugieren que las BMSC pudieron no solo adherirse sino también proliferar sobre la matriz durante la duración del estudio. Consecuentemente, esto permitió considerar que la MC podía constituir un andamiaje adecuado para su proliferación y diferenciación.

En lo que concierne a los ensayos de multidiferenciación de las BMSC, en base a los resultados obtenidos podría establecerse que dichas células lograron diferenciarse al linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. Por lo tanto, las BMSC lograron proliferar y mantener como población celular su carácter multipotencial, lo cual resulta particularmente útil ya que estas células son capaces de promover la cicatrización de heridas mediante la liberación de factores inmunomoduladores y proangiogénicos. En consecuencia, es posible inferir que el andamio evaluado sería apto como apósito acelular para la reposición dérmica sobre el que las células logran adherirse y proliferar. Asimismo, al poseer buena compatibilidad con las BMSC, sería posible que a futuro se pudieran adicionar dichas células a la MC, con el fin de mejorar aún más el proceso de cicatrización aprovechando las propiedades de dichas células.

A partir de los ensayos preliminares *in vivo* se puede concluir que, si bien este estudio seleccionado no fue el más adecuado sino el que se tenía disponible, el mismo permitió demostrar que el apósito mostró una buena compatibilidad en los animales de estudio. Esto se debe a que todos sobrevivieron al ensayo, toleraron el implante y no mostraron señales de infección a causa del tratamiento que les fue realizado. También es

importante destacar que se pudo apreciar la adherencia de la MC al lecho de las heridas, pudiendo además desprenderse de la capa de silicona, lo que resulta indispensable para el correcto funcionamiento de estos biomateriales. De todas formas, resulta imperioso efectuar nuevos estudios *in vivo* utilizando modelos adecuados y más similares al proceso de cicatrización humana, focalizando esfuerzos en análisis histológicos que proporcionen más información acerca de los efectos que produce la MC sobre la herida.

## CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de los sustitutos dérmicos mediante la aplicación conjunta de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa ha crecido enormemente en los últimos años. De hecho, los productos análogos de la matriz extracelular dérmica se han vuelto un recurso invaluable para el tratamiento de heridas, sobre todo en las de gran porte. Sin embargo, en Uruguay el acceso a este tipo de productos suele estar limitado, entre otros motivos, por sus altos costos. Por este motivo, el presente trabajo buscó perfeccionar el desarrollo de una matriz a partir de materias primas nacionales, que posea características fisicoquímicas y biológicas adecuadas para ser utilizado como andamio para reposición dérmica.

Con este fin, este trabajo logró avanzar en el conocimiento y *know-how* sobre la elaboración y caracterización de este tipo de biomateriales, en base a lo previamente iniciado por investigadores del Centro NanoMat y de DETEMA (Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR). Para ello, se efectuaron ciertas modificaciones en base a lo sugerido por la literatura actual con el fin de producir una matriz como sustituto dérmico con características análogas a la MEC. Dichas modificaciones incluyeron a grandes rasgos: la adición de un descenso térmico semicontrolado al momento de congelar la suspensión CG y la utilización de la radiación *gamma* en presencia de agua, como agente de entrecruzamiento. Como resultado, se obtuvieron distintas matrices las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente, logrando describir y comparar sus propiedades, y permitiendo a su vez, establecer la influencia de dichas modificaciones sobre estas propiedades.

En particular, los resultados de la caracterización mostraron que fue posible sintetizar matrices porosas a partir de Col 1, extraído con el protocolo presentado en este estudio, y que estas tuvieran propiedades fisicoquímicas que la hacían potencialmente aptas como sustituto dérmico. La caracterización permitió establecer que la incorporación del DCT y a las distintas estrategias de entrecruzamiento generaron una mejoría considerable en la estructura de la matriz. La comparación entre los métodos de entrecruzamiento evaluados, en términos generales, logró mostrar que la presencia de GAG constituye el factor más influyente sobre las propiedades fisicoquímicas de las matrices generando una mejoría de estas. De todas formas, la irradiación *gamma* en congelado también logró efectuar una mejoría en la mayoría de las propiedades evaluadas, aunque de manera menos marcada que el GAG. En efecto, al evaluar las distintas matrices se constató que la aplicación de las estrategias de entrecruzamiento

seleccionadas resultó en matrices con una microestructura más adecuada y homogénea, mejores propiedades biomecánicas, con mejor resistencia a la degradación enzimática y térmicamente más estables.

La evaluación fisicoquímica permitió seleccionar de entre las distintas matrices, aquella que obtuviese las propiedades más adecuadas para luego ser analizada biológicamente como andamio de reposición dérmica. Una vez considerados todos los resultados de dicha caracterización y teniendo en cuenta la importancia de cada una de las evaluaciones efectuadas, se seleccionó la matriz con GAG e irradiada con 15 kGy (matriz 15 kGy) como la potencialmente más apta para desempeñarse como constructo de reposición dérmica. A su vez, la caracterización química mediante espectroscopia FT-IT y Raman, no solo confirmaron la composición de los andamios producidos, sino que además lograron detectar cambios en el modo de deformación y de la estructura secundaria de las proteínas colagénicas. Dichas modificaciones podrían estar demostrando la presencia de entrecruzamiento o de cambios resultantes de la formación de nuevos enlaces como consecuencia de la irradiación *gamma*, cuya dosis seleccionada mostró no suponer una degradación significativa de la estructura colagénica.

La evaluación desde el punto de vista biológico permitió analizar la biocompatibilidad con sistemas biológicos que estuvieran de alguna forma relacionados con el proceso de cicatrización. Particularmente, los ensayos de toxicidad indicarían que la matriz no genera un desprendimiento de componentes perjudiciales bajo las condiciones en las que fue evaluada. Asimismo, también se logró demostrar que todas las líneas celulares evaluadas no solo lograron adherirse a la membrana, sino que también lograron penetrar a distintas profundidades de esta. En efecto, los ensayos con CFSE sugerirían que las BMSC lograron adherirse y también proliferar sobre la matriz durante la duración del estudio. Por otro lado, los ensayos de diferenciación de las BMSC, demostraron que dichas células eran capaces de diferenciarse al linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. Por lo tanto, las BMSC habrían logrado proliferar y mantener su carácter de célula multipotencial al ser sembradas sobre la MC.

Por su parte, el ensayo *in vivo* permitió demostrar que el andamio mostró una buena compatibilidad en los animales de estudio, ya que todos sobrevivieron al ensayo y no mostraron señales de infección a causa del tratamiento que les fue realizado. Gracias a dichos estudios, también se pudo probar la adherencia de la matriz al lecho de las heridas, logrando además desprenderse de la capa de silicona, lo que resulta indispensable para el correcto funcionamiento de dicho biomaterial. No obstante, conviene mencionar que, dado el carácter preliminar de estos estudios, resulta imperioso efectuar nuevos estudios *in vivo* utilizando modelos adecuados y más similares al proceso de cicatrización humana, focalizando esfuerzos en análisis histológicos que proporcionen más información acerca de los efectos que produce la matriz sobre la herida.

De todas formas, el presente trabajo logró recopilar información, sometiendo a la matriz colagénica a diversos estudios para analizar sus propiedades, que permite considerar al andamio en cuestión como un buen candidato a apósito acelular para reposición dérmica. Este andamio logró una buena biocompatibilidad, permitiendo que las células lograsen adherirse y proliferar sobre él. Adicionalmente, al poseer también buena

compatibilidad con las BMSC, sería posible adicionar dichas células a la MC con el fin de mejorar aún más el proceso de cicatrización de heridas o ser utilizado en otras aplicaciones clínicas.

## PERSPECTIVAS

Los andamios tridimensionales de ingeniería tisular constituyen una herramienta poderosa para estudiar diversos fenómenos celulares, tales como la migración y diferenciación celulares. La ingeniería tisular se nutre de la comprensión de las propiedades y dinámica de la matriz extracelular para avanzar en el diseño de constructos bioactivos. En este sentido, el andamio elaborado y analizado en el presente estudio podría ser de gran utilidad, ya que constituye un biomaterial relativamente básico, al que se le podrían adicionar otras moléculas bioactivas con el objetivo de modificar su funcionalidad, ampliando así el rango de aplicaciones. De esta forma, teniendo en cuenta los resultados de los ensayos *in vitro* con las BMSC, futuros estudios deberían focalizarse en la elaboración de constructos generando una sinergia entre el biomaterial y las propiedades multipotenciales de dichas células. Estos constructos podrían ser utilizados también para la reposición dérmica, puesto que dichas células poseen la capacidad de liberar factores inmunomoduladores y proangiogénicos, lo cual resulta particularmente útil para el proceso de cicatrización y la reparación tisular en general. Por otra parte, teniendo en cuenta que las BMSC lograron diferenciarse a los 3 linajes esperados, es posible considerar que la MC sintetizada en este trabajo, pueda utilizarse como un andamio para otras aplicaciones biomédicas, como por ejemplo la reposición ósea o articular.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, sería prudente seguir avanzando en la caracterización de este material mediante técnicas analíticas de mayor precisión, o con distinto enfoque, que permitan evaluar este constructo a pesar de su tridimensionalidad.

Por último, en el laboratorio del Centro NanoMat actualmente se está avanzando en la elaboración de films mediante la aplicación de técnicas de electrospinning con óxido de polietileno (PEO). Dentro de esta línea de investigación, a futuro se podría incluir la elaboración de matrices tridimensionales con nanofibras de colágeno en combinación con polímeros sintéticos como el PEO. Esta técnica permitiría depositar polímeros de forma predeterminada, pudiendo ser confeccionadas para que adquieran, por ejemplo, ciertas propiedades biomecánicas específicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ågren, M. S. (2016a). *Wound Healing Biomaterials Volume 1: Therapies and Regeneration* (M. S. Ågren (ed.)). Woodhead Publishing Limited for Elsevier Ltd.
- Ågren, M. S. (2016b). *Wound Healing Biomaterials Volume 2: Functional Biomaterials* (M. S. Ågren (ed.)). Woodhead Publishing Limited for Elsevier Ltd.
- AlaejoS, C., Berini, L., & Gay Escoda, C. (1996). Valoración de los métodos de tinción con azul de toluidina y lugol en el diagnóstico precoz del cáncer bucal. *AVANCES EN ODONTOESTOMATOLOGÍA*, 12, 511–517. <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/96710/1/114071.pdf>
- Alba, L., Arenas, S., & Zurbarán, C. B. De. (2002). La matriz extracelular : El ecosistema de la célula. *System*, 9–18.
- Alberti, K. A., & Xu, Q. (2016). Biocompatibility and degradation of tendon-derived scaffolds. *Regenerative Biomaterials*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/rb/rbv023>
- Angele, P., Abke, J., Kujat, R., Faltermeier, H., Schumann, D., Nerlich, M., Kinner, B., Englert, C., Ruszczak, Z., Mehrl, R., & Mueller, R. (2004). Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 25(14), 2831–2841. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.066>
- Annor, A. H., Tang, M. E., Pui, C. L., Ebersole, G. C., Frisella, M. M., Matthews, B. D., & Deeken, C. R. (2012). Effect of enzymatic degradation on the mechanical properties of biological scaffold materials. *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*, 26, 2767–2778. <https://doi.org/10.1007/s00464-012-2277-5>
- Ansell, D. M., Holden, K. a., & Hardman, M. J. (2012). Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Experimental Dermatology*, 21, 581–585. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01540.x>
- Arakaki, P. A., Marques, M. R., & Santos, M. C. L. G. (2009). MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J. Biosci*, 34(June), 313–320. <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/034/02/0313-0320>
- Arbós, A., Nicolau, F., Quetglas, M., Ramis, J. M., Monjo, M., Muncunill, J., Calvo, J., & Gayà, A. (2013). InmunologíaObtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología*, 32(1), 3–11.
- Aulin, C. (2010). *Extracellular Matrix based Materials fo9r tissue engineering*.
- Azad, A. K., Sermsintham, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W. F. (2004). Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. *Journal of Biomedical Materials Research*, 69B(2), 216–222.

<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30000>

- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., ... Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- Balasubramani, M., Kumar, T. R., & Babu, M. (2001). Skin substitutes: A review. *Burns*, 27, 534–544. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(01\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(01)00018-3)
- Belbachir, K., Noreen, R., & Gouspillou, G. (2014). *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy*. April. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3019-y>
- Bergholt, M. S., St-Pierre, J. P., Offeddu, G. S., Parmar, P. A., Albro, M. B., Puetzer, J. L., Oyen, M. L., & Stevens, M. M. (2016). Raman spectroscopy reveals new insights into the zonal organization of native and tissue-engineered articular cartilage. *ACS Central Science*, 2(12), 885–895. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00222>
- Berthod, F., Saintigny, G., Chretien, F., Hayek, D., Collombel, C., & Damour, O. (1994). Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clinical Materials*, 15(4), 259–265. [https://doi.org/10.1016/0267-6605\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0267-6605(94)90055-8)
- Bonifacio, A., & Sergio, V. (2010). Vibrational Spectroscopy Effects of sample orientation in Raman microspectroscopy of collagen fibers and their impact on the interpretation of the amide III band. *Vibrational Spectroscopy*, 53(2), 314–317. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.04.004>
- Boyd, V., Cholewa, O., & Papas, K. (2008). Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. *Curr Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(2), 66–84. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2931281&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract%255Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931281/>
- Buendía Eisman, A., Mazuecos Blanca, J., & Martínez Camacho, F. M. (2018). ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA PIEL. In J. Conejo-Mir, J. C. Moreno, & F. M. Camacho (Eds.), *Manual de dermatología. 2º Edición* (2nd ed., Vol. 1, pp. 2–27). <https://doi.org/10.1001/jama.1947.02890040060037>
- Burke, J. F., Yannas, O. V., Quinby, W. C., Bondoc, C. C., & Jung, W. K. (1981). Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of Surgery*, 194(4), 413–427. <https://doi.org/10.1097/00000658-198110000-00005>
- Caliari, S. R. (2013). *THE INFLUENCE OF COLLAGEN-GAG SCAFFOLD ARCHITECTURAL AND*

*BIOLOGICAL CUES ON TENOCYTE AND MESENCHYMAL STEM CELL BIOACTIVITY FOR MUSCULOSKELETAL TISSUE ENGINEERING.* University of Illinois.

- Calne, S. (Ed.). (2010). *International consensus. Acellular matrices for the treatment of wounds. An expert working group review.* Wounds International Enterprise House.
- Calvo, L. G. (2014). *Diferenciación condrogénica in vitro de biomateriales de fibrina y células madre mesenquimales inmortalizadas.* Universidade da Coruña.
- Capella-Monsonís, H., Coentro, J. Q., Graceffa, V., Wu, Z., & Zeugolis, D. I. (2018). An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type i in biological specimens. *Nature Protocols*, 13(3), 507–529. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.117>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells \_ Enhanced Reader.pdf. *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 641–650.
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! In *Stem Cells Translational Medicine* (Vol. 6, Issue 6, pp. 1445–1451). <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Cattalini, J. P. (2015). *Desarrollo de biomateriales innovadores aplicables al diseño de andamios destinados a ingeniería tisular ósea.* Universidad de Buenos Aires.
- Chamberlain, L. J., Yannas, I. V., Hsu, H. P., Strichartz, G., & Spector, M. (1998). Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Experimental Neurology*, 154(2), 315–329. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6955>
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(SUPPL. 4). <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>
- Chang, C., Yan, J., Yao, Z., Zhang, C., Li, X., & Mao, H.-Q. (2021). REVIEW [www.advhealthmat.de](http://www.advhealthmat.de) Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Paracrine Signals and Their Delivery Strategies. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001689>
- Chattopadhyay, S., & Raines, R. T. (2014). Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101(8), 821–833. <https://doi.org/10.1002/bip.22486>
- Chen, R.-N., Ho, H.-O., & Sheu, M.-T. (2005). Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials*, 26(20), 4229–4235. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.012>
- Cheung, D. T., Perelman, N., Tong, D., & Nimni, M. E. (1990). *The effect of  $\gamma$ -irradiation on collagen molecules , isolated  $\alpha$ -chains , and crosslinked native fibers.* 24, 581–589.
- Childs, D. R. (2017). *Overview of Wound Healing and Management Wound Healing Management Skin Soft tissue injuries.* 97, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>

- Clark, R. a F. (2014). Wound Repair : Basic Biology to Tissue Engineering. In *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00076-8>
- Colorado, A.C., & Agudelo, C. A. (2013). *IDENTIFICACIÓN DE BIOMATERIALES PARA USO EN INGENIERÍA DE TEJIDO DE PIEL-REVISIÓN*.
- Colorado, Ana Cristina, Agudelo, C. A., & Moncada, M. E. (2013). Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Revista Ingeniería Biomédica*, 7(14), 11–23. <https://doi.org/10.14508/rbme.2013.7.14.11-23>
- Cornwell, K. G., Landsman, A., & James, K. S. (2009). Extracellular Matrix Biomaterials for Soft Tissue Repair. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 26(4), 507–523. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2009.08.001>
- Davis, J. (2003). Overview of biomaterials and their use in medical devices. In J. Davis (Ed.), *Handbook of Materials for Medical Devices* (pp. 1–12).
- Davison-Kotler, E., Sharma, V., Kang, N. V., & García-Gareta, E. (2018). A Universal Classification System of Skin Substitutes Inspired by Factorial Design. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 24(4), 279–288. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0477>
- Deeken, C. R., Eliason, B. J., Pichert, M. D., Grant, S. a., Frisella, M. M., & Matthews, B. D. (2012). Differentiation of Biologic Scaffold Materials Through Physicomechanical, Thermal, and Enzymatic Degradation Techniques. *Annals of Surgery*, 255(3), 595–604. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182445341>
- Doillon, C. J., Whyne, C. F., Brandwein, S., & Silver, F. H. (1986). Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology. *Journal of Biomedical Materials Research*, 20(8), 1219–1228. <https://doi.org/10.1002/jbm.820200811>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donzelli, E., Salvadè, a., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, a., Miloso, M., Baldoni, M., & Tredici, G. (2007). Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Archives of Oral Biology*, 52, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.07.007>
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*. 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Falco, S. (2012). *TRATAMIENTO DE ÚLCERAS VENOSAS CRÓNICAS DE MIEMBROS*

*INFERIORES CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS AUTÓLOGO*. Facultad de Medicina, UdelaR.

- Faraj, K. A., Brouwer, K. M., Geutjes, P. J., Versteeg, E. M., Wismans, R. G., Deprest, J. A., Chajra, H., Tiemessen, D. M., Feitz, W. F. J., Oosterwijk, E., Daamen, W. F., & Van Kuppevelt, T. H. (2011). The effect of ethylene oxide sterilisation, beta irradiation and gamma irradiation on collagen fibril-based scaffolds. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(5), 460–470.
- Farrell, E., O'Brien, F. J., Doyle, P., Fischer, J., Yannas, I., Harley, B. A., O'Connell, B., Prendergast, P. J., & Campbell, V. A. (2006). A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Engineering*, 12(3), 459–468. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.459>
- Fonder, M. a., Lazarus, G. S., Cowan, D. a., Aronson-Cook, B., Kohli, A. R., & Mamelak, A. J. (2008). Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), 185–206. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.08.048>
- Fowler, S. D., & Greenspan, P. (1985a). Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the Detection of Neutral Lipid Deposits in Tissue Sections: Comparison with Oil Red. *The Journal of Histochemistry Ans Cytochemistry*, 33(8), 833–836.
- Fowler, S. D., & Greenspan, P. (1985b). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1177/33.8.4020099>
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal cells* (I. John Wiley & Sons (Ed.); 6th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Freyman, T. M., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science*, 46, 273–282. [https://doi.org/10.1016/S0079-6425\(00\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6425(00)00018-9)
- Fritz, J. R., Phillips, B. T., Conkling, N., Fourman, P. M., Melendez, M. M., Bhatnagar, D., Simon, M., Rafailovich, M., & Dagum, A. B. (2012). *Comparison of Native Porcine Skin and a Dermal Substitute Using Tensiometry and Digital Image Speckle Correlation*. 69(4). <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31824a43b0>
- Fullana, M. J. (2015). *PRACTICAL APPLICATIONS OF COLLAGEN-BASED SCAFFOLDS FOR USE IN TISSUE ENGINEERING AND REGENERATION* by Dissertation Advisor : Dr . Gary E . Wnek Department of Macromolecular Science and Engineering CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY Committee Member (Issue January). CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY.
- Galiano, R. D., Michaels, J., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). *Technical Article Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing*. 485–492.
- Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, L., & Engkagul, A. (2007). Determination of

- chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.019>
- Gerharz, M., Baranowsky, A., Siebolts, U., Eming, S., Nischt, R., Krieg, T., & Wickenhauser, C. (2007). Morphometric analysis of murine skin wound healing: Standardization of experimental procedures and impact of an advanced multitissue array technique. *Wound Repair and Regeneration*, 15(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2006.00191.x>
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94(1–2), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)
- Gill, P., Moghadam, T. T., & Bijan Ranjbar. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21(1), 167–193. <https://doi.org/10.1111/dme.13173>
- Gniadecka, M., Nielsen, O. F., Christensen, D. H., & Wulf, H. C. (1998). Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *Journal of Investigative Dermatology*, 110(4), 393–398. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00146.x>
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 965–973. *The Journal of Cell Biology*, 100(10), 965–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. 329, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002>
- Grey, J. E., Enoch, S., & Harding, K. G. (2006). ABC of wound healing: Wound assessment. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 332(7536), 285–288. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7536.285>
- Guerrero-Robles, C. I. (2017). Mapeo Bioquímico mediante Micro-espectroscopía FTIR como Técnica Rápida y No destructiva para Detección de Biomoléculas en Condrocitos Cultivados. *Memorias.Somib.Org.Mx, February 2018*, 162–165. <https://doi.org/10.24254/CNIB.17.24>
- Gullekson, C., Lucas, L., Hewitt, K., & Kreplak, L. (2011). Surface-sensitive Raman spectroscopy of collagen I fibrils. *Biophysical Journal*, 100(7), 1837–1845. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.026>
- Gurumurthy, B., & Janorkar, A. V. (2021). Improvements in mechanical properties of collagen-based scaffolds for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 17, 100253. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2020.100253>
- Han, F., Wang, J., Ding, L., Hu, Y., Li, W., Yuan, Z., Guo, Q., Zhu, C., Yu, L., Wang, H., Zhao, Z., Jia, L., Li, J., Yu, Y., Zhang, W., Chu, G., Chen, S., & Li, B. (2020). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia.

- Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(March), 1–35.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>
- Hara, M. (2006). Various Cross-Linking Methods for Collagens: Merit and Demerit of Methods by Radiation. *Journal of Oral Tissue Engineering*, 3(3), 118–124.
- Haraway, G. D. (2006). The Extracellular Matrix in Wound Healing. *Healthpoint*, 800, 4.
- Harley, B. A. (2006). Cell-matrix interactions : collagen-GAG scaffold fabrication, characterization, and measurement of cell migratory and contractile behavior via confocal microscopy. *Materials Science*, 393.  
[http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/35678%5Cnhttp://www.evernote.com/l/A\\_Fkikluj-D1Bs6GQXPWzEWkCroyurstGOCE/](http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/35678%5Cnhttp://www.evernote.com/l/A_Fkikluj-D1Bs6GQXPWzEWkCroyurstGOCE/)
- Harley, B. a., Leung, J. H., Silva, E. C. C. M., & Gibson, L. J. (2007). Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 3, 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.12.009>
- Harley, B. a C., Kim, H.-D., Zaman, M. H., Yannas, I. V, Lauffenburger, D. a, & Gibson, L. J. (2008). Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophysical Journal*, 95(8), 4013–4024. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.122598>
- Harley, B. C., & Gibson, L. J. (2008). In vivo and in vitro applications of collagen-GAG scaffolds. *Chemical Engineering Journal*, 137, 102–121. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.09.009>
- Harley, Brendan A., Leung, J. H., Silva, E. C. C. M., & Gibson, L. J. (2007). Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 3(4), 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.12.009>
- Haugh, M. ., Murphy, C. M., & O'Brien, F. J. (2010). Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 16(5), 887–894. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0422>
- Haugh, M. G. (2009). *The Development of Novel Scaffolds for Tissue Engineering with a Range of Structural and Mechanical Properties*. University of Dublin.
- Haugh, M. G., Jaasma, M. J., & O'Brien, F. J. (2009). *The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen- GAG scaffolds* . 89(2), 363–369.
- Haydar Sahab, A., Tretyak, S., Nedzved, M. K., Baranov, E. V., Nadyrov, E., Lobanok, H. H., Vasilevich, I. B., & Welcome, M. O. (2013). Regeneration of skin surface by multipotent mesenchymal stem cells of adipose tissue in laboratory animals with infected wounds. In *Medicine Science | International Medical Journal* (p. 1). <https://doi.org/10.5455/medscience.2013.02.8059>
- Helling, A. L., Tsekoura, E. K., Biggs, M., Bayon, Y., Pandit, A., & Zeugolis, D. I. (2017). In Vitro Enzymatic Degradation of Tissue Grafts and Collagen Biomaterials by Matrix

- Metalloproteinases: Improving the Collagenase Assay. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 3(9), 1922–1932. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00563>
- Hermanns-lê, T., Uhoda, I., Smitz, S., & Piérard, G. E. (2004). Skin tensile properties revisited during ageing . Where now , where next ? *Journal of Cosmetic Dermatology*, 35–40.
- Hocking, A. M. (2012). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. *Advances in Wound Care*, 1(4), 166–171. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0294>
- Holzapfel, G. A. (2000). Biomechanics of Soft Tissue. In J. Lemaitre (Ed.), *Handbook of material behavior Nonlinear Models and Properties* (Vol. 7). Institute for Structural Analysis Computational Biomechanics.
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, 21, 175–189. <https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50021-6>
- Hwang, Y. J., & Lyubovitsky, J. G. (2012). *The Structural Analysis of Three-Dimensional Fibrous Collagen Hydrogels by Raman Microspectroscopy The Structural Analysis of Three-Dimensional Fibrous Collagen Hydrogels*. 99(6), 349–356. <https://doi.org/10.1002/bip.22183>
- Isaza, A. (2019). *Comportamiento Mecánico de la Piel en Función del Espesor de las Capas que la Componen Mechanical*. Universidad Nacional de Colombia.
- Jackson, W. M., Nesti, L. J., & Tuan, R. S. (2012). Concise Review: Clinical Translation of Wound Healing Therapies Based on Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 1, 44–50. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0024>
- Jafari-sabet, M., Nasiri, H., & Ataee, R. (2016). *The Effect of Cross-Linking Agents and Collagen Concentrations on Properties of Collagen Scaffolds*. 4(4). <https://doi.org/10.5812/jamm.42367.Research>
- Johnstone, B., Alini, M., Cucchiaroni, M., Dodge, G. R., Eglin, D., & Guilak, F. (2013). TISSUE ENGINEERING FOR ARTICULAR CARTILAGE REPAIR – THE STATE OF THE ART. *European Cells and Materials*, 25, 248–267. <https://doi.org/10.22203/eCM.v025a18>
- Jones, K. H., & Senft, J. A. (1985). an Improved Method To Determine Cell Viability By Simultaneous Staining With Fluorescein Diacetate Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(1), 77–79. <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>
- Joodaki, H., & Panzer, M. B. (2018). Skin mechanical properties and modeling : A review. *J Engineering in Medicine, March*. <https://doi.org/10.1177/0954411918759801>
- Kane, R. J., & Roeder, R. K. (2012). Effects of hydroxyapatite reinforcement on the architecture and mechanical properties of freeze-dried collagen scaffolds. *Journal*

- of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 7, 41–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.09.010>
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, 70(5), 220–233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8580206>
- Kawasaki, Y., Sotome, S., Yoshii, T., Torigoe, I., Maehara, H., Sugata, Y., Hirano, M., Mochizuki, N., Shinomiya, K., & Okawa, A. (2010). Effects of gamma-ray irradiation on mechanical properties, osteoconductivity, and absorption of porous hydroxyapatite/ collagen. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 92(1), 161–167. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31502>
- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: New directions. *Cell Stem Cell*, 10(6), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
- Khalili, A. A., & Ahmad, M. R. (2015). *A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications*. 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>
- Khang, G. (2017). *Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2nd Edition)* (2nd ed.). Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.
- Kumar, G. L., & Kiernan, J. A. (2010). *Education guide: Special stains and H & E*. (K. J. Kumar GL (Ed.); 2nd ed.). Dako North America. [https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066\\_special\\_stains\\_eduguide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_eduguide.pdf)
- Kutz, M. (2009). *BIOMEDICAL ENGINEERING AND DESIGN HANDBOOK* (Myer Kutz (Ed.); SECOND). The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Lee, C. R., Breinan, H. a, D, P., Nehrer, S., Spector, M., & Al, L. E. E. E. T. (2000). Collagen-GAG Matrices Exhibit Contractile Behavior. *Tissue Engineering*, 6(5), 555–565.
- Leitinger, B., & Hohenester, E. (2007). *Mammalian collagen receptors*. 26, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>
- León-Mancilla, B. H., Araiza-Téllez, M. A., Flores-Flores, J. O., & Piña-Barba, M. C. (2016). Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Research and Technology*, 14(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001>
- LI, R. U. I., JOHNSON, R., YU, G., MCKENNA, D. H., & HUBEL, A. (2019). Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. *Cytotherapy*, 21(9), 943–957. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.07.004>
- Liang, W.-H., Kienitz<sup>1</sup>, B. L., & Kitsie J. Penick<sup>2</sup>, Jean F. Welter<sup>2</sup>, Thomas A. Zawodzinski<sup>1</sup>, and H. B. (2008). Concentrated Collagen-Chondroitin Sulfate Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32774>.Concentrated

- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering: Part B*, 19(6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>
- Lourenço, S. D. N., WOCHÉ, S. K., BACHMANN, J., & SAULICK, Y. (2015). Wettability of crushed air-dried minerals. *Géotechnique Letters*, 5(July–September), 173–177. <https://doi.org/10.1680/geolett.15.00075>
- Lungu, A., Albu, M. G., Florea, N. M., Stancu, I. C., Vasile, E., & Iovu, H. (2011). The influence of glycosaminoglycan type on the collagen-glycosaminoglycan porous scaffolds. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(4), 1867–1875.
- Lyons, A. B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods*, 243(1–2), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00231-3)
- Lysdahl, H., Baatrup, A., Nielsen, A. B., Foldager, C. B., & Bünger, C. (2013). Phenol Red Inhibits Chondrogenic Differentiation and Affects Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(2), 132–139. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9417-0>
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., & Shen, J. (2004). Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials*, 25, 2997–3004. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.092>
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., & Han, C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4833–4841. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00374-0)
- Macewan, M. R., Macewan, S., Kovacs, T. R., & Batts, J. (2017). *What Makes the Optimal Wound Healing Material? A Review of Current Science and Introduction of a Synthetic Nanofabricated Wound Care Scaffold Common materials for healing chronic wounds*. 9(10). <https://doi.org/10.7759/cureus.1736>
- Mahboob, M., Nurul 'Izzah, A. G., Chowdhury, S. R., & Ruszymah, B. H. I. (2014). The current available biomaterials being used for skin tissue engineering. *Regenerative Research*, 3(1), 17–22.
- Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2007). The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). *Experimental Gerontology*, 42(9), 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.07.002>
- Martinez, M. G., Bullock, A. J., MacNeil, S., & Rehman, I. U. (2019). Characterisation of structural changes in collagen with Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 54(6), 509–542. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1506799>
- Matsuda, K., Suzuki, S., Isshiki, N., Yoshioka, K., Okada, T., & Ikada, Y. (1990). Influence of glycosaminoglycans on the collagen sponge component of a bilayer artificial skin. *Biomaterials*, 11(5), 351–355. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(90\)90113-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(90)90113-5)

- Merino, J., & Noriega, M. (2011). La piel: Estructura y Funciones. In *Open Course Ware, Universidad de Cantabria* (pp. 1–7).
- Metzmacher, I. (2005). *Enzymatic Degradation and Drug Release Behavior of Dense Collagen Implants*.
- Miles, C. A., Avery, N. C., Rodin, V. V., & Bailey, A. J. (2005). The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *Journal of Molecular Biology*, 346(2), 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.001>
- Millán, D. M. (2014). Evaluación de la biocompatibilidad y eficiencia como sustituto artificial de soportes de colágeno tipo I asociados con extractos de caléndula (*Calendula officinalis*) en heridas cutáneas en un modelo animal lagomorfo. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Moffatt, C. J., Franks, P. J., Doherty, D. C., Martin, R., Blewett, R., & Ross, F. (2004). Prevalence of leg ulceration in a London population. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 97(7), 431–437. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hch075>
- Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'Brien, F. J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
- Murphy, C. M., & O'Brien, F. J. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion and Migration*, 4(September), 377–381. <https://doi.org/10.4161/cam.4.3.11747>
- O'Brien, F. J., Harley, B. a., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2005a). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26, 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052>
- O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2005b). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26(4), 433–441.
- O'Brien, F.J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- O'Brien, Fergal J., Harley, B. a., Yannas, I. V., & Gibson, L. (2004). Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 25, 1077–1086. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00630-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00630-6)
- Orgill, D., & Blanco, C. (2009). *Biomaterials for treating skin loss* (D. Orgill & C. Blanco (Eds.)). Woodhead Publishing Limited.
- Osborne, C. S., Barbenel, J. C., Smith, D., Savakis, M., & Grant, M. H. (1998). Investigation into the tensile properties of collagen/chondroitin-6-sulphate gels: The effect of crosslinking agents and diamines. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 36, 129–134. <https://doi.org/10.1007/BF02522870>

- Otero, G., AGORIO, C., SUJANOV, A., ECHARTE, L., TCHEKMEDYIAN, A. N. A., MONTELONGO, M., MENYOU, A. L. B. A., RODRIGUEZ, A., DIAZ, L., RODRIGUEZ, I., & TOURIÑO, C. (2019). Autologous bone marrow-derived cells for venous leg ulcers treatment: a pilot study. *Cytotherapy*, 21(2), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.01.002>
- Otero González, G., Agorio Norstrom, C., & Asuaga, M. M. (2012). Úlceras de miembros inferiores: características clínico-epidemiológicas de los pacientes asistidos en la unidad de heridas crónicas del Hospital de Clínicas. *Revista Médica Del Uruguay*, 28(3), 182–189.
- Pek, Y. S., Spector, M., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2004). Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. *Biomaterials*, 25, 473–482. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00541-6)
- Pereira, L. (2012). *Envejecimiento cutáneo: Mecanismos fisiológicos subyacentes y determinación de la eficacia cosmética de un producto anti-age mediante la aplicación de instrumentos de bioingeniería cutánea*. Universidad de la República.
- Puchtler, H., Meloan, S., & Terry, M. S. (1969). ON THE HISTORY AND MECHANISM OF ALIZARIN AND ALIZARIN RED S STAINS FOR CALCIUM. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 17(2), 110–124. <https://doi.org/10.1177/17.2.110>
- Quah, B. J. C., & Parish, C. R. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments*, 44, 4–7. <https://doi.org/10.3791/2259>
- Rahman, M. S., Rana, M. M., Spitzhorn, L.-S., Akhtar, N., Hasan, M. Z., Choudhury, N., Fehm, T., Czernuszka, J. T., Adjaye, J., & Asaduzzaman, S. M. (2019). Fabrication of biocompatible porous scaffolds based on hydroxyapatite/collagen/chitosan composite for restoration of defected maxillofacial mandible bone. *Progress in Biomaterials*, 8(3), 137–154. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-0113-x>
- Rahmanian-Schwarz, A., Held, M., Knoeller, T., Stachon, S., Schmidt, T., Schaller, H.-E., & Just, L. (2014). In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 102(4), 1173–1179. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34793>
- Ramírez, G. A. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. *RFS Revista Facultad de Salud*, 2(2), 69–78. <https://doi.org/10.25054/rfs.v2i2.57>
- Ramírez Hernandez, G. . (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista Facultad de Salud*, 2(2), 69–78.
- Ramponi, F. (2019). The Cost of Chronic Wounds in Argentina: An Estimation of the Burden in a Public Hospital. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.20944/preprints201905.0235.v1>
- Ren, J., Wang, H., Tran, K., Civini, S., Jin, P., Castiello, L., Feng, J., Kuznetsov, S. A., Robey, P. G., Sabatino, M., David, F., & Branch, S. D. (2015). Human Bone Marrow Stromal Cell Confluence: Effects on Cell Characteristics and Methods of Assessment.

- Cytotherapy*, 17(7), 897–911. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.607>. Human
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., Rahim, A., Rizvi, S. A. A., & Rehman, I. U. (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9), 703–746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>
- Roeder, B. a, Kokini, K., Sturgis, J. E., Robinson, J. P., & Voytik-Harbin, S. L. (2002). Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(April), 214–222. <https://doi.org/10.1115/1.1449904>
- Sadeghi-avalshahr, A., Nokhasteh, S., & Molavi, A. M. (2017). *Synthesis and characterization of collagen / PLGA biodegradable skin scaffold fibers*. September, 309–314. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx026>
- Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N., Penttinen, R., & Ja, H. (2009). Extracellular Matrix Molecules : Potential Targets in. *Pharmacological Reviews*, 61(2), 198–223. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001289>.provided
- Sarkar, S. D., Farrugia, B. L., Dargaville, T. R., & Dhara, S. (2013). Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101, 3482–3492. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34660>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., & Instrumentation, C. (2017). *NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis*. 9(7), 671–675.
- Shevchenko, R. V, James, S. L., & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7(October 2009), 229–258. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0403>
- Sionkowska, A., & Kozłowska, J. (2010). Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 483–487. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.07.002>
- Sloff, M., Janke, H. P., De Jonge, P. K. J. D., Tiemessen, D. M., Kortmann, B. B. M., Mihaila, S. M., Geutjes, P. J., Feitz, W. F. J., & Oosterwijk, E. (2018). *The Impact of  $\gamma$ -Irradiation and EtO Degassing on Tissue Remodeling of Collagen-based Hybrid Tubular Templates*. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00369>
- Sridharan, G., & Shankar, A. A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 16(2), 251–255. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>
- Sterigenics. (n.d.). *Material Consideration Radiation Processing*. [https://sterigenics.com/wp-content/uploads/2018/09/Material-Considerations-Irradiation-Processing\\_WEB-v3.pdf](https://sterigenics.com/wp-content/uploads/2018/09/Material-Considerations-Irradiation-Processing_WEB-v3.pdf)

- Sun, W. Q., & Leung, P. (2008). Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation. *Acta Biomaterialia*, 4, 817–826. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.02.006>
- Sundar, G., Joseph, J., Prabhakumari, C., John, A., & Abraham, A. (2021). Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(9), 593–604. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1740991>
- Takitoh, T., Bessho, M., Hirose, M., Ohgushi, H., Mori, H., & Hara, M. (2014). Gamma-cross-linked non fibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 20(20), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.07.008>
- Tarnowski, B. I., Spinale, F. G., & Nicholson, J. H. (1991). DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 66(6), 297–302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1725854>
- Tian, H., Chen, Y., Ding, C., & Li, G. (2012). Interaction study in homogeneous collagen / chondroitin sulfate blends by two-dimensional infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.042>
- Tripathi, S., Singh, B. N., Singh, D., kumar, G., & Srivastava, P. (2021). Optimization and evaluation of ciprofloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *3 Biotech*, 11(4), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02567-w>
- Ubillos, N., Valdés, B., Echarte, L., Sujanov, A., Caroline, A., Touriño, C., Díaz, L., & Otero, G. (2018). Tratamiento complementario de heridas crónicas con factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos. A propósito de dos casos clínicos. *Revista Uruguaya de Medicina Interna*, 3(1), 30–38. <https://doi.org/10.26445/rmu.3.1.4>
- Vázquez-Zapién, G. J., Mata-Miranda, M. M., García-Sánchez, F. J., Campos-Soto, S. S., Sánchez-Brito, M., & Martínez-Cuazitl, A. (2019). Caracterización Biomolecular Mediante Microespectroscopía FTIR en la Fase de Remodelación de la Cicatrización en un Modelo Murino de Lesión Excisional. *International Journal of Morphology*, 37(4), 1234–1244. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022019000401234>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2015). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Villalba, L. I., Bilevich, E., Bermúdez, S., Herrera, M., Hochman, A., Moreno, H., Mosca, I., Rodríguez, M., & Videla, E. (2008). *CONSENSO SOBRE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS de la SOCIEDAD ARGENTINA DE DERMATOLOGÍA* (Vol. 1, Issue c).
- Wang, H. M., Chou, Y. T., Wen, Z. H., Wang, Z. R., Chen, C. H., & Ho, M. L. (2013). Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration. *PLoS ONE*, 8(6), 2–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056330>

- Wang, X., Ge, J., Tredget, E. E., & Wu, Y. (2013). The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nature Protocols*, 8(2), 302–309. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.002>
- Wessels, Q. B. (2007). *Engineering of a Collagen-Glycosaminoglycan Copolymer Dermal Regeneration Matrix*. University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
- Wessels, Q. B., & Pretorius, E. (2008). Enhanced stabilization of collagen-based dermal regeneration scaffolds through the combination of physical and chemical crosslinking. *South African Journal of Science*, 104(December), 513–516. <https://doi.org/10.1590/S0038-23532008000600030>
- Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P., Wilhelms, T., Schulze, D., Norgauer, J., & Hipler, U. C. (2009). Effect of the sterilization method on the performance of collagen type I on chronic wound parameters in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90 B(2), 710–719. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31338>
- Wolever, J. D. (2010). *Influence of Scaffold Architecture on Mechanical Stimulation of Engineered Skin Thesis*. The Ohio State University.
- Xie, L., Zhang, N., Marsano, A., Vunjak-Novakovic, G., Zhang, Y., & Lopez, M. J. (2013). In vitro mesenchymal trilineage differentiation and extracellular matrix production by adipose and bone marrow derived adult equine multipotent stromal cells on a collagen scaffold. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(6), 858–872. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9456-1>
- Xu, L., Wu, Y., Xiong, Z., Zhou, Y., Ye, Z., & Tan, W. (2016). Mesenchymal Stem Cells Reshape and Provoke Proliferation of Articular Chondrocytes by Paracrine Secretion. *Nature Publishing Group, April*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep32705>
- Yannas, I. V., Orgill, D. P., & Burke, J. F. (2010). Template for Skin Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 60s-70s. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318200a44d>
- Yannas, I. V., Tzeranis, D. S., Harley, B. A., & So, P. . T. C. (2010). Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 368, 2123–2139. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0015>
- Yannas, I. V., & Burke, J. F. (1980). Design of an artificial skin . I . Basic design principles ". *Journal of Biomedical Materials Research*, 14, 65–81.
- Yannas, I. V, Lee, E., Orgill, D. P., Skrabut, E. M., & Murphy, G. F. (1989). Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(February), 933–937. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.3.933>

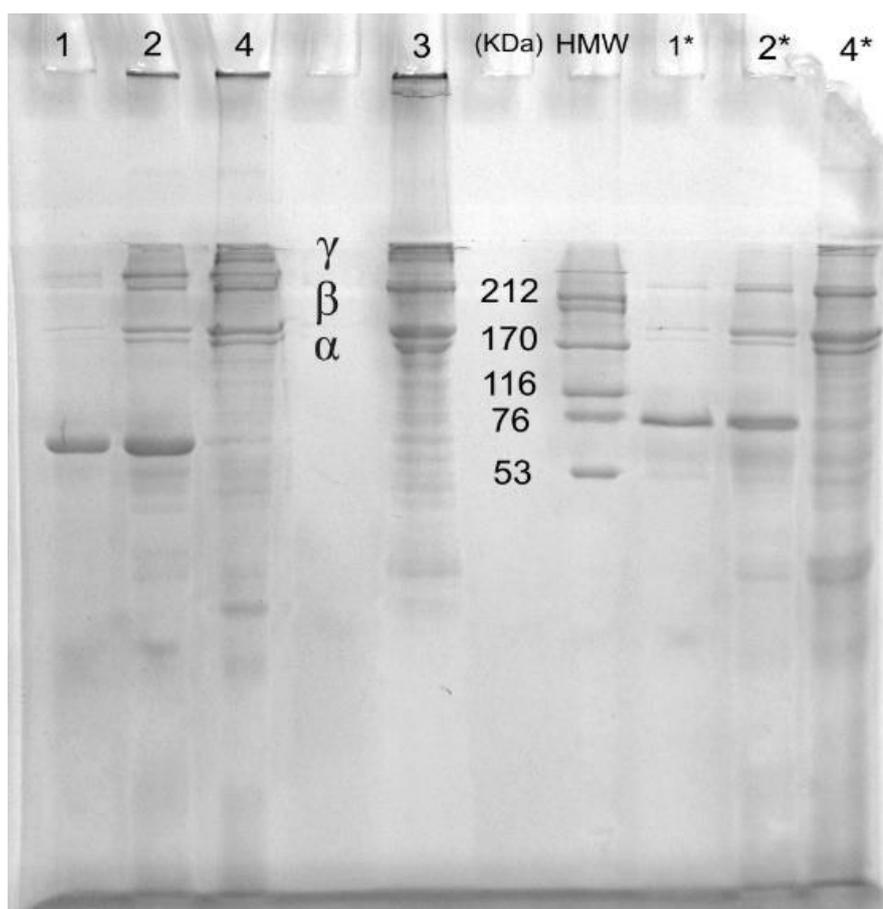
- Yannas, I. V, Tzeranis, D. S., Harley, B. a, & So, P. T. C. (2010). Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 368, 2123–2139. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0015>
- Yokoyama, H., Danjo, T., Ogawa, K., & Wakabayashi, H. (1997). A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores. *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 281–286. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00293.x>
- You, F., Li, Y., Zuo, Y., & Li, J. (2013). The Influence of Gamma -Ray Irradiation on the Mechanical and Thermal Behaviors of nHA / PA66 Composite Scaffolds. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–6.
- Zeugolis, D. I., Paul, R. G., & Attenburrow, G. (2008). Factors influencing the properties of reconstituted collagen fibers prior to self-assembly: Animal species and collagen extraction method. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 86(4), 892–904. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31694>
- Zhao, J., & Wu, J. (2006). Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe. In *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (Vol. 34, pp. 1555–1559). [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(07\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(07)60015-2)
- Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., & Turng, L. sheng. (2018). Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. *Frontiers of Mechanical Engineering*, 13(1), 107–119. <https://doi.org/10.1007/s11465-018-0496-8>
- Zheng, X., Chen, Y., Dan, N., Dan, W., & Li, Z. (2021). Highly stable collagen scaffolds crosslinked with an epoxidized natural polysaccharide for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182(March), 1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.189>
- Zou, X. H., Foong, W. C., Cao, T., Bay, B. H., Ouyang, H. W., & Yip, G. W. (2004). Chondroitin sulfate in palatal wound healing. *Journal of Dental Research*, 83(11), 880–885. <https://doi.org/10.1177/154405910408301111>
- Zulian, S. . (2008). *Actividad de la diacilglicerol quinasa en terminales sinápticos de áreas del sistema nervioso central . Rol en el mecanismo de señalización de la insulina.* UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR.

## ANEXO

SDS-PAGE para analizar pureza del colágeno extraído de tendón bovino.

Realizado por: Mariano Romero, Ignacio Laborda, Geraldine Rimsky, Luciana Fernández, Juan A. Morando, Alejandra Szabo. (DETEMA-Centro NanoMat, Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Udelar)

Se realizó el análisis de la pureza del colágeno soluble obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida 12%, (1.5 mm x 10.0 cm x 12.0 cm; Mighty Small SE245 Dual Gel Caster; Hoefer/Pharmacia, Piscataway, NJ), con una corrida a 25 mA en condiciones reductoras.



**Fig. A1: SDS-PAGE del colágeno extraído a partir del tendón bovino.** El gel de poliacrilamida muestra soluciones colagénicas obtenidas en distintas etapas del proceso de extracción: 24 horas de extracción (Carril 1), 48 horas de extracción (Carril 2), 48 horas de extracción y precipitada con NaCl (Carril 3), solución colagénica con 48 horas de extracción, precipitada y dializada (al final del proceso) (Carril 4). HMW: kit de peso molecular.

Como se observa en el SDS-PAGE, en las primeras 24 horas de extracción (Carril 1) no aparece una cantidad significativa de colágeno en solución, pero si se observa la presencia de lo que probablemente sea BSA (Seroalbumina bovina) ya que tiene un peso de aproximadamente 66 KDa.

Pasadas las 48 horas de extracción (Carril 2) se observa la aparición de bandas de peso molecular similares a las asociadas con las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  del colágeno soluble.

Los valores de peso molecular calculados son bastante similares a los reportados  $\alpha= 120$  KDa,  $\beta= 200$  KDa y  $\gamma= 220$  KDa aproximadamente.

Además se observa la presencia de material que no entró al gel de corrida. Esto podría deberse a la formación de agregados de fibras de colágeno de muy alto peso molecular o bien colágeno insoluble.

El proceso de salting-out (precipitación con NaCl) funciona selectivamente eliminando las impurezas proteicas presentes (Carril 3).

El producto final de colágeno soluble dializado se muestra en el Carril 4. En el cuál se puede detectar la presencia del patrón de bandas similares a las asociadas con las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  del colágeno soluble, y además se observa una menor presencia de impurezas.

## TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS Y MEDIOS DE DIVULGACIÓN

- Publicaciones
  - L. Pereira, L. Echarte, M. Romero, G. Grazioli, H. Pérez-Campos, A. Francia, W. Vicentino, A. W. Mombrú, R. Faccio, I. Álvarez, C. Touriño & H. Pardo. Synthesis and characterization of a bovine collagen: GAG scaffold with Uruguayan raw material for tissue engineering. Cell Tissue Bank (2021). <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09960-6>
  - L. Echarte, G. Grazioli, L. Pereira, A. Francia, H. Pérez, W. Kuzuian, W. Vicentino, H. Pardo, A. Mombrú, Á. Maglia, C. Touriño, I. Álvarez. Processing methods for human amniotic membrane as scaffold for tissue engineering with mesenchymal stromal human cells. En revisión.
- Presentación en formato Póster del trabajo titulado "Desarrollo y evaluación in vitro e in vivo de una matriz biopolimérica de colágeno tipo I con la incorporación de ácido L-ácido ascórbico encapsulado en nanopartículas de quitosano para el tratamiento de heridas", en el II Congreso Interdisciplinario de Nanotecnología y Biomateriales, desarrollado el 16 y 17 de octubre de 2013, en la Torre de los Profesionales, Montevideo, Uruguay.
- Presentación oral de los resultados obtenidos en el proyecto Maestría en Ciencias Biomédicas titulado "Desarrollo y evaluación in vitro e in vivo de una matriz biopolimérica de colágeno tipo I con la incorporación de nanopartículas de quitosano-AA (L-ácido ascórbico) para el tratamiento de heridas", el día 29 de Octubre del 2014 con motivo de la visita de los evaluadores internacionales de Proyectos: Joan Garcia (Director de European Master in Transfusion Medicine and Advanced Cell Therapies, Centre de Transfusió i Banc de Teixits, barcelona, España) y Víctor Hugo Morales (Asesor en el Uso Clínico de las Células Madre, INCUCAI). Organizado por Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay).
- Presentación en formato Póster del trabajo titulado "Desarrollo y evaluación in vitro e in vivo de una matriz biopolimérica de colágeno conteniendo nanopartículas de quitosano con L-ácido ascórbico para el tratamiento de heridas", en el 4º Encuentro Nacional de Química (ENAQUI) realizado del 4 al 6 de Noviembre del 2015, en la Torre de las Telecomunicaciones, Montevideo, Uruguay.
- Presentación en formato Póster del trabajo titulado "Caracterización biológica de una matriz biopolimérica de colágeno:GAG" en el Congreso de la Nacional de Biociencias el 12 al 14 de mayo de 2017 en la Chacra La Martina.
- Presentación en formato Póster del trabajo titulado "Evaluación in vitro de una matriz biopolimérica de Colágeno como constructo para la reposición dérmica"

en la Semana Académica del Hospital de Clínicas del 21 al 25 de Setiembre de 2017 en el Hospital de Clínicas.

- Presentación en formato Póster del trabajo titulado : “Hacia la piel sintética: caracterización física y biológica de una matriz biopolimérica de colágeno”.en el 5º Encuentro Nacional de Química (ENAQUI) a realizarse del 18 al 20 de Octubre del 2017, en la Torre de las Telecomunicaciones (Montevideo, Uruguay).
- Presentación oral de los resultados de la maestría en el Curso CABBIO BR-01 2019 - "Biotecnología aplicada à Engenharia Tecidual mediante utilização de *scaffolds* biológicos derivados de placentas", realizado en la Universidad de San Pablo, SP, Brasil. 40hs.