

Construcción de matrices como sustitutos dérmicos: aplicación potencial en la regeneración de piel

Juliana Valencia Serna¹, Catalina Pineda Molina^{1, ♯}

¹ Laboratorio de Biotecnología en Salud. Programa de Ingeniería Biomédica.

Escuela de Ingeniería de Antioquia (EIA) – Universidad CES. Línea de Biotecnología en Salud y Biomateriales.

Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica EIA-CES (GIBEC), Colombia.

Recibido 20 de diciembre de 2012. Aprobado 20 de febrero de 2013. En discusión hasta el 1 de junio de 2013

MATRIX CONSTRUCTION AS DERMAL SUBSTITUTES: POTENTIAL APPLICATION IN SKIN REGENERATION

Resumen — La pérdida de grandes porciones de piel limita su capacidad de regeneración, haciendo difícil su tratamiento. Mediante la ingeniería de tejidos se han desarrollado sustitutos dérmicos que promueven la regeneración; sin embargo, es necesario hallar un material para el crecimiento de fibroblastos que sea un sustituto dérmico adecuado. En este trabajo se construyeron matrices tridimensionales porosas de colágeno y colágeno-ácido hialurónico evaluando su potencial como sustituto dérmico. Las matrices se entrecruzaron con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto. Se evaluó la porosidad, se realizaron pruebas de degradación, evaluación de adherencia celular con fibroblastos humanos y, ensayos de viabilidad y proliferación. Las matrices presentaron poros de 50 μm de diámetro uniformemente distribuidos. Las matrices de colágeno y colágeno-ácido hialurónico (2:8 y 4:6) presentaron una degradación progresiva con pesos similares. Luego de 24 horas en cultivo, los resultados de la prueba de MTT mostraron que los fibroblastos en colágeno proliferaron; mientras que los fibroblastos en colágeno-ácido hialurónico no evidenciaron proliferación. Aunque la estructura porosa y la tasa de degradación de las matrices son similares, las de colágeno brindan mejores condiciones de adhesión y proliferación a los fibroblastos cultivados en comparación con las que tienen ácido hialurónico como adición, convirtiéndose en el mejor andamio para ser empleado como sustituto dérmico entre las matrices evaluadas.

Palabras clave — Ácido hialurónico, colágeno, fibroblastos, matriz extracelular.

Abstract — Wounds can cause loss of skin that limits the skin regeneration, making the treatment more difficult to address. The tissue engineering has developed skin substitutes that promote skin regeneration; however, it is imperative to find materials that allow fibroblast growth in order to find an appropriate skin substitute. The construction of tridimensional porous collagen and collagen-hyaluronic acid matrixes crosslinked with 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride is presented in order to evaluate their potential use in skin regeneration therapies. Matrix porosity was evaluated. Degradation tests, human fibroblast adherence, viability and proliferation tests were performed. Matrixes had a uniform distributed porosity with mean diameters of 50 μm . Both collagen and collagen-hyaluronic acid (2:8 and 4:6) matrixes presented a progressive degradation rate with similar weight. After 24 hours under culture, the number of fibroblasts seeded on collagen matrixes were doubled, while the number of fibroblast seeded on collagen-hyaluronic acid matrixes remained similar. Even though porous structure and degradation rate of different types of constructed matrixes in this study are similar, collagen matrixes offer better adhesion and proliferation conditions for seeded fibroblasts in comparison with hyaluronic acid added matrixes, making them the best scaffold to be employed as a dermic substitute among the matrixes compared here.

Keywords — Collagen, Extracellular matrix, Fibroblasts, Hyaluronic acid.

I. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano cumple funciones de vital importancia como: la regulación de la temperatura corporal, la protección, la sensibilidad, la excreción, la inmunidad, el reservorio de sangre y la síntesis de vitamina D [1]. La pérdida de la integridad de grandes porciones de piel se presenta como resultado de heridas o por algunas enfermedades. Cuando la piel presenta afecciones, tales como quemaduras, úlceras por presión, entre otros, no se regenera fácilmente por sí misma, debido a la pérdida de electrolitos, agua y proteínas; la exposición a agentes infecciosos, además de la escasa disponibilidad de piel donante del propio paciente [2-5]. Bajo la ingeniería de tejidos, se han desarrollado diferentes sustitutos dérmicos, apósitos biológicos y sintéticos que facilitan la regeneración tisular al proteger la herida de infecciones, brindar una función temporal en el tejido defectuoso, mientras se regenera y, servir como guía celular para acelerar el proceso de regeneración [6,7].

Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de un material o la combinación de materiales que brinden mejores características que los andamios actuales para el crecimiento celular y que promueva una mejor regeneración de la piel. Para esto se propone la construcción de matrices porosas que simulen las condiciones naturales de la piel con materiales biodegradables que contengan los principales componentes moleculares presentes, de forma natural, en la matriz extracelular de la piel, como el colágeno (Col) y el ácido hialurónico (AH).

El Col es la proteína más abundante presente en el cuerpo humano y, siendo el principal componente de la matriz extracelular de la piel sirve como sustrato natural para la adhesión, proliferación y diferenciación celular [8]. El Col es fácilmente absorbible por el cuerpo y tiene muy baja antigenicidad. Además, es no citotóxico, biocompatible y biodegradable [9]. Una de las desventajas del Col es su pobre resistencia mecánica; sin embargo, esa propiedad puede ser mejorada con la adición de otros materiales como otras proteínas o glicosaminoglicanos. Entre las opciones más prometedoras está el AH, un polisacárido que se encuentra en tejidos blandos de varias especies, es biocompatible, biodegradable y es empleado para promover la movilidad y diferenciación celular en la cicatrización de heridas [10]. El entrecruzamiento químico es una de los métodos más usados para prolongar el tiempo de degradación y mejorar la estabilidad mecánica de los biomateriales. Una forma de lograr esto es por medio de la esterificación de los grupos carboxilos de los biopolímeros con la carbodiimida hidrocloreto EDC.HCl (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto) [10,11].

En este estudio se describe la construcción de matrices de Col y de diferentes combinaciones de Col y AH con el uso de técnicas de liofilización y entrecruzamiento químico. El desempeño de estas matrices es analizado y comparado con análisis de morfología y pruebas *in vitro* de evaluación de degradación. También, se describen las técnicas de evaluación de adhesión y viabilidad de fibroblastos humanos cultivados sobre estas matrices para finalmente determinar cuál de ellas tiene más potencial para el uso en sustitutos dérmicos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de matrices

El AH aislado de cresta de gallo (Sigma, EE.UU.) y el Col aislado de piel de ternero (Sigma, EE.UU.) fueron disueltos al 1% (P/V) en una solución de ácido acético al 0,3% por separado, mediante agitación magnética a 4°C [12,13]. Las diferentes concentraciones con combinaciones de AH y Col se realizaron en proporciones de Col:AH de 10:0, 4:6, 2:8 y 0:10 para analizarlas y hacer comparaciones entre sí. Las mezclas de las matrices en las diferentes concentraciones, se homogenizaron con sonicador (Sonics, EE.UU.) a una amplitud del 60% durante 5 minutos. Las diferentes muestras se sirvieron en moldes metálicos [14] (con un diámetro interno de 19 mm aprox.; tamaño promedio de los platos de cultivo de 24 pozos), y se llevaron a congelación progresiva desde 21°C hasta -20°C y se dejaron por 4 horas para permitir la formación de cristales de hielo en la muestra. Finalmente, éstas fueron liofilizadas (Labconco, EE.UU.) por 24 horas para que a través de la sublimación del hielo se forme un material poroso [15].

Entrecruzamiento de matrices

Las matrices fueron entrecruzadas con la carbodiimida EDC.HCl (Sigma, EE.UU.) para hacer la matriz insoluble en agua y para retardar su degradación hidrolítica. La concentración usada de carbodiimida fue de 50 mM, preparada en una solución de etanol al 95%. Las matrices se sumergieron en esta solución durante 24 horas a temperatura ambiente [11,16]. Luego, fueron retiradas y sumergidas en agua destilada y, con el uso del sonicador (Sonics, EE.UU.) a una amplitud de 20%, se retiraron los residuos del entrecruzante. Finalmente, las matrices entrecruzadas fueron liofilizadas como se indicó previamente.

Cultivo celular

Los fibroblastos fueron aislados de biopsias de piel, bajo protocolos previamente establecidos en el Laboratorio de Biotecnología en Salud del programa de Ingeniería

Biomédica EIA-CES. Los fibroblastos fueron cultivados y mantenidos en condiciones *in vitro* con medio mínimo esencial (MEM, Sigma, EE.UU) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, EE.UU) y con 2% de solución de antibióticos (penicilina/estreptomina) (Gibco, EE.UU). Las células usadas para los experimentos se encontraban entre los pases 10 a 15.

Cultivo celular sobre matrices

Las matrices fueron previamente esterilizadas con luz ultravioleta por 15 minutos cada lado, a una distancia de 10 cm aprox. Luego, se sumergieron en SBF durante una hora, retirando el exceso de éste cuidadosamente al cumplirse el tiempo.

Previo al cultivo, se determinó la concentración celular y se evaluó la viabilidad de éstas, mediante conteo por triplicado en una cámara de Neubauer utilizando el azul de tripano (Amresco, EE.UU) como tinción de exclusión. Un promedio de 100.000 células en una solución de 20 μ l de MEM fue sembrado sobre las matrices en cajas de cultivo de 24 pozos. Las matrices con las células fueron incubadas durante tres horas para permitir la adherencia celular sobre su superficie. Posteriormente, las matrices fueron volteadas para la siembra de las células sobre la otra superficie, a la misma concentración. Las matrices se incubaron nuevamente por 3 horas y finalmente, se completó a 1 ml con MEM suplementado para ser mantenidas a 37°C con 5% de CO₂ durante un día.

Caracterización de matrices

Evaluación de porosidad con SEM e ImageJ

Una vez los fibroblastos se sembraron y se incubaron durante un día, las células en las matrices fueron fijadas y deshidratadas para su observación en SEM (Microscopio electrónico de barrido). Para esto, las matrices fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído al 2,5% a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego, las matrices fueron lavadas con etanol al 50%, 70%, 90% y 95% de forma secuencial durante 15 minutos para cada concentración [17]. Inmediatamente, las matrices fueron sumergidas en etanol al 100% y llevadas al secado de punto crítico para ser finalmente rociadas con oro y visualizadas en SEM.

Las matrices fueron escaneadas en diferentes áreas de la superficie y, en la mayoría de los casos, también se obtuvieron imágenes de ambas superficies (la que estaba en contacto con el fondo del molde y la que no). Estas imágenes luego fueron analizadas con el software ImageJ 1.43u (National Institutes of Health, EE.UU) para determinar el promedio del tamaño de 52 poros de cada uno de los lados de las matrices. Para cada uno de los poros se realizaron mediciones de los diámetros mayor y

menor, ya que éstos no son perfectamente circulares, para obtener el promedio de cada poro.

Evaluación de degradación de matrices con colagenasa tipo I

Las diferentes matrices (Col, (Col:AH) 2:8 y 4:6, cada una por triplicado) fueron sumergidas en una solución de colagenasa tipo I (Gibco, EE.UU) a una concentración de 10 U/ml y llevadas al baño maría a 37°C con agitación suave. Las diferentes soluciones se cambiaron cada cuatro horas. Cada ocho horas, las matrices fueron retiradas de la solución, pasadas a los moldes metálicos, congeladas a -85 °C durante 1 hora, liofilizadas por 17 horas aproximadamente para finalmente ser pesadas y ver su tasa de degradación durante 40 horas.

Evaluación de viabilidad celular sobre matrices: Prueba de MTT (sal de tetrazolio)

Este ensayo se realizó a partir de protocolos estandarizados previamente en el Laboratorio de Biotecnología en Salud. Sobre cada una de las matrices y sus respectivas dos réplicas, se sembraron 40.000 células siguiendo el procedimiento descrito en el apartado “Cultivo de células sobre matrices”. Para la evaluación de la viabilidad celular sobre las matrices sólo se cultivaron células por uno de los lados de éstas. Las matrices sembradas se incubaron por 24 horas. Luego se agregó MTT disuelto en MEM a una concentración final de 5 mg/ml a cada pozo y se dejó actuar por 3 horas bajo incubación a 37°C. El MTT fue aspirado, y los cristales de formazán producidos fueron solubilizados con dimetilsulfóxido (DMSO) y, una vez la solución se tornó púrpura, se llevó al espectrofotómetro para leer las respectivas absorbancias a una longitud de onda de 550 nm. Se realizó un control positivo con 40.000 células sembradas en monocapa por triplicado. Como control negativo, se sembraron 40.000 células sembradas por triplicado a las que se les agregó al día siguiente una solución de Metil metanosulfonato (MMS, Sigma, EE.UU), en una dosis que se espera que afecte la viabilidad de aproximadamente la mitad de ellas. El MMS es un mutágeno que reacciona directamente con el ADN introduciendo un grupo metil dentro de la cadena, induciendo así la apoptosis celular [18]. El número de fibroblastos viables se determinó a partir de la curva de calibración construida en un rango entre 0 células y 80.000 células con tres réplicas. La curva de calibración se realizó por duplicado.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas ANOVA, utilizando *Statgraphics Centurion XV* (versión 15.1.02, Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). Valores $p < 0,05$ se consideran significativos.

III. RESULTADOS

Caracterización de matrices

Análisis de porosidad

Las matrices fabricadas tienen una estructura tridimensional esponjosa con un diámetro aproximado de 15 mm y con 5 mm de espesor (Fig. 1).

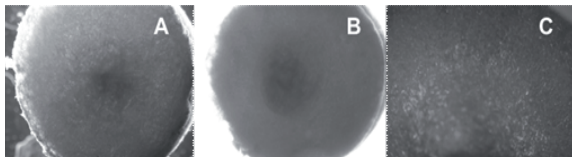


Fig. 1. Estructura esponjosa de las matrices entrecruzadas con EDC.HCl apreciada mediante un estereoscopio. (A) Matriz de 2:8, 1X. (B) Matriz de AH, 1X. (C) Matriz de Col, 1.5X.

La porosidad de las diferentes matrices, apreciada con SEM, es homogénea en la superficie. La Fig. 2 muestra imágenes representativas tanto de la superficie de las matrices antes de entrecruzar de 2:8 (Fig. 2A), AH (Fig. 2B) y Col (Fig. 2C) como de la superficie de las matrices después del entrecruzamiento químico de 2:8 (Fig. 2D), AH (Fig. 2E) y Col (Fig. 2F). Estas imágenes revelan una red de poros interconectados y de alta porosidad; características indispensables en las matrices con aplicaciones en cultivos celulares, las cuales facilitan el crecimiento de células a través de toda la matriz y la difusión de nutrientes. Así mismo, se puede apreciar, a través de los poros superficiales, que la morfología porosa se encuentra distribuida al interior de la matriz.

Cabe anotar que la morfología de las matrices difiere cuando están en contacto con el fondo del molde de aluminio. Esta zona de las matrices es más plana y con menos poros que la superficie (imágenes no mostradas).

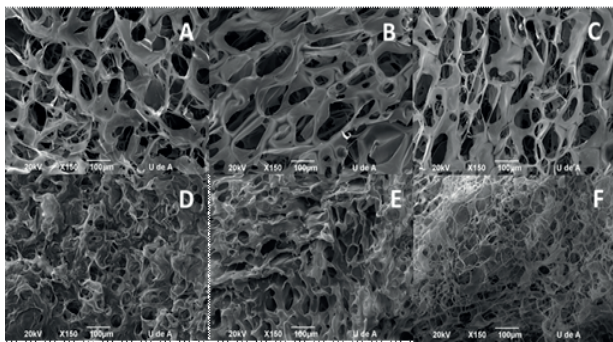


Fig. 2. Morfología de las matrices obtenidas con SEM. (A - C) Matrices de 2:8, AH y Col respectivamente sin entrecruzamiento químico. (D - F) Matrices de 2:8, AH y Col entrecruzadas con 50 mM de EDC.HCl respectivamente.

A partir de las imágenes obtenidas y las mediciones de los poros de las matrices con ImageJ, se observa que el tamaño de poro antes de entrecruzar las matrices es de aproximadamente 80 μm (Fig. 2 A - C y Fig. 3) y, luego que las matrices son entrecruzadas con 50 mM EDC.HCl, el tamaño de poro se reduce a 50 μm aproximadamente en los tres tipos de matrices (Fig. 2 D - F y Fig. 3)

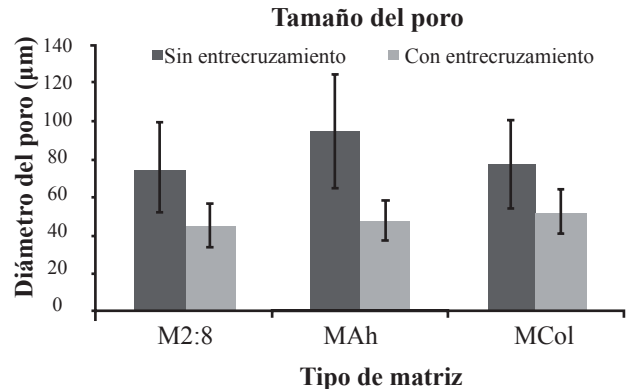


Fig. 3. Medición de diámetro de poros de las diferentes matrices, entrecruzadas y no entrecruzadas. Se representa el promedio de 52 poros de cada tipo de matriz \pm la desviación estándar.

Prueba de degradación con colagenasa tipo I

En la Fig. 4 se presentan el perfil de degradación de las matrices de Col (MCol), 2:8 (M2:8) y 4:6 (M4:6) en solución de colagenasa tipo I con una concentración de 10 U/ml en baño María a 37°C y con agitación leve.

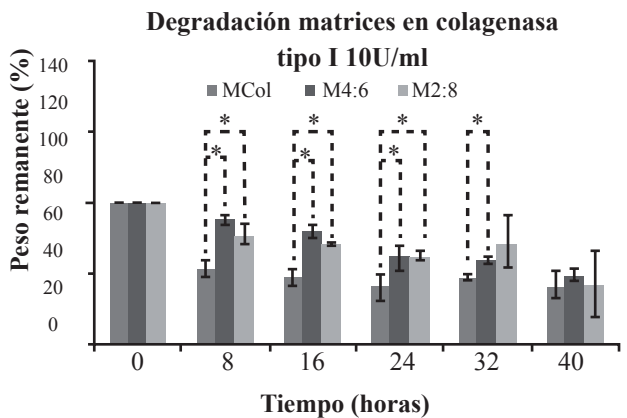


Fig. 4. Curva de degradación de las matrices entrecruzadas con 50 mM EDC.HCl de Col (MCol), 2:8 (M2:8), 4:6 (M4:6) en colagenasa tipo I con una concentración de 10 U/ml. Se presenta el promedio del peso de tres matrices de cada tipo en cada uno de los puntos en el tiempo \pm la desviación estándar. El * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la matriz control (Col) y las matrices prueba (4:6 y 2:8).

Como se puede observar en la Fig. 4, las matrices MCol, M4:6 y M2:8 sumergidas en la solución con colagenasa, comenzaron a disminuir su peso

progresivamente. En los puntos iniciales en el tiempo de degradación, la matriz Col pierde significativamente mayor peso en comparación con los otros tipos de matrices que tienen AH (M4:6 y M2:8). Sin embargo, cuando las matrices llevan 32 horas en adelante en la solución, los pesos de las matrices quedan similares y no se presenta diferencia significativa quedando, después de 40 horas en incubación y agitación, con un porcentaje de su peso inicial promedio de $71,43 \pm 4,75$ para MCol, $75,06 \pm 2,82$ para M4:6 y $71,22 \pm 11,17$ para M2:8.

Cultivo celular sobre matrices y análisis de adherencia celular

Las matrices AH, Col, y las combinaciones Col:AH (2:8 y 4:6) fueron evaluadas por su capacidad para permitir la adherencia de fibroblastos. Después de dejar las matrices con los fibroblastos durante 24 horas en incubación, se encontró que la matriz de AH estaba completamente disuelta mientras que el resto de las matrices seguían intactas. Durante el proceso de fijación y deshidratación, necesarios para las observaciones en SEM, las matrices de la proporción 4:6 se disolvieron completamente al contacto con el glutaraldehído. Sólo las matrices Col y la proporción 2:8 soportaron el procedimiento completo. Ambos tipos de matrices fueron visualizadas mediante SEM, por ambas superficies. Se encontró que en las matrices Col había células adheridas con morfología fibroblastoide similar a la que adquieren estas células al adherirse en cultivos de monocapa. Los fibroblastos se encontraron tanto en la superficie porosa como en la lisa de la matriz (Fig. 5).

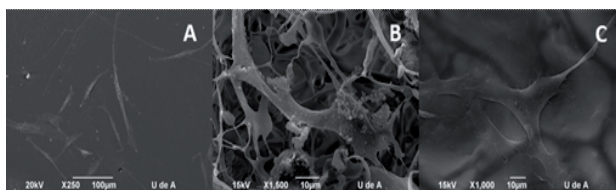


Fig. 5. Fibroblastos adheridos en platos de cultivo y matrices Col. (A) Morfología de fibroblastos cultivados en monocapa. (B) Fibroblastos adheridos a la superficie porosa de matriz de colágeno. (C) Fibroblastos adheridos a superficie lisa de matriz de colágeno.

Por otro lado, en las matrices de la proporción 2:8 no se encontraron células en ninguna de las tres réplicas, ni por el lado poroso ni por el liso. Para confirmar estas observaciones, se realizó otro experimento tiñendo las células adheridas sobre matrices con Giemsa al 7% (en este experimento se evaluó también la adherencia celular sobre las matrices

4:6). En esta prueba, confirmando los hallazgos en SEM, se encontró una morfología fibroblastoide en las células cultivadas sobre las matrices Col y una morfología redondeada en las células de las matrices 2:8 y 4:6 (Fig. 6).

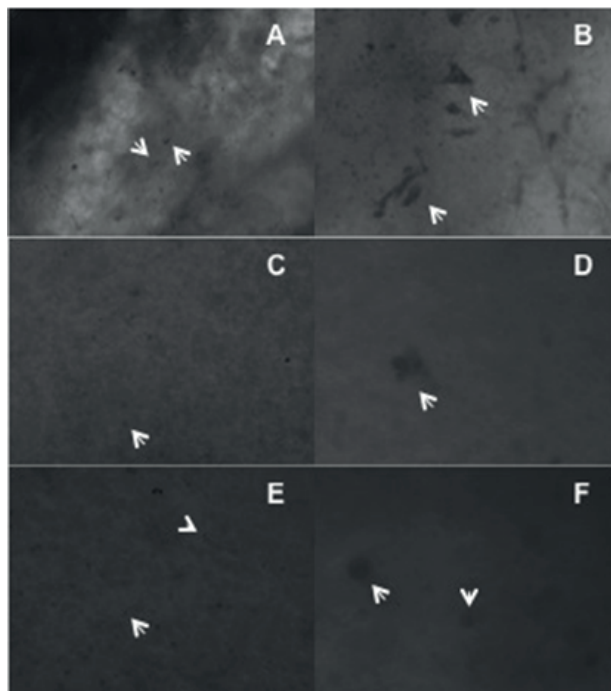


Fig. 6. Fibroblastos cultivados sobre matrices por 24 horas. Tinción Giemsa 7%. (A, B) matrices Col, las flechas denotan morfología celular con prolongaciones. (C, D) matrices 2:8, las flechas denotan células con morfología circular. (E, F) matrices 4:6, las flechas denotan células con morfología circular. Amplificación: (A, C, E) 10X. (B, D, F) 40X.

Evaluación de viabilidad celular sobre matrices: Prueba de MTT

En la Fig. 7 se grafican los resultados de este experimento. Aquí se aprecia la comparación de los valores de la media para cada tipo de matriz en triplicado y sus rangos de valores. También se muestra la diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (las cajas que se traslapan no son significativamente diferentes y las que no se traslapan son significativamente diferentes con un valor $p > 0,05$). Los valores que representan el promedio del número de células viables después de 24 horas de cultivo sobre cada tipo de matriz son: 93.159 ± 24.504 células viables para el control positivo (cultivo en monocapa, C+), 46.149 ± 21.052 para el control negativo (cultivo en monocapa con el mutágeno MMS, C-), 37.040 ± 3.322 para la matriz 2:8 (M2:8), 37.691 ± 11.917 para la matriz 4:6 (M4:6) y finalmente, 75.917 ± 18.563 para la matriz Col (MCol). Hay diferencias significativas entre C+ y C-; C+ y M2:8, C+ y M4:6, MCol y M2:8 y por último, entre MCol y M4:6.

Se puede ver también en la Fig. 7, que el número de células viables en C+ es alrededor del doble de las halladas en C-: 93.159 células para C+ y 46.149 células para C-. Demostrando que el mutágeno MMS sí provocó una reducción del número de células viables cercano a la mitad.

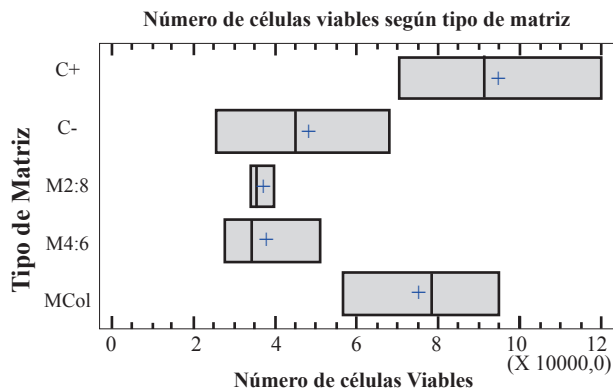


Fig. 7. Comparación del número de células viables a las 24h después de cultivar una densidad celular inicial de 40000 células sobre cada tipo de matriz. También se aprecia el número de células viables de los controles positivos (C+) y negativos (C-).

El aumento en la proliferación de células cultivadas en monocapa (C-) después de un día fue de más del doble: pasando de 40.000 células a 93.159 células. De forma similar, las células cultivadas en MCol aumentaron casi el doble: de 40.000 células a 75.916 células. Sin embargo, el número de células viables en M2:8 y M4:6, fue muy cercano al número de células sembradas el día anterior y a las células viables del control positivo: 37.040 células y 37.690 células para M2:8 y M4:6, respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

Se cree que la arquitectura de la matriz contribuye significativamente al desarrollo de funciones específicas en el tejido, proporcionando una organización espacial y condiciones nutricionales apropiadas para el crecimiento celular. La regeneración de tejidos específicos es dependiente en gran parte, de la porosidad y el tamaño de poro de la estructura tridimensional que sirve como soporte celular [19]. Una gran superficie de área favorece la adhesión y crecimiento de células, mientras que un tamaño de poro grande permite que las células puedan migrar a través de los poros y acomodar un número apropiado de células para la reparación del tejido [14,19]. Los biomateriales que son altamente porosos, además,

favorecen la difusión de nutrientes, el desecho de productos y la vascularización [19].

El tamaño de poro de la matriz a fabricar es dependiente del tamaño de las células a sembrar [14]. Mientras que los resultados arrojados en esta investigación, muestran que el diámetro de poro promedio de las matrices de 2:8, AH y Col entrecruzadas con 50 mM EDC.HCl se encuentra alrededor de los 50 μm ; la bibliografía sugiere que para matrices porosas con aplicaciones en sustitutos de piel, el rango del tamaño de poro ideal debería oscilar entre los 100 μm y 200 μm [20,21]. Por lo tanto, es necesario hacer más pruebas en la fabricación de las matrices con variaciones tanto en la temperatura y tiempo de congelación de la muestra como en los tiempos de liofilización para obtener matrices con un tamaño de poro ideal para este tipo de aplicaciones.

El hecho de que las matrices con AH (2:8 y 4:6) tengan una mayor resistencia a la degradación en presencia de colagenasa al inicio de la prueba en comparación con la matriz Col, puede sugerir que la red compuesta de moléculas de Col y AH, entrecruzada con EDC.HCl, puede ser más resistente a la degradación en presencia de colagenasa que la red de sólo moléculas de Col entrecruzadas con EDC.HCl. Sin embargo, tal pareciera que el AH se degrada con el tiempo quedando sólo las moléculas de Col y por lo tanto, ya a las 32 horas de la prueba de degradación, las matrices de los tres tipos se asemejan en sus pesos. Sin encontrar por lo tanto, un cambio contundente entre las matrices con presencia de AH y las que no lo tienen.

Las células cultivadas en matrices 2:8 y 4:6 presentaron una adherencia celular con morfología redondeada indicando posiblemente que las células se encuentran en estado de estrés y no se han adherido adecuadamente a la matriz durante el período de un día en cultivo.

Debido a que los fibroblastos adquieren su morfología típica cuando son sembrados en la matriz Col, pareciera que el AH es el factor que determina la morfología redondeada en las matrices Col:AH.

Sería adecuado establecer por medio de otros experimentos cómo la adherencia de los fibroblastos evoluciona en el tiempo.

Las propiedades estructurales del colágeno dependen de la retención de su estructura original [22]. Debido a que para obtener una homogenización entre las soluciones de Col y AH éstas se debieron someter a largos tiempos en el sonicador, esto pudo haber inducido un daño en las fibras de Col y que, una vez fueron sembrados los fibroblastos en estas matrices, no se permitió una correcta adhesión celular. Además, colágenos altamente hidratados tienden a reducir las funciones del soporte por la pérdida de sus

propiedades mecánicas y lo que se ve reflejado en una pobre regeneración del tejido [22] o, como en este caso baja adhesión y proliferación celular.

El hecho de que por un lado los fibroblastos cultivados tanto en Col como en cultivo de monocapa hayan duplicado su densidad celular luego de 24 horas en cultivo y, que por otro lado, los fibroblastos cultivados en 2:8 y 4:6 hayan mantenido su concentración celular similar a la que se cultivó en día anterior, puede indicar que 2:8 y 4:6 no promueven la proliferación de los fibroblastos durante el primer día de cultivo, sugiriendo que el AH puede interferir de alguna manera en el estado proliferativo de las células durante este tiempo.

Estos resultados tienen relación con la caracterización de adhesión celular en las matrices, en donde se encontró una mejor adherencia celular sobre las matrices Col, y cuya viabilidad fue comprobada con el ensayo de MTT; mientras que para las matrices 2:8 y 4:6, las pocas células encontradas presentaban morfología redondeada, indicando que las condiciones de adherencia y el microambiente generado no son los más óptimos para inducir procesos de proliferación sobre las células el primer día de cultivo, aun cuando la matriz permite el sostenimiento de algunas células viables.

Aunque Col es ampliamente conocido por brindarle un sostén estructural a las células [23], estudios previos reportan que el uso de matrices de sólo Col como sustento celular no es suficiente para mantener un ambiente húmedo, especialmente para aplicaciones en el tratamiento de úlcera crónica [24]. Kuroyanagi *et al.* por ejemplo, han demostrado que el uso de matrices de Col en combinación con AH (con una proporción Col:AH de 2:5, proporción muy similar a las realizadas en este experimento) en experimentos con animales y pacientes ayudan a promover una mejor cicatrización y mantener un ambiente húmedo en las heridas en comparación con la matriz de Col solo [24-26].

Por otro lado, Park *et al.* construyeron matrices con una proporción de Col:AH de 8:2, las cuales demostraron los mejores efectos en la proliferación y migración celular comparados con otras matrices en experimentos in vitro. Sin embargo, esta matriz fue comparada con otra de colágeno en experimentos in vivo y no se encontraron efectos del AH en la reducción de heridas [13].

Aunque sería importante realizar experimentos adicionales de viabilidad de fibroblastos cultivados sobre matrices Col:AH durante tiempos más prolongados en cultivo que confirmen definitivamente si el AH inhibe la adhesión y proliferación de estas células o no; los resultados de esta investigación demuestran que la presencia de AH en una matriz de Col tridimensional

porosa en lugar de mejorar la adhesión y proliferación de fibroblastos con respecto a las matrices de sólo Col, no permite una buena adhesión celular y por ende inhibe la proliferación.

V. CONCLUSIÓN

En conclusión, se demuestra que entre las diferentes matrices construidas en esta investigación, las matrices de colágeno presentan el mejor soporte para ser empleado como sustituto dérmico ya que además de tener una arquitectura porosa y tasa de degradación similar a las matrices de la combinación Col:AH, brindan un sustento óptimo para la adhesión y proliferación de fibroblastos, permitiendo la formación de una estructura tridimensional que se asemeja a la estructura dérmica.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias, y por el programa de Ingeniería Biomédica EIA-CES. Se agradece también a los docentes del convenio EIA - Universidad CES, Andrés Pareja López por su asesoría en el ensayo de MTT, Marta Elena Londoño López por su ayuda en los ensayos de degradación. Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1]. Voet D. En: Biochemistry. New York: J. Wiley; 1995. p. 264-275.
- [2]. Gartner L. En: Texto Atlas de Histología. México: McGraw-Hill; 2002. p. 69-81, 120-121.
- [3]. Sosa-Serrano AF, Álvarez-Díaz C de J, Cuenca-Pardo J, Juárez-Aguilar E, Kuri-Harcuch W. Tratamiento de Quemaduras de Espesor Total Mediante Autoinjertos Mallados Cubiertos con Aloinjertos Criopreservados de Epidermis Humana Cultivada In Vitro. Reporte de un caso. *Cirugía Plástica*. 1999; 9(3):126-129.
- [4]. Souto LRM, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MHS, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Med J*. 2006 Mar 2; 124(2):71-76.
- [5]. Concha M. M, Vidal V. A, Salem Z. C. Producción de equivalentes dermo-epidérmicos autólogos para el tratamiento de grandes quemados y cicatrices queloides. *cuad.cir*. 2002 Dic; 16(1):41-47.
- [6]. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell. Mol. Med*. 2005 Sep; 9(3):592-608.
- [7]. Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002 Oct; 23(20):4095-4103.
- [8]. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007 Ago; 32(8-9):762-798.

- [9]. Lee C. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001 Jun; 221(1-2): 1-22.
- [10]. Xuejun X, Netti PA, Ambrosio L, Nicolais L, Sannino A. Preparation and Characterization of a Hydrogel from Low-Molecular Weight Hyaluronic Acid. *J bioact compat pol*. 2004 Ene; 19(1): 5-15.
- [11]. Tomihata K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J. Biomed. Mater. Res*. 1997 Nov; 37(2):243-251.
- [12]. Yan J, Li X, Liu L, Wang F, Zhu TW, Zhang Q. Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2006; 34(1):27-39.
- [13]. Park S-N, Lee H-J, Lee K-H, Suh H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomaterials*. 2003 Abr;24(9):1631-1641.
- [14]. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2004 Mar; 25(6):1077-1086.
- [15]. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of The Royal Society Interface*. 2007 Dic; 4(17):999-1030.
- [16]. Park S-N, Park J-C, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*. 2002 Feb; 23(4):1205-1212.
- [17]. Nieponice A, Soletti L, Guan J, Hong Y, Gharaibeh B, Maul TM, et al. In Vivo Assessment of a Tissue-Engineered Vascular Graft Combining a Biodegradable Elastomeric Scaffold and Muscle-Derived Stem Cells in a Rat Model. *Tissue Engineering Part A*. 2010 Abr; 16(4):1215-1223.
- [18]. Jiang MC, Liang HJ, Liao CF, Lu FJ. Methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide differentially regulate p53 accumulation in hepatoblastoma cells. *Toxicol. Lett*. 1999 Jun 1; 106(2-3):201-208.
- [19]. Yang S, Leong K-F, Du Z, Chua C-K. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*. 2001 Dic; 7(6):679-689.
- [20]. Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science*. 2001 Ene; 46(3-4):273-282.
- [21]. Ahn S, Yoon H, Kim G, Kim Y, Lee S, Chun W. Designed three-dimensional collagen scaffolds for skin tissue regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Oct; 16(5):813-820.
- [22]. Widgerow AD. Attaining structural success in biologic skin substitutes. *Annals of Plastic Surgery*. 2012 June; 68(6):568-573.
- [23]. Kuroyanagi Y, Yamada N, Yamashita R, Uchinuma E. Tissue-engineered product: allogeneic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts. *Artif Organs*. 2001 Mar; 25(3):180-186.
- [24]. Kubo K, Kuroyanagi Y. Characterization of a cultured dermal substitute composed of a spongy matrix of hyaluronic acid and collagen combined with fibroblasts. *J Artif Organs*. 2003; 6(2):138-144.
- [25]. Kubo K, Kuroyanagi Y. Spongy matrix of hyaluronic acid and collagen as a cultured dermal substitute: evaluation in an animal test. *J Artif Organs*. 2003; 6(1):64-70.
- [26]. Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H, Kim HJ, Numari S, Mabuchi Y, et al. Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs*. 2004 Ene; 28(1):13-21.