



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**ELABORACIÓN DE MEMBRANAS DE COLÁGENA TIPO I  
ENTRECRUZADA CON EDC COMO SUSTITUTO  
CUTÁNEO**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA:  
MARÍA LUISA DEL PRADO AUDELO**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**COMITÉ TUTOR:  
DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. EDGAR BENJAMÍN MONTUFAR JIMÉNEZ  
CENTRAL EUROPEAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY**

**CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mi mamá, María Estela Audelo Vucovich. Por ser mi principal motor; por enseñarme, día a día, que es mejor seguir luchando que rendirse.*

*A mi compañero de aventuras, Carlos Arturo Reyes Ruíz. Por estar siempre a mi lado y recordarme que la vida no se debe tomar tan en serio.*

# CONTENIDO

---

<b>Contenido.....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Abreviaturas .....</b>	<b>vi</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>viii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xi</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Planteamiento del problema y justificación.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>16</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
1.1 PIEL .....	17
Epidermis.....	18
Dermis .....	19
Hipodermis .....	20
Anexos cutáneos .....	21
1.1.1 LESIONES DE LA PIEL .....	22
Cicatrización de heridas.....	22
Quemaduras .....	23
Heridas crónicas .....	24
1.2 SUSTITUTOS CUTÁNEOS .....	26
1.2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS .....	27
1.3 COLÁGENA.....	29
Síntesis in vivo de colágena.....	32
Estructura de la colágena .....	34
Colágena como biomaterial .....	36
2.4 ENTRECruzamiento.....	37

<b>MÉTODO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>39</b>
2.1 Extracción y purificación de colágena tipo I.....	39
Extracción de colágena.....	39
Purificación de la proteína.....	40
2.1.1 Caracterización de la proteína.....	41
Cuantificación de hidroxiprolina.....	41
Electroforesis.....	43
2.2 Elaboración y entrecruzamiento de andamios.....	43
2.2.1 Caracterización fisicoquímica de andamios COL-EDC.....	44
Morfología.....	44
Espectroscopia Infrarroja.....	45
Análisis Térmico.....	45
Prueba de absorción.....	45
Degradación enzimática.....	46
2.2.2 Caracterización biológica de los andamios COL-EDC.....	47
Cultivo celular.....	47
Esterilización de andamios.....	48
Viabilidad y proliferación celular.....	48
Morfología celular.....	49
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
3.1 Caracterización de la proteína.....	50
Cuantificación.....	50
Electroforesis.....	51
3.2 Caracterización fisicoquímica de andamios COL-EDC.....	52
Análisis térmico.....	56
Degradación enzimática.....	57
3.3 Caracterización biológica de andamios COL-EDC.....	58
Viabilidad y Proliferación celular.....	58
Morfología celular.....	59
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>72</b>
<b>Apéndice A .....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.1</b> Corte transversal de la piel.....	17
<b>Figura 1.2</b> Clasificación de quemaduras .....	24
<b>Figura 1.3</b> Síntesis de la colágena .....	33
<b>Figura 1.4</b> Estructura de la colágena .....	34
<b>Figura 1.5</b> Reacción de entrecruzamiento de colágena tipo I mediante carbodiimidas .....	38
<b>Figura 2. 1</b> Extracción de colágena tipo I.....	40
<b>Figura 2. 2</b> Purificación de colágena tipo I.....	41
<b>Figura 2. 3</b> Esquema del procedimiento aplicado para la obtención de andamios COL-EDC .....	44
<b>Figura 2. 4</b> Prueba de absorción .....	46
<b>Figura 2. 5</b> Aislamiento de fibroblastos dérmicos.....	47
<b>Figura 2. 6</b> Esquema representativo del comportamiento del agente alamarblue al estar en contacto con células viables .....	49
<b>Figura 3. 1</b> Curva de calibración de hidroxiprolina.....	50
<b>Figura 3. 2</b> Patrón electroforético de colágena extraída de tendón de Aquiles bovino.....	51
<b>Figura 3. 3</b> Andamios de colágena tipo I obtenidos mediante liofilización y entrecruzadas con diferentes concentraciones de EDC.....	52
<b>Figura 3. 4</b> Imágenes de la sección superficial de los andamios COL-EDC.....	53
<b>Figura 3. 5</b> Sección transversal de los andamios COL-EDC .....	54
<b>Figura 3. 6</b> Espectros IR de andamios COL-EDC.....	55
<b>Figura 3. 7</b> Termograma de andamios COL-EDC.....	56
<b>Figura 3. 8</b> Degradación enzimática de andamios COL-EDC. ....	57
<b>Figura 3. 9</b> Fibroblastos teñidos con cristal violeta al 0.5%.....	58
<b>Figura 3. 10</b> Ensayo con AlamarBlue a las 18 horas de cultivo.....	59

<b>Figura 3. 11</b> Efecto de los andamios COL-EDC en la proliferación de fibroblastos humanos.....	60
<b>Figura 3. 12</b> Morfología celular de fibroblastos sembrados en COL-EDC.....	61
<b>Figura 3. 13</b> Producción de matriz fibrosa en 35 mM (A) y 55 mM (B) observada a las 24 horas de cultivo.....	62
<b>Figura A. 1</b> Partes de un gel de SDS-PAGE .....	81
<b>Figura A. 2</b> Esquema de un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier.....	82
<b>Figura A. 3</b> Espectro de absorbancia del Ácido Láctico (A). Espectro de transmitancia del Ácido Láctico (B).....	84
<b>Figura A. 4</b> Montaje de un experimento de Calorimetría Diferencial de Barrido.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1</b> Tipos de colágenas .....	30
<b>Tabla 2</b> Concentración de colágena.....	51
<b>Tabla 3</b> Porosidad relativa y tamaño de poro de andamios COL-EDC.....	53
<b>Tabla 4</b> Posición de las bandas de IR en andamios COL-EDC.....	54
<b>Tabla 5</b> Porcentaje de absorción de PBS en andamios COL-EDC.....	56

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Gly	Glicina
FACIT	Colágenas asociadas a fibrillas con triples hélices interrumpidas (por sus siglas en inglés)

MACIT	Colágenas asociadas a membrana con triples hélices interrumpidas (por sus siglas en inglés)
MULTIPLEXIN	Múltiples dominios de triple hélice e interrupciones (por sus siglas en inglés)
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RGD	Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
pDAB	4-Dimetilaminobenzaldehído
COL-EDC	Andamios de colágena tipo I entrecruzados con EDC a diferentes concentraciones (0, 35, 45 y 55 mM)
COL	Andamio de colágena tipo I sin entrecruzar
35 mM	Andamio de colágena tipo I entrecruzado con 35 mM de EDC
45 mM	Andamio de colágena tipo I entrecruzado con 45 mM de EDC
55 mM	Andamio de colágena tipo I entrecruzado con 55 mM de EDC
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
PBS	Phosphate Buffered Saline
Tris-HCl	Buffer de Tris(hidroximetil)aminometano y Ácido clorhídrico
MEM	Minimum Essential Media
IR	Infrarrojo
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido
T <sub>d</sub>	Temperatura de desnaturalización
MMP	Metaloproteinasas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
FP	Filipodios
FE	Forma Esférica
PM	Peso Molecular
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
SDS	Dodecil-Sulfato de Sodio
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis

# AGRADECIMIENTOS

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a el Instituto de Investigaciones en Materiales por hacer posible el desarrollo de este proyecto profesional.

A la Dra. María Cristina Piña Barba por su gran interés y asesoría durante la realización de este trabajo. Por sus consejos científicos y de vida. Por estar ahí siempre que la necesité, como asesora y como amiga.

A mi comité tutor: Dr. Andrés E. Castell Rodríguez y Dr. Edgar Benjamín Montufar Jiménez; por sus innumerables consejos, por su paciencia y por su colaboración.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada (CVU 346323). A DGAPA-UNAM y CONACyT por la financiación recibida a través de los proyectos: PAPIIT-IG100114 por parte de DGAPA-UNAM; y 214128 por parte de CONACyT.

Al Q. Miguel Canseco Martínez por su cordial apoyo para los espectros de FT-IR y DSC. Al Biol. Armando Zepeda y a Francisco Pasos del laboratorio de microscopía de la Facultad de Medicina, UNAM; por su ayuda con las imágenes de microscopía y por su disposición con el análisis de las mismas. A Josué Esaú Romero Ibarra por su valioso apoyo en la obtención de algunas imágenes de microscopía. A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por su incondicional apoyo y asesoría en la elaboración de todas las pruebas

biológicas. A la Biol. Olivia Reynoso Ducoing, por su cordial apoyo en la realización de las pruebas de electroforesis. Al M. en C. Héctor Martínez Hernández por la realización y modificación de las imágenes utilizadas en esta tesis, mediante el programa CorelDraw.

Al departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, a cargo del Dr. Andrés E. Castell R.; por la donación de fibroblastos humanos para su utilización en todas las pruebas biológicas llevadas a cabo en este trabajo.

Quiero agradecer a todas las personas que directa o indirectamente me ayudaron a llegar al final de este largo, difícil pero muy divertido camino. A mi mamá, porque sin su apoyo nada de esto habría sido posible. A Carlos, por su ayudarme siempre que lo necesité.

A mis maniwis, las que han estado en todo momento, las que me han apoyado, aconsejado y otras veces, regañado. Por estar siempre pendiente de mí y de mi avance en la ciencia. Gracias a Uds., Rosita, Lidia, Bobadín, Likinaka, Kisoyu, Antonela, Ximenita; y sobre todo a ti, Natalio, por estar toda la vida a mi lado.

A todos en el laboratorio de Biomateriales; en especial a mis amiguitos (mis manitos) el M. en C. Héctor Martínez (Hectoriwis), la Dra. Nayeli Rodríguez y al Dr. David Giraldo, por interesarse en el progreso de este proyecto, por su ayuda incondicional y por su invaluable amistad; por los momentos de risa y de llanto, sin ustedes estudiar el doctorado no hubiera tenido el mismo significado.

Y a todos los que se fueron sumando a este esfuerzo a lo largo de estos cuatro años.

¡GRACIAS!

Por mi raza hablará el espíritu.

La piel es el órgano más grande del cuerpo y está compuesto por tres capas, la epidermis, la dermis y la hipodermis; así como por nervios y apéndices cutáneos. La pérdida de gran parte de piel, ya sea relacionada con una enfermedad o lesión, no sólo afecta la apariencia del paciente, sino que también puede provocar una infección fatal e incluso causar la muerte. Por lo tanto, la necesidad de sustitutos de la piel para la cicatrización de heridas ha incrementado la ingeniería de tejidos de piel y promovido el desarrollo de andamios biomiméticos para la piel. Un andamio ideal, utilizado para la ingeniería de tejidos de piel, debe tener ciertas características, por ejemplo presentar una excelente biocompatibilidad, una microestructura apropiada para permitir la viabilidad celular, poseer biodegradabilidad controlable, así como propiedades mecánicas adecuadas.

La colágena ha sido ampliamente utilizada como andamio debido a su alta biocompatibilidad, baja respuesta antigénica y altas propiedades directas de adhesión celular. Se han identificado al menos 28 tipos diferentes de colágena, a la fecha. Cada tipo difiere en la secuencia de aminoácidos, la estructura y función, pero todos los tipos de colágena constan de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas que presentan el motivo de repetición Gly-XY, donde, por lo general, la X representa a la prolina y la Y a la hidroxiprolina. La colágena tipo I es una molécula ampliamente estudiada en el campo de los biomateriales ya que es el tipo más común de colágena y es la principal proteína de todo el tejido conjuntivo, tales como hueso, tendón, cartílago y la piel.

Sin embargo, los usos de la colágena como biomaterial para aplicaciones de ingeniería de tejidos están severamente limitados por su alta susceptibilidad a la degradación enzimática *in vivo* y baja termoestabilidad. Como resultado de ello, es necesario mejorar la estabilidad térmica, mecánica y enzimática de la colágena. Esto puede lograrse mediante el entrecruzamiento químico, el cual se logra, generalmente, con la introducción de enlaces covalentes en la estructura de colágena utilizando una variedad de agentes. El glutaraldehído se ha utilizado ampliamente como agente de entrecruzamiento, pero está asociado con efectos de citotoxicidad, reducción de crecimiento celular *in vitro* e *in vivo* y, a menudo, induce la mineralización en los tejidos. El entrecruzante 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) es conocido por ser un agente suave y soluble en agua; por lo tanto, se ha convertido en un reactivo de entrecruzamiento popular para las proteínas. El entrecruzamiento con EDC activa grupos carboxilo del ácido glutámico/aspártico de la colágena, seguido por la aminólisis de un intermediario (O-acilisourea) mediante los grupos amino de los residuos de hidroxilisina para inducir la formación de enlaces covalentes. El objetivo de este estudio fue desarrollar andamios de colágena tipo I mejorando sus propiedades mediante el entrecruzamiento químico con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para ser utilizados en ingeniería de tejidos de piel. Los andamios de colágena tipo I fueron entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC (0, 35, 45 y 55 mM) y se caracterizaron en términos de morfología, comportamiento térmico, estructura química, degradación enzimática. Asimismo, el comportamiento biológico fue estudiado analizando la interacción de fibroblastos humanos con andamios entrecruzados mediante pruebas de viabilidad, proliferación y morfología celular.

Se obtuvieron andamios altamente porosos con una estructura interconectada; los andamios entrecruzados mostraron una menor degradación enzimática y una mayor estabilidad térmica que el andamio de colágena sin entrecruzar. Las pruebas biológicas demostraron que el tratamiento con EDC no es citotóxico y que los andamios siguen siendo biocompatibles después del entrecruzamiento.

## ABSTRACT

---

Skin is the largest organ of the body and it is composed of epidermis, dermis, and hypodermis layers, appendages and a complex nerve and blood supply. Loss of large part of skin, be it related to illness or injury, would not only affect the appearance of the patient, but also leads to fatal infection and may even cause death. Thus, the necessity of skin substitutes for wound healing has increased skin tissue engineering efforts and promoted development of biomimetic skin scaffolds. An ideal scaffold used for skin tissue engineering should present some characteristics such as an excellent biocompatibility,

appropriate microstructure (100–200  $\mu\text{m}$  mean pore size and above 90% of porosity) to permit cell viability, controllable biodegradability as well as suitable mechanical properties. Collagen has been widely used as scaffold due to its high biocompatibility, low antigenic response and high direct cell adhesion properties. At least 29 different types of collagen have been identified. Each type differs in amino sequence, structure and function, but all collagens consist of three intertwined polypeptide chains and present Gly-X-Y repeating units, where X is usually proline and Y hydroxyproline groups. Type I collagen is a widely studied molecule in biomaterials field because it is the most common type of collagen and it is the major protein of all connective tissue, such as bone, tendon, cartilage and skin.

The use of collagen as a biomaterial for tissue engineering applications are, however, severely limited by its lacks physicochemical and mechanical properties, such as high susceptibility to enzymatic degradation *in vivo* and low thermostability. As a result, the enhancement of thermal, mechanical and enzymatic stability of collagen is needed.

The most used crosslinking method is usually made by the introduction of covalent bonds in collagen structure with a wide variety of agents. Glutaraldehyde has been extensively used as crosslinker, but it is associated with cytotoxicity effects, reduced cellular ingrowth *in vitro* and *in vivo* and, often, induced mineralization in tissues. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) is known to be a mild and water-soluble crosslinker, therefore, has become a popular crosslinking reagent for collagen. EDC crosslinking method activates carboxyl groups of glutamic/aspartic acid residues of collagen, followed by aminolysis of the O-acylisourea intermediate by the amino groups of hydroxylysine residues to induce the formation of covalent amine bonds. The objective of this study was to develop scaffolds of collagen enhanced its properties by chemical crosslinking with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) for skin tissue engineering. Collagen scaffolds were obtained by changing crosslinking conditions using different concentrations of EDC (0, 35, 45 and 55 mM). Obtained crosslinked collagen scaffolds were characterized in terms of morphology, thermal behavior, structure, enzymatic degradation, and also in terms of biological behavior (cell viability, proliferation and morphology).

# INTRODUCCIÓN

---

Las lesiones son fisuras en la estructura de la piel que pueden comprometer su función. Las principales lesiones de la piel son las quemaduras; teniendo un alto índice de incidencia en niños. Otro tipo de lesión importante que se presenta en la piel son las llamadas heridas o lesiones crónicas. Estas, son lesiones que no completan el proceso de curación de la piel (es decir, la restauración tanto del tejido perdido como de la función), dentro del intervalo de tiempo esperado, aproximadamente 30 días; que no responden a un tratamiento inicial o que persisten después de aplicar el tratamiento pertinente. Las lesiones crónicas representan un problema a nivel mundial. Ejemplos de este tipo de lesiones son las úlceras por presión, úlceras de pie diabético y úlceras varicosas y, usualmente, estas lesiones son tratadas mediante sustitutos cutáneos.

Los sustitutos cutáneos fueron desarrollados con el fin de ser aplicados en pacientes con quemaduras, sin embargo, en la actualidad estos sustitutos se emplean en mayor porcentaje en heridas crónicas que en quemaduras. Los sustitutos dérmicos también pueden ser utilizados en el tratamiento de lesiones provocadas por trauma.

Estos sustitutos cutáneos son elaborados a partir de materiales sintéticos o naturales, con diferentes técnicas de producción. La colágena tipo I es uno de los materiales naturales más utilizados como biomaterial debido a sus características, ya que es biocompatible y presenta una baja antigenicidad [1, 2]. Sin embargo, la proteína aislada no presenta las propiedades fisicoquímicas y mecánicas necesarias para aplicaciones en ingeniería de tejidos, ya que su tasa de degradación enzimática es muy alta y podría degradarse antes de lograr la regeneración del tejido [3]. Debido a lo anterior, es necesario mejorar las características fisicoquímicas de la colágena. El entrecruzamiento químico es un método utilizado para estabilizar proteínas; en él, se promueve la formación de nuevos enlaces amida, confiriendo resistencia a la degradación enzimática y térmica.

El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es un agente entrecruzante que se ha hecho popular debido a que pertenece a la categoría de entrecruzantes de longitud cero, es decir, que no forma parte del producto final. Esto se debe a que la traza química del EDC no queda integrado en la proteína después del entrecruzamiento; asimismo, se espera que el tratamiento con este reactivo no modifique las excelentes características biológicas de la colágena tipo I [4].

Por lo anterior, este trabajo plantea la elaboración de andamios de colágena tipo I entrecruzada con distintas concentraciones de EDC. Estas concentraciones (0, 35, 45 y 55 mM) se definen tomando en cuenta trabajos previos, en los cuales se plantea el uso de EDC a una concentración de 50 mM [5, 6]; tratando así de obtener un panorama más amplio sobre el comportamiento de este entrecruzante. Se desarrolla la metodología experimental propuesta para obtener andamios de colágena biocompatibles y con propiedades fisicoquímicas reforzadas, así como la caracterización tanto fisicoquímica como biológica de los andamios obtenidos, con el fin de analizar su comportamiento general como sustituto cutáneo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

---

### *Planteamiento del problema*

La pérdida de integridad de la piel por lesiones es un grave problema de nivel mundial. Las lesiones más comunes de la piel son las quemaduras, las úlceras (por presión, de pie diabético) y los traumas; siendo las quemaduras las más frecuentes. Estas lesiones han sido tratadas mediante injertos de piel, debido a que estos son el “gold standard” cuando las lesiones son pequeñas. Sin embargo, a pesar de ser clínicamente útiles, los injertos cutáneos presentan algunas limitaciones incluyendo la disponibilidad de la zona donante, especialmente en casos de gran pérdida de piel, el rechazo inmune a injertos de piel

allogénicos, dolor, lenta recuperación así como infecciones. Debido a esto, en los últimos años, se han desarrollado sustitutos de piel, que puedan reparar las lesiones de piel sin la necesidad de utilizar un injerto “natural” [7].

Estos sustitutos cutáneos pueden ser fabricados mediante la ingeniería de tejidos; la cual consiste en combinar materiales sintéticos y biológicos con células cultivadas in vitro para generar tejidos funcionales [8]. Estos materiales han mostrado buenos resultados, son embargo, tienen la desventaja de no ser económicamente accesibles, dado que hasta ahora en México la producción de biomateriales es incipiente y es necesario importarlos [9].

### *Justificación*

La colágena tipo I es uno de los biomateriales más utilizados debido a sus características, ya que es biocompatible y presenta una baja antigenicidad [3, 10], sin embargo, la proteína aislada presenta una alta tasa de degradación enzimática, la cual hace ineficiente su aplicación. Una alternativa para esto, es la modificación química de la proteína mediante reacciones de entrecruzamientos intermoleculares covalentes, empleando para ello moléculas biocompatibles apropiadas, lo cual provee de estabilidad biológica, que se traduce en una mayor resistencia a la degradación.

Es deseable utilizar un entrecruzante que induzca el entrecruzamiento natural en la colágena y que quede fuera de la proteína después del procedimiento. La 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es un agente entrecruzante de longitud cero, es decir, que no forma parte del producto final, lo cual facilita la conjugación directa del ácido carboxilo al grupo amina presentes en todas las proteínas [11, 12].

Sin embargo, a pesar de las buenas características que presentan las carbodiimidias, en especial el EDC; varios autores ponen en duda la biocompatibilidad de estos agentes [13, 14]. Así pues, es necesario definir el efecto del EDC sobre la colágena y su comportamiento biológico.

Por lo anterior, este trabajo plantea la elaboración de andamios de colágena tipo I entrecruzada con distintas concentraciones de EDC para ser caracterizados físico-química, mecánica y biológicamente y así evaluar su posible aplicación como sustituto cutáneo. Con los resultados obtenidos de esta investigación se espera dar un aporte significativo en el problema de reemplazo y regeneración de piel, así como un avance en la producción de biomateriales en México.

## OBJETIVOS

---

### *Objetivo general*

El objetivo fundamental de este trabajo es obtener andamios con base en colágena tipo I entrecruzados con EDC a diferentes concentraciones, evaluar su biocompatibilidad y su comportamiento fisicoquímico para su posible aplicación como sustituto cutáneo.

### *Objetivos particulares*

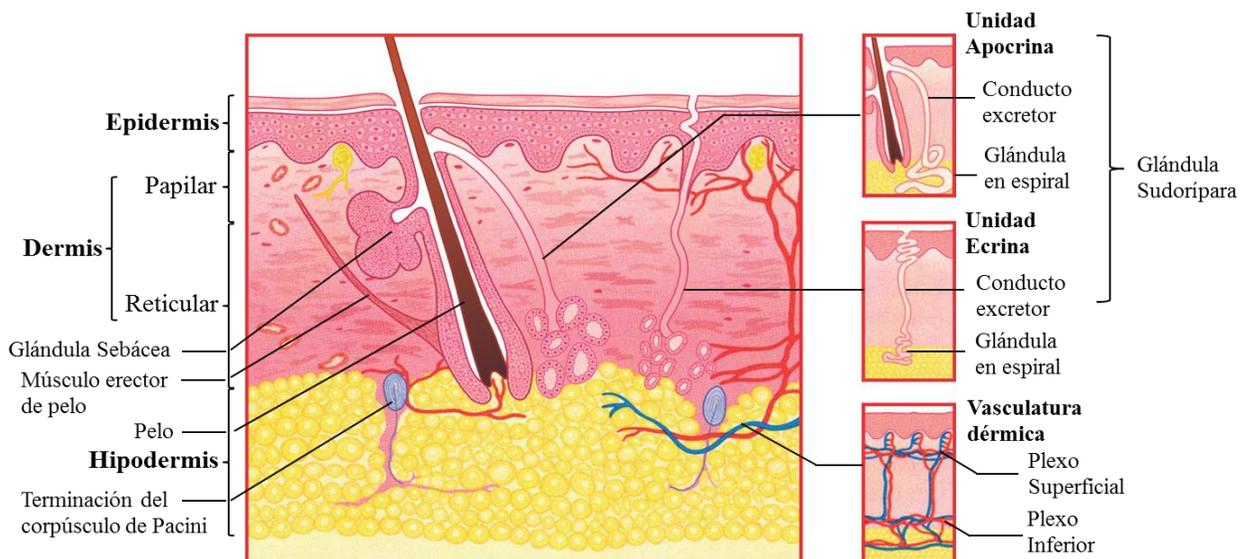
- Caracterizar morfológicamente a los andamios entrecruzados mediante microscopía electrónica de barrido.
- Mediante espectroscopia infrarroja, examinar los cambios en los enlaces moleculares de los andamios al ser entrecruzados.
- Evaluar la estabilidad térmica de los andamios mediante Calorimetría Diferencial de Barrido.
- Analizar la velocidad de degradación de los andamios de colágena entrecruzados con EDC a diferentes concentraciones.
- Determinar la capacidad de absorción de agua de los andamios de colágena entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC.
- Analizar la biocompatibilidad de los andamios evaluando viabilidad, proliferación y adhesión celular, empleando cultivos celulares de fibroblastos humanos.

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo, representando aproximadamente una sexta parte del peso total del cuerpo de un adulto. La superficie externa de la piel consiste en la epidermis, la cual se encuentra apoyada en la dermis y la hipodermis, y es alimentada por las mismas (Figura 1.1). La piel tiene una gran variedad de anexos o apéndices, principalmente el cabello, las glándulas sebáceas y sudoríparas, los cuales tienen como característica común, el residir en la dermis y salir por el estrato córneo, el cual representa la superficie más externa de la piel.



**Figura 1.1** Corte transversal de la piel. La piel está constituida principalmente por la epidermis, la dermis y la hipodermis, así como por anexos cutáneos como por ejemplo folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Imagen modificada de [15].

Sus funciones principales son: protección contra factores externos; sensación de presión, dolor y temperatura; termorregulación del cuerpo mediante el cambio de circulación sanguínea y evaporación de sudor; así como funciones metabólicas [16].

Siendo el órgano más grande del cuerpo, la piel es la principal barrera física que hace frente a los patógenos. Esta barrera defensiva representada por la epidermis, también mantiene un pH ácido, dificultando de proliferación de microorganismos sobre la superficie de la piel, además de producir sustancias químicas microbicidas. Cuando algún patógeno logra cruzar la barrera de la epidermis, se produce una respuesta inmune dentro de la dermis; debido a esto la piel es considerada parte integral del sistema inmunitario [17]. Dentro de la dermis, las bacterias, virus y los parásitos que han penetrado la barrera de la epidermis, son enfrentados de inmediato por macrófagos (células del sistema inmune) equipados con receptores de superficie que pueden unirse a muchos tipos de patógeno y fagocitarlos. Esto, a su vez, lleva a una respuesta inflamatoria (*Sección 1.1.1*), que causa la acumulación de neutrófilos y macrófagos fagocíticos en el sitio de la infección, que ingieren a los microorganismos invasores y los destruyen [17, 18].

A continuación, se describirán las características principales de las capas formadoras de la piel, así como de los apéndices cutáneos.

## ***Epidermis***

La epidermis es la capa más externa de la piel y está compuesta por varias poblaciones celulares, como los melanocitos, las células de Langerhans y células de Merkel; sin embargo, los queratinocitos son el tipo celular que predomina en esta capa. La epidermis es comúnmente dividida en cuatro capas, dependiendo de la morfología y posición de los queratinocitos, así como su diferenciación hacia corneocitos. Dichas capas son, la capa de células basales (estrato germinativo), la capa de células escamosas (estrato escamoso), la capa de células granulosa (estrato granuloso) y la capa de corneocitos (estrato córneo). Existe un quinto estrato ubicado entre el estrato córneo y el estrato granuloso denominado

estrato lúcido; sin embargo, esta capa sólo está presente en la denominada piel gruesa; es decir, en las palmas de las manos, las yemas de los dedos y las plantas de los pies.

La interface entre la epidermis y la dermis está formada por una membrana basal porosa que permite el intercambio de células y fluidos, además de mantener unidas a las dos capas [15]. Los queratinocitos basales (estrato germinativo) constituyen el componente más importante de esta unión dérmica-epidérmica; los fibroblastos dérmicos también están involucrados, pero en menor grado.

La composición de la membrana basal, también llamada lámina basal, varía de un tejido a otro, sin embargo, la mayoría de las láminas basales maduras contienen colágena tipo IV, perlecano (proteoglicano de heparán sulfato) laminina y entactina (glicoproteínas). La epidermis no posee un suministro de sangre intrínseco, pero es nutrida a través de la membrana basal mediante difusión desde la dermis [19].

## *Dermis*

La dermis constituye la mayor parte de la piel y le proporciona flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tensión. Es un tejido conjuntivo constituido por fibras, filamentos y tejido conectivo amorfo; alberga nervios, redes vasculares, apéndices cutáneos, fibroblastos (población celular mayoritaria), macrófagos y mastocitos. Otras células como linfocitos, células plasmáticas y leucocitos en general (abundantes en sangre, pero que no en tejidos sanos normales), pueden encontrarse en la dermis en respuesta a varios estímulos, como por ejemplo la presencia de patógenos en la dermis, que desencadenan la respuesta inmune [20].

Los fibroblastos, el componente celular mayoritario de la dermis, derivan de la mesénquima y son células basófilas, grandes, aplanadas; con numerosas prolongaciones que se extienden entre haces de fibras extracelulares que la misma célula sintetiza. Estructuralmente, los fibroblastos exhiben un retículo endoplasmático abundante y un prominente aparato de Golgi, asociado con la síntesis de moléculas de matriz extracelular como colágenas, proteoglicanos y fibronectina. Asimismo, secretan metaloproteinasas de matriz, tales como

colagenasas y sus inhibidores naturales. La síntesis de matriz extracelular combinada con el balance entre sus proteasas y sus inhibidores, regula las propiedades mecánicas de la dermis y la remodelación de la matriz extracelular de la misma.

Dentro de la dermis, se pueden identificar dos regiones o capas: la papilar y la reticular. Esta distinción está basada, en gran parte, en las diferencias en la organización del tejido conectivo, la densidad celular y la vasculatura presentes en dichas regiones.

La dermis papilar es un tejido conjuntivo laxo formado por finas fibrillas de colágena y fibras elásticas. Las características de la dermis papilar permiten a la piel adaptarse a la tensión mecánica. En esta región existe una alta densidad de células fibroblásticas que proliferan rápidamente, presentan una alta actividad metabólica y sintetizan diferentes especies de proteoglicanos [21]. En esta capa se encuentran invaginaciones de la epidermis hacia la dermis, formándose así papilas dérmicas [21, 22]. La dermis reticular está compuesta principalmente de fibrillas de colágena de gran diámetro organizadas en grandes haces de fibras interconectadas. Fibras elásticas maduras forman una superestructura alrededor de los haces de colágena. Estos dos tipos de fibras, al estar integrados, proveen a la dermis propiedades de fuerza y resiliencia mecánica [21, 23]. Las fibras elásticas y los haces de colágena de la dermis reticular incrementan en tamaño progresivamente hacia la hipodermis.

La vasculatura de la dermis está formada por dos plexos: el subpapilar o plexo superficial, compuesto por vénulas postcapilares encontradas en la unión de la dermis papilar y reticular; y el plexo inferior situado en la interface de la dermis y el tejido subcutáneo (hipodermis). Las papilas dérmicas son suministradas por los capilares, y las arteriolas y vénulas del plexo superficial. El plexo profundo es suministrado por vasos sanguíneos más grandes y se torna más complejo en los alrededores de las estructuras anexas.

## *Hipodermis*

El tejido de la hipodermis proporciona aislamiento térmico al cuerpo, sirve como una reserva de energía, amortigua y protege al cuerpo, además de permitir su movilidad sobre

estructuras adyacentes. El límite entre la dermis reticular y la hipodermis es una transición abrupta de un tejido conjuntivo dérmico predominantemente fibroso a un tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo. Los adipocitos forman la masa principal de células de la hipodermis [24].

### *Anexos cutáneos*

Los anexos o anejos cutáneos se encuentran contenidos en la dermis y abarcan las siguientes estructuras: folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas.

- Folículos pilosos: son estructuras constituidas por células queratinizadas que aparecen en los cortes de la piel como invaginaciones de la epidermis que penetran más o menos profundamente en la dermis. Los folículos constituyen junto a las glándulas sebáceas la unidad pilosebácea, que es propia de los mamíferos y recubren toda la piel con excepción de las regiones palmoplantares. El pelo cumple una función protectora y sensorial [25].
- Glándulas Sudoríparas: producen secreción ácida (pH 5), que a modo de defensa limita el crecimiento bacteriano en la piel. Existen dos tipos: las ecrinas y las apocrinas. Las primeras son las más numerosas, se estimulan con el calor y se distribuyen por toda la superficie corporal (entre 2 y 5 millones). Su función es la regulación del equilibrio térmico del organismo. Las apocrinas son sensibles a los estados emocionales y cambios hormonales, se ubican selectivamente en axilas, mamas y zona anoperineogenital. A diferencia de las glándulas ecrinas, estas no salen directamente a la superficie de la piel. Por el contrario, el ducto intraepitelial abre dentro del folículo pilosebáceo.
- Glándulas Sebáceas: son formaciones en forma de racimo, ubicadas junto al folículo piloso en el cual desembocan y vierten su secreción (el sebo, constituido por la acumulación de lípidos y restos celulares). La función de este compuesto es lubricar la piel, formando con la secreción sudorípara una excelente emulsión. También tiene efecto en la absorción y pérdida de agua, y al mantener un pH ácido, actúa como antifúngico y antibacteriano. Estas glándulas están especialmente

desarrolladas y ubicadas en el cuero cabelludo, cara (nariz, frente, mentón), línea media del pecho y espalda, conducto auditivo externo y área anoperineogenital.

### ***1.1.1 LESIONES DE LA PIEL***

La pérdida de integridad de grandes porciones de piel, debida a lesiones, enfermedades, o traumas, puede provocar una discapacidad significativa e incluso la muerte. Las heridas o lesiones son rupturas en la estructura de la piel que comprometen su función. Las lesiones superficiales, tales como abrasiones, afectan principalmente la epidermis y curan rápidamente mediante el crecimiento de nuevos queratinocitos para cubrir el daño. Las lesiones de espesor parcial involucran tanto a la epidermis como a la dermis, y requieren de una curación más extensa, sobre todo si la herida es grande. Lesiones de espesor total implican la penetración a través de la epidermis y la dermis hasta llegar al tejido adiposo y en algunos casos hasta músculo y hueso [26].

Las lesiones de piel más comunes incluyen a las quemaduras, las úlceras de pie diabético, vasculares y de presión; además de lesiones por trauma.

#### ***Cicatrización de heridas***

El proceso de curación o cicatrización de una herida o lesión comienza inmediatamente después de la lesión y se divide en tres fases o etapas, la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación.

La primera es la fase inflamatoria, la cual comienza tras el daño tisular, es en la que se prepara el ambiente para la cicatrización. Esta fase se divide dos etapas. En la primera etapa sucede la hemostasia, la cual es la respuesta inicial de los tejidos hacia un trauma. La hemostasia comienza con una vasoconstricción breve para iniciar el proceso coagulatorio. Después de esto, los capilares, cercanos a la herida, se dilatan y aumenta su permeabilidad para permitir que proteínas de suero y glóbulos blancos lleguen al área afectada y comience así el proceso de curación. La etapa celular es en la que se ve involucrada la migración de

glóbulos blancos fagocíticos hacia la herida con el fin de eliminar microorganismos invasores y tejido muerto. La fase inflamatoria dura entre 2 y 5 días [26, 27].

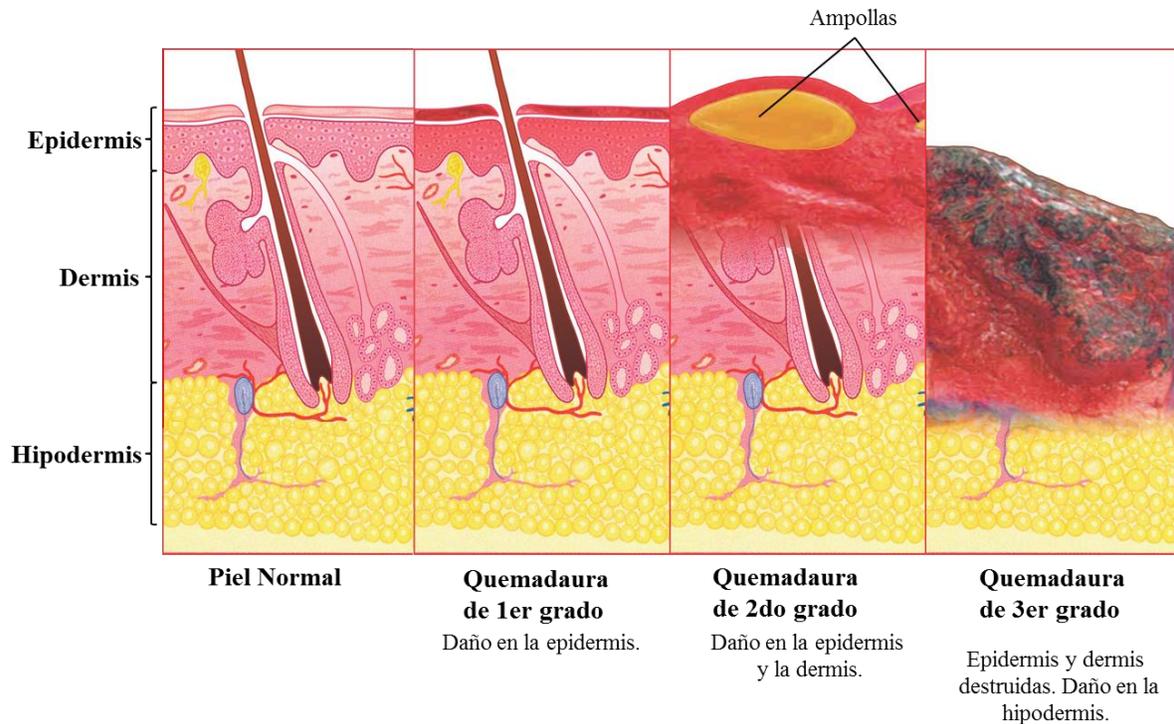
Los fibroblastos aparecen en la herida entre el 2do o 3er día y esto marca el comienzo de la fase proliferativa, la cual dura aproximadamente 3 semanas. El objetivo principal de esta fase consiste en la generación de tejido nuevo (tejido de granulación) para llenar el espacio de la herida. Los fibroblastos comienzan a proliferar y a sintetizar proteínas de matriz extracelular y liberar factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis, para formar el tejido de granulación, el cual sirve como base para la formación de tejido a cicatrizar. El tejido de granulación es un tejido débil y que sangra con facilidad debido a los numerosos brotes capilares formados recientemente. La reepitelización del tejido ocurre durante esta fase; las células epiteliales (queratinocitos) proliferan y migran a través del tejido de granulación. Las nuevas células epiteliales actúan como una barrera hacia las bacterias y hacia la pérdida de agua [28].

Después de tres semanas tras la lesión, la síntesis y degradación de colágena se encuentran en homeostasis, y la fase de remodelación comienza. El nuevo tejido formado en la herida incrementa progresivamente su resistencia a la tensión. Este proceso puede continuar durante dos años después de la lesión. Las lesiones más comunes de la piel, se enlistan a continuación.

## *Quemaduras*

Las lesiones térmicas pueden dañar solamente a la epidermis, a la epidermis con una porción de la dermis o toda la piel e incluso extenderse hasta el músculo o hueso [29]. Según su profundidad, pueden clasificarse en quemaduras de 1er, 2do y 3er grado (Figura 1.2). Las quemaduras de 1er grado, o superficiales, son aquellas en las que tan sólo se ve afectada la epidermis. En las quemaduras de 2do grado, también llamadas dérmicas, el agente quemante llega a afectar a la dermis. En función de qué espesor de dermis lesione, las quemaduras dérmicas pueden ser superficiales (espesor parcial) o profundas (espesor total) [30, 31]. Las quemaduras de 3er grado o quemaduras subdérmicas son aquellas en las

que se ha destruido la totalidad del espesor de la piel. Característicamente suelen ser indoloras, pues se han destruido las terminaciones nerviosas de la piel [30].



**Figura 1.2** Clasificación de quemaduras. Las quemaduras pueden clasificarse, según el espesor del tejido dañado, en quemaduras primarias, secundarias y terciarias. Imagen modificada de [15].

Las lesiones que se extienden hasta la dermis profunda e incluso hasta la hipodermis, necesitan tratamientos más complejos; esto debido a la falta de queratinocitos en la superficie lesionada puesto que la epidermis y la dermis se encuentran ausentes y los anexos cutáneos son destruidos. El objetivo principal de los tratamientos para este tipo de quemaduras, es el reemplazo de la piel lesionada por piel sana o algún sustituto lo más rápidamente posible [32].

### **Heridas crónicas**

Las heridas crónicas se definen como heridas que han fallado en el proceso reparativo, ya que no obtienen la integridad funcional ni anatómica después de un periodo de 3 meses [33]. Las úlceras de pie diabético, las úlceras por presión y las úlceras de extremidad inferior son las heridas crónicas mayormente tratadas mediante sustitutos cutáneos.

## *Úlceras de pie diabético*

La úlcera de pie diabético (UPD) se define como una “herida de espesor completo por debajo del tobillo en un paciente diabético, independientemente de su duración”. Las úlceras en el pie se desarrollan como resultado de una neuropatía o de una arteriopatía periférica, ya sea de forma aislada o en combinación, y dan lugar a la clasificación de pie neuropático, pie isquémico o pie neuroisquémico [26, 34].

## *Úlceras por presión*

Las úlceras por presión (UPP) son lesiones producidas por tensión sobre la piel al permanecer largos períodos en una sola posición [35]. Presiones prolongadas provocan isquemia, la cual conduce a la necrosis del tejido que normalmente ocurre en el tejido más cercano al hueso. La muerte de células isquémicas produce inflamación, lo que resulta en coagulación de sangre, agregación plaquetaria y acumulación de células inflamatorias. Pacientes que se encuentran en sillas de ruedas o postrados en cama se encuentran en un mayor riesgo de presentar úlceras por presión. Otros factores de riesgo son: la edad avanzada, la fricción, la disminución de la precepción sensorial, la mala nutrición y la constante y excesiva exposición a la humedad [26].

Las UPP son clasificadas en estadios en función del tejido dañado. En el estadio I la piel se encuentra intacta pero con enrojecimiento. En el estadio II se presenta pérdida del espesor parcial de la dermis; la úlcera está abierta y es poco profunda. El estadio III se distingue por la pérdida del tejido adiposo, es decir es una lesión de espesor total. En el estadio IV la pérdida de tejido se extiende hasta el músculo, tendón o hueso [26, 36].

## *Úlceras de extremidad inferior*

Las úlceras vasculares son el resultado de insuficiencia crónica venosa o arterial. Las úlceras venosas se manifiestan en el contexto de la insuficiencia venosa crónica y las úlceras arteriales las que lo hacen en el curso de la isquemia de la extremidad [37].

La úlcera venosa se define como la pérdida de la integridad cutánea debida a una incompetencia del sistema venoso [26, 37]; la úlcera arterial o isquémica (UI) es una lesión en la que aparece una pérdida de sustancia que afecta a la epidermis desde tejidos más profundos, cuyo origen es la isquemia arterial. Son causadas por la restricción del flujo sanguíneo en una arteria, resultando en isquemia y desarrollándose así una úlcera. El tejido necrótico con poco exudado es común en este tipo de úlceras [28, 33].

## *Trauma*

En ocasiones, en lesiones causadas por un trauma (como pueden ser un accidente, tejido necrótico debido a la mala cicatrización de alguna herida, laceración del tejido, entre otras) es necesario aplicar sustitutos cutáneos para lograr la cicatrización de la herida.

En general, las lesiones de espesor parcial en adelante, que sobrepasan el centímetro cuadrado de extensión no pueden cicatrizar de manera natural, esto debido que los queratinocitos y fibroblastos de los bordes no llegan a encontrarse. Para esto es necesario aplicar sustitutos cutáneos que promuevan la cicatrización.

## ***1.2 SUSTITUTOS CUTÁNEOS***

La aplicación de injertos de piel, es el método más utilizado, debido a que con ellos se puede cubrir el tejido expuesto, para así controlar la pérdida de fluidos y calor, además de evitar infecciones. Los injertos de tejido autólogo son obtenidos mediante técnicas invasivas y dolorosas, además, a menudo, la extensión de piel dañada es demasiado grande para ser cubierta por este tipo de injertos [27].

Los sustitutos cutáneos fueron desarrollados como una alternativa a las injertos autólogos, especialmente para pacientes con quemaduras. Sin embargo, hoy en día, los sustitutos cutáneos son mayormente utilizados en heridas crónicas que en quemaduras.

Existen varias técnicas para obtener sustitutos cutáneos, ya sea de fuentes naturales o sintéticas; la fabricación o desarrollo de estos sustitutos está basado en la ingeniería de

tejidos, la cual es una alternativa para la creación de sustitutos que actúen como barrera para evitar la pérdida de fluidos vitales y evitar las infecciones, ayudando en el tratamiento de esas lesiones.

### **1.2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS**

La ingeniería de tejidos o tisular fue definida en 1988 como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre la estructura y la función en tejidos normales y patológicos, así como el desarrollo de sustitutos biológicos que reparen, mantengan o mejoren la función del tejido [23]. La ingeniería de tejidos nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y regeneración de tejidos que se utilizan actualmente y su objetivo principal es reparar, reemplazar, mantener o aumentar la función de un tejido u órgano en particular [38]. Esto se logra mediante la aplicación de la triada de la ingeniería de tejidos, la cual consta de una combinación de células depositadas en una matriz o andamio guiadas por moléculas bioactivas [39]. Sobre la base de la tríada, la estrategia más común utilizada por investigadores en el área consiste en la extracción de una pequeña biopsia de tejido autólogo, del cual, se aíslan células para ser expandidas *in vitro*. Estas células son posteriormente sembradas en una matriz tridimensional, llamada andamio, y sometidas a un estímulo químico ejercido por las moléculas bioactivas que provocan respuestas celulares específicas, con la finalidad de acelerar la producción de un implante eficiente [40].

Sin embargo, algunos autores exponen que el factor crucial para el desarrollo de sustitutos biológicos, en especial en la ingeniería de tejidos de piel, es el andamio a utilizar, aunque en conjunto los elementos de la triada son esenciales [41].

Un andamio tridimensional utilizado para ingeniería de tejidos puede ser considerado como una matriz extracelular artificial u análoga. Es necesario tener en cuenta, que la matriz extracelular, además de contribuir a la integridad mecánica, tiene funciones importantes de señalización y regulación en el desarrollo, mantenimiento y regeneración de tejidos, así que los andamios deben servir como un molde para la infiltración del huésped y como un soporte físico que guíe a las células hacia la diferenciación y proliferación. Los andamios

pueden ser naturales, sintéticos o ser una combinación de ambos, pero debe tenerse en cuenta que la estructura del material debe tener la capacidad de promover y restaurar la función del tejido o de todo el órgano [42].

Un andamio ideal utilizado en ingeniería de tejidos de piel debe presentar una excelente biocompatibilidad; una microestructura adecuada, en la cual se presente un tamaño de poro entre 100 y 200 nm y una porosidad por encima del 90%; una biodegradabilidad controlable y un adecuado comportamiento mecánico [43]. Además, debe ser seguro, de fácil aplicación, el material tópico debe promover la curación y conducir a una recuperación estética y funcional. Debe presentar propiedades fisicoquímicas adecuadas, para lograr proteger los tejidos circundantes, controlar las infecciones, prevenir el calor y la pérdida de fluidos, así como no presentar inmunogenicidad [44–46].

Los sustitutos cutáneos pueden ser temporales o permanentes y pueden estar compuestos por materiales naturales o sintéticos. Los sustitutos cutáneos temporales pueden ser biológicos o sintéticos, y son comúnmente colocados en el lecho de la herida, de manera provisional, mientras se espera por un sustituto cutáneo permanente. Por otro lado, los sustitutos permanentes, son quirúrgicamente fijados y se incorporan a la piel del paciente, usualmente son una combinación de materiales biológicos y sintéticos.

Es imperativo que cualquier andamio o matriz obtenido a partir de la bioingeniería sea, no solamente química y biológicamente estable, sino también económico. Por esta razón, es necesario realizar una buena elección en el tipo de material a usar.

La colágena es uno de los materiales más prometedores en la ingeniería de tejidos, especialmente en la de piel, ya que puede ser extraída de infinidad de tejidos (incluso de tejidos de desecho, como lo son los tendones bovinos), sirve como un sustrato natural para la proliferación y la adhesión celular, además de presentar una excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. En la siguiente sección se detallarán las características de la colágena.

## 1.3 COLÁGENA

La colágena es una proteína estructural abundante en vertebrados. En humanos, comprende un tercio del total de proteínas, representa tres cuartos del peso en seco de la piel y es el componente predominante del tejido conectivo de tendones, cartílagos, matriz ósea, córnea del ojo y de la piel, principalmente en la dermis [47, 48].

El término “colágena” es usado como un término genérico para abarcar a una gran familia de distintas proteínas, cada una con estructuras, funciones y distribución en tejidos en la matriz extracelular específicos [49]. Veintiocho tipos de colágena genéticamente distintas han sido identificados [50]. Cada tipo está constituido por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas  $\alpha$  (1000 aminoácidos por cadena), cada una de las cuales es una hélice levógira, agrupadas en una estructura helicoidal dextrógira con tres residuos de aminoácidos por vuelta; presentado así un arreglo tipo cuerda [51].

La composición de aminoácidos de las colágenas es característica de estas proteínas: glicina 33%, prolina 12-20%, 4-hidroxi prolina 10% y 5-hidroxi lisina en menor proporción; generalmente, aunque no en todos los casos, carece de cisteína.

Las tres cadenas  $\alpha$  que constituyen a las colágenas se caracterizan por la presencia de repeticiones del triplete Gly-X-Y, donde X es frecuentemente prolina y Y es frecuentemente 4-hidroxi prolina [51].

La nomenclatura de los tipos de colágena se basa en la estructura de los dominios homólogos y son asignados números romanos del I-XXVIII basándose en el orden cronológico de descubrimiento. Las colágenas más abundantes son la colágena tipo I (tendón, dermis, hueso), la colágena tipo II (cartílago), la colágena tipo III (piel, vasos sanguíneos) y la colágena tipo IV (membrana basal). En la tabla 1 se enlistan los tipos de colágena, su distribución y su estructura molecular.

**Tabla 1** Tipos de colágenas. [48]

<b>Tipo</b>	<b>Clase</b>	<b>Composición</b>	<b>Distribución</b>
I	Fibrilar	$\alpha 1[\text{I}]_2\alpha 2[\text{I}]$	Abundante y extensa: dermis, tendón, hueso, ligamento
II	Fibrilar	$\alpha 1[\text{II}]_3$	Cartílago, meniscos, humor vítreo
III	Fibrilar	$\alpha 1[\text{III}]_3$	Piel, vasos sanguíneos, intestino
IV	Formadora de redes	$\alpha 1[\text{IV}]_2\alpha 2[\text{IV}]$ $\alpha 3[\text{IV}]\alpha 4[\text{IV}]\alpha 5[\text{IV}]$ $\alpha 5[\text{IV}]_2\alpha 6[\text{IV}]$	Membranas basales
V	Fibrilar	$\alpha 1[\text{V}]_3$ $\alpha 1[\text{V}]_2\alpha 2[\text{V}]$ $\alpha 1[\text{V}]\alpha 2[\text{V}]\alpha 3[\text{V}]$	Amplia: hueso, dermis, cornea, placenta
VI	Formadora de redes	$\alpha 1[\text{VI}]\alpha 2[\text{VI}]\alpha 3[\text{VI}]$ $\alpha 1[\text{VI}]\alpha 2[\text{VI}]\alpha 4[\text{VI}]$	Amplia: hueso, cartílago, cornea, dermis
VII	Fibrillas de anclaje	$\alpha 1[\text{VII}]_2\alpha 2[\text{VII}]$	Dermis, vejiga
VIII	Formadora de redes	$\alpha 1[\text{VIII}]_3$ $\alpha 2[\text{VIII}]_3$ $\alpha 1[\text{VIII}]_2 \alpha 2[\text{VIII}]$	Amplia: dermis, cerebro, corazón, riñón, cartílago
IX	FACIT	$\alpha 1[\text{IX}]\alpha 2[\text{IX}]\alpha 3[\text{IX}]$	Cartílago, cornea, humor vítreo
X	Formadora de redes	$\alpha 1[\text{X}]_3$	Zona hipertrofia del cartílago
XI	Fibrilar	$\alpha 1[\text{XI}]\alpha 2[\text{XI}]\alpha 3[\text{XI}]$	Cartílago, discos intervertebrales
XII	FACIT	$\alpha 1[\text{XII}]_3$	Dermis, tendón
XIII	MACIT	-	Células endoteliales, dermis, ojo, corazón

---

XIV	FACIT	$\alpha 1[XIV]_3$	Amplia: hueso, dermis, cartílago
XV	MULTIPLEXIN	-	Capilares, testículos, riñón, corazón
XVI	FACIT	-	Dermis, riñón
XVII	MACIT	$\alpha 1[XVII]_3$	Hemidesmosomas en el epitelio
XVIII	MULTIPLEXIN	-	Membrana basal, hígado
XIX	FACIT	-	Membrana basal
XX	FACIT	-	Córnea
XXI	FACIT	-	Estómago, riñón
XXII	FACIT	-	Uniones tisulares
XXIII	MACIT	-	Corazón, retina
XXIV	Fibrilar	-	Hueso, cornea
XXV	MACIT	-	Cerebro, corazón, testículos
XXVI	FACIT	-	Testículos, ovarios
XXVII	Fibrilar	-	Cartílago
XXVIII	-	-	Dermis, nervio ciático

---

<sup>a</sup>Abreviaturas: *FACIT*, colágenas asociadas a fibrillas con triples hélices interrumpidas; *MACIT*, colágenas asociadas a membrana con triples hélices interrumpidas; *MULTIPLEXIN*, múltiples dominios de triple hélice e interrupciones. En todos los casos, por sus siglas en inglés.

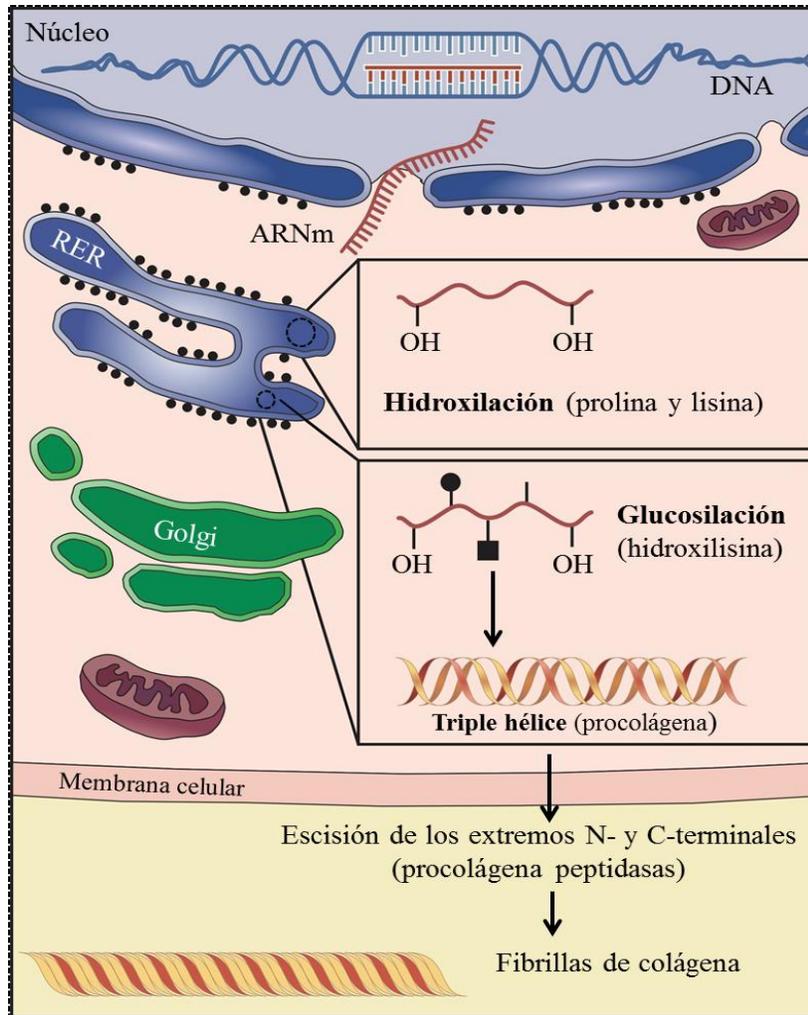
## *Síntesis in vivo de colágena*

Las colágenas son proteínas fibrilares de matriz extracelular, sintetizadas por fibroblastos y responsables del mantenimiento de la integridad estructural de los vertebrados y muchos otros organismos [52].

La lectura del ARN mensajero (ARNm) por los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso (RER) constituye la fase inicial de la síntesis. A continuación, los polisomas se encargan de ensamblar los aminoácidos para formar las cadenas polipeptídicas (Figura 1.3).

Estas cadenas polipeptídicas, precursoras de las cadenas  $\alpha$  (cadenas proalfa), llevan en sus extremos amino-terminales secuencias suplementarias de aminoácidos conocidos como péptidos señal. Estos péptidos de señal permiten la transferencia de la cadena pro- $\alpha$  al lumen del RER. Las cadenas pro- $\alpha$  o preprocolágena, sufren modificaciones post-transduccionales en el lumen del RER, que consisten en la hidroxilación de residuos de prolina y lisina. La hidroxilación se realiza por tres sistemas enzimáticos; dos actúan sobre residuos de prolina (prolil 4-hidroxilasa y prolil 3-hidroxilasa), y el tercero sobre residuos de lisina (lisil hidroxilasa). Estas enzimas actúan sobre residuos que ocupan una posición determinada en el triplete y cuando la cadena polipeptídica no está formando triple hélice, por lo que la hidroxilación debe completarse antes de la formación de dicha estructura [53, 54]. Los residuos de 4-hidroxiprolina son necesarios para el correcto ensamblaje de la molécula de procolágena y para la estabilización de la triple hélice, ya que los grupos hidroxilo de la hidroxiprolina forman enlaces de hidrógeno entre las cadenas  $\alpha$ . La hidroxilación de la lisina es crítica para la estabilización de estructuras macromoleculares, ya que los residuos de hidroxilisina participan en la formación de enlaces de entrecruzamiento intra e intermoleculares.

Subsecuentemente, algunos de los residuos de hidroxilisina son glicosilados. Los hidratos de carbono, principalmente galactosa y glucosilgalactosa, se unen a través de enlaces O-glicosídicos a hidroxilisinas situadas en dominios que formarán parte de la triple hélice [54].



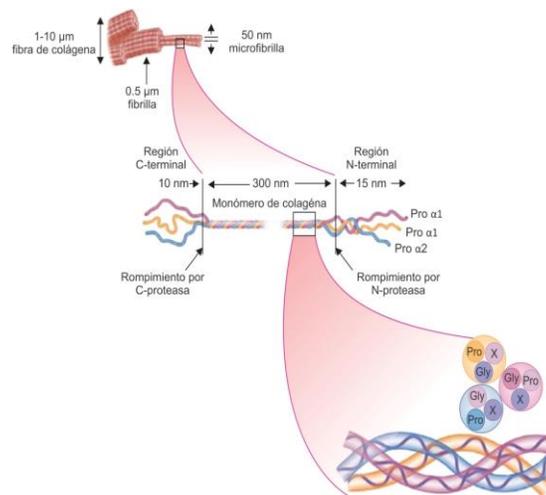
**Figura 1.3** Síntesis de la colágena. La colágena es sintetizada por fibroblastos en el RER, posteriormente es empaquetada en Golgi y es expulsada al medio extracelular, ya que es una proteína de MEC. En el medio extracelular, se lleva a cabo la escisión de los extremos N- y C-, para así formarse las fibrillas de colágena madura. Imagen modificada de [55].

Después de la translocación polipeptídica, tres cadenas por-  $\alpha$  se alinean y asocian de manera no covalente a través de los extremos carboxilo-terminales. Esta asociación es estabilizada por puentes disulfuro. Posterior a la asociación, comienza la formación de la triple hélice desde el núcleo del C-terminal y es propagada hasta llegar al extremo N-terminal. Las moléculas de procolágena que han completado sus modificaciones y ensamblaje, son transportadas al aparato de Golgi. En la cisterna de Golgi, las moléculas de procolágena son apiladas lateralmente y forman agregados.

Finalmente, los agregados de procolágena son secretados en el espacio extracelular, donde se lleva a cabo la escisión de los extremos N- y C-terminales bajo la acción de enzimas (procolágena peptidasas), generando así moléculas de tropocolágena. Tras la escisión de los propéptidos, las moléculas de tropocolágena se auto ensamblan formando estructuras fibrilares supramoleculares (fibrillas de colágena), en las que cada molécula está desplazada cerca de un cuarto de su longitud sobre el eje de la fibrilla. Entre las moléculas de tropocolágena, se forman enlaces cruzados catalizados mediante la lisil oxidasa [54]. Las fibrillas de colágeno se unen para formar fibras y grupos de fibras de colágena se orientan siguiendo el mismo eje para crear los haces de colágena.

### Estructura de la colágena

Una fibra de colágena está constituida por pequeños filamentos unidos entre sí, como si se tratase de una cuerda (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Estructura de la colágena; es posible observar el arreglo fibrilar de la proteína. En este caso se muestra la colágena tipo I. Imagen modificada de [56].

### Fibras

Las fibras o haz de fibras de esta proteína resultan del alineamiento en paralelo de fibrillas de colágena. Cada haz de fibras puede llegar a medir de entre 1-10 µm de diámetro.

## Fibrillas

La formación de fibrillas en el espacio extracelular es un proceso de ensamblaje controlado y estabilizado por los entrecruzamientos. Es un filamento delgado con un diámetro del orden de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$ . Las fibrillas de colágena presentan estrías transversales características cada 67 nm, que reflejan el empaquetamiento escalonado y periódico de las moléculas individuales de colágena en la fibrilla.

## Microfibrillas

La estructura fibrilar más pequeña es la microfibrilla, que se puede observar con un microscopio electrónico de barrido. Las microfibrillas están constituidas por 4 ó 5 moléculas de colágena, cada molécula se encuentra alineada de forma escalonada respecto a sus vecinas. Presentan un diámetro aproximado de 50 nm. La interacción de éstas es fuerte y es óptima cuando están desplazadas una respecto a la otra por una distancia de 67 nm [57]. El proceso de la formación de las fibrillas a partir de las microfibrillas, está dirigido en parte, por la tendencia que presentan las moléculas de colágena a ensamblarse, de ahí que un gran grupo de fibrillas terminen formando una fibra de colágena, la cual resiste la tracción.

## Tropocolágena

Cada microfibrilla de colágena está formada por una superposición de moléculas de colágena llamada tropocolágena. La tropocolágena, que es considerada la unidad fundamental de la colágena y que mide 300 nm de longitud, 1.5 nm de diámetro y tiene una masa molecular aproximada de 300 kD [53]; está formada por tres cadenas peptídicas enrolladas entre sí formando una superhélice dextrógira, denominadas cadenas. Como se dijo anteriormente, la molécula de colágena está formada principalmente por glicina, aproximadamente 33%, prolina 12%, hidroxiprolina 9%, así como por lisina e hidroxilisina. Es por ello que la secuencia de esta proteína está formada principalmente por la unidad repetitiva de Gly-X-Y.

## *Colágena como biomaterial*

La colágena es frecuentemente elegida como el andamio por excelencia para implantes biodegradables, esto debido a que, como se mencionó anteriormente, es el componente mayoritario del tejido conjuntivo además de que juega una gran variedad de roles en diferentes tejidos [10, 58]. El hecho de que la colágena presente una baja antigenicidad y una alta biocompatibilidad, contribuye a su elección en la fabricación de andamios con aplicaciones biomédicas. Además de esto, la colágena presenta una alta densidad de secuencias RGD y otras secuencias funcionales en su estructura, dichas secuencias están íntimamente ligadas a procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular [3, 10]. Su versatilidad y facilidad de manufactura, han permitido su fabricación en numerosas formas diferentes, como son, esponjas, películas, discos, diluciones inyectables, placas oftálmicas, hidrogeles [10].

Lamentablemente, debido a los procesos de extracción a los que es sometida, la colágena presenta una baja estabilidad térmica y una baja tasa de resistencia a la degradación enzimática. Esto representa un obstáculo en su aplicación en ingeniería de tejidos. Tradicionalmente, el componente estructural de los andamios utilizados en ingeniería de tejidos, se había sido visto solamente como un material que proveía una estructura mecánica “pasiva”. Sin embargo, durante la última década se ha vuelto cada vez más claro que las fuerzas mecánicas solas pueden dirigir a las células y al fenotipo del tejido de manera similar que estímulos biológicos. Algunos estudios han revelado que las células usan un mecanismo activo de detección táctil para sentir y responder a la mecánica del sustrato y que células troncales utilizan pistas a partir de esta detección mecánica para seleccionar vías de diferenciación. La última observación se complementa con el hecho, demostrado con anterioridad, de que los fibroblastos dérmicos responden a la mecánica del sustrato mediante la regulación de los niveles de transcripción de genes que eventualmente dan paso a la síntesis de matriz extracelular y a su transformación en miofibroblastos [29]. Teniendo en cuenta la importancia tanto de las propiedades fisicoquímicas como de las propiedades biológicas en un andamio con aplicación biológica, es necesario proponer un

método para que mejore las propiedades físicas y químicas de la colágena, sin alterar sus excelentes características biológicas.

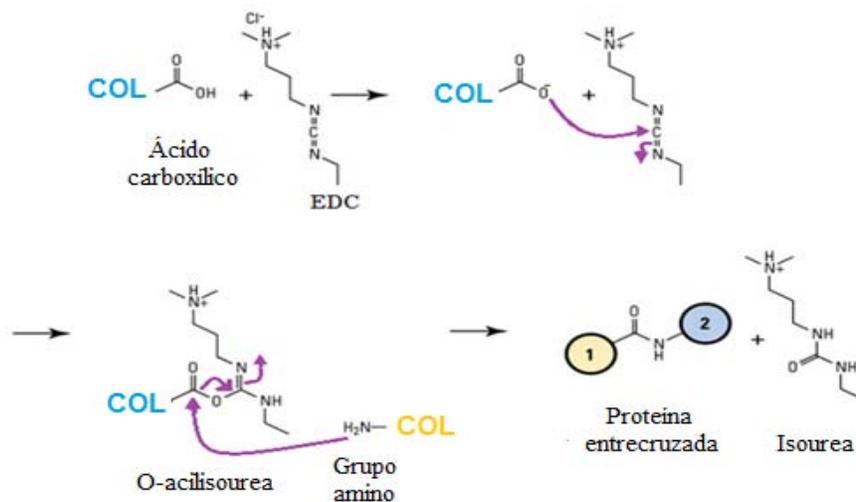
## **2.4 ENTRECruzAMIENTO**

Existen dos técnicas principales para lograr mejorar las propiedades mecánicas, estabilidad térmica y la tasa de degradación enzimática de la colágena; el reforzamiento y el entrecruzamiento. El reforzamiento consiste en la adición de componentes mecánicamente más resistentes que al andamio de colágena. Este proceso, si es controlado con precisión, puede incrementar la resistencia a la ruptura del material.

El entrecruzamiento implica el uso de agentes físicos o químicos. La radiación gamma puede ser aplicada como agente entrecruzante físico. Sin embargo, la energía de la radiación gamma puede destruir la estructura nativa de la proteína. Así como la radiación gamma, también la radiación ultravioleta puede ser utilizada como entrecruzante. Es menos dañina que la radiación gamma, pero la luz UV también puede perjudicar la estructura de la proteína [59]. Por otro lado, ejemplos de entrecruzantes químicos son el glutaraldehído, el formaldehído, las carbodiimidas, en especial el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), y la genipina [3], y estos se han utilizado con cierto grado de éxito.

Históricamente, el glutaraldehído ha sido el agente entrecruzante más ampliamente utilizado. Sin embargo, biomateriales entrecruzados con este agente han mostrado una liberación de glutaraldehído monomérico tóxico tras la hidrólisis del material [60]. Trabajos recientes han reportado que colágena entrecruzada tanto con glutaraldehído como con formaldehído presenta una inhibición en la proliferación celular, dejando claro el hecho de que la utilización de estos entrecruzantes reducen el crecimiento celular *in vitro* e *in vivo* [61]. Con el fin de evitar los problemas relacionados con toxicidad, es necesario elegir un agente entrecruzante de longitud cero, es decir, que su estructura química no forme parte del producto final y así evitar afectar negativamente las características biológicas de la proteína.

Las carbodiimidas cumplen con esta característica. Las reacciones de modificación química más importantes de los grupos carboxílicos se llevan a cabo mediante carbodiimidas. En presencia de una amina, las carbodiimidas promueven la formación de un enlace amida en dos pasos. En la reacción inicial, el grupo carboxílico se adhiere a la carbodiimida para formar un producto intermedio, la O-acilisourea [11, 62, 63]. En la segunda reacción, el grupo amino de otra subunidad de proteína u otra proteína se une al intermediario reactivo. De esta manera la proteína queda entrecruzada y se obtiene un subproducto soluble en agua, la isourea (Figura 1.5). La carbodiimida que ha presentado los mejores resultados en el entrecruzamiento de las proteínas es el EDC.



**Figura 1.5** Reacción de entrecruzamiento de colágeno tipo I mediante carbodiimidas, utilizando EDC. La reacción de entrecruzamiento promueve la formación de enlaces amida. El grupo carboxilo del ácido glutámico o aspártico de la colágena reacciona y se une al EDC formando el intermediario O-acilisourea. Posteriormente, el grupo amino de la hidroxilisina se une al intermediario, quedando las proteínas entrecruzadas, obteniendo como subproducto a la isourea, la cual puede ser removida ya que es soluble en agua. Imagen modificada de [64].

A pesar de las buenas características que presentan las carbodiimidas, en especial el EDC, varios autores ponen en duda la biocompatibilidad de estos agentes [13, 14], por lo que es importante definir el efecto que tiene el agente EDC sobre el comportamiento biológico de la colágena.

# MÉTODO EXPERIMENTAL

---

### *2.1 Extracción y purificación de colágena tipo I*

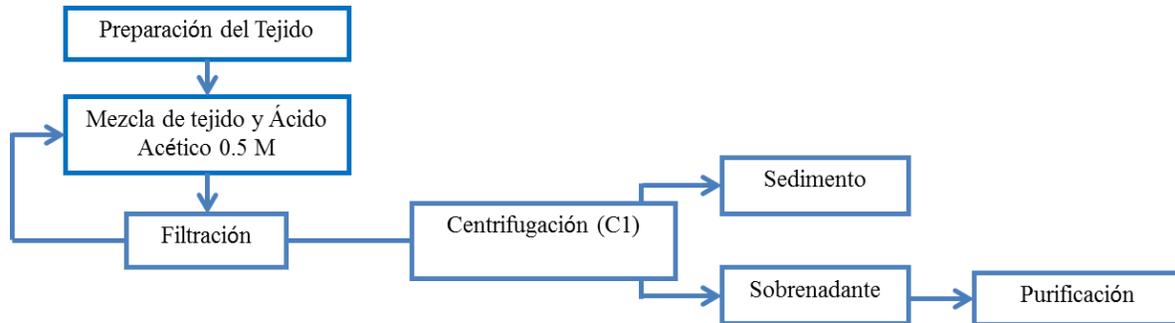
La extracción y purificación de la colágena realizadas en este trabajo se basaron en un trabajo previo [65], brevemente explicado a continuación. El tejido biológico empleado para la extracción de colágena fue tendón de Aquiles de origen bovino. El tejido se cortó en rodajas relativamente delgadas con un bisturí.

#### *Extracción de colágena*

El proceso de extracción se llevó a cabo a una temperatura de 4°C, con el fin de minimizar el crecimiento bacteriano y aumentar la solubilidad de la colágena. Los tejidos se mezclaron con Ácido Acético 0.5 M, utilizando un mini-triturador (PCDY, Pack Dynamix). De esta manera, los enlaces cruzados intermoleculares de tipo aldimina se disocian por efecto de la disolución ácida, causando la inflamación de las estructuras fibrilares, produciendo una masa viscosa.

La extracción se realizó en un lapso de 48 horas. Después de este tiempo, la mezcla de extracción se filtró a través de varias capas de gasa para lograr la separación inicial de la disolución de colágena y los residuos de tejido insolubles. Éstos últimos pueden volver a suspenderse en ácido para después volver a filtrarse con el fin de obtener un mayor rendimiento.

Al terminar la filtración, la disolución de colágena se centrifugó a 12000 g durante 60 minutos manteniendo una temperatura de 4 °C (Condiciones C1). Se desechó el sedimento. La **Figura 2.1** muestra un diagrama del proceso de extracción.



**Figura 2.1** Extracción de colágena tipo I.

### ***Purificación de la proteína***

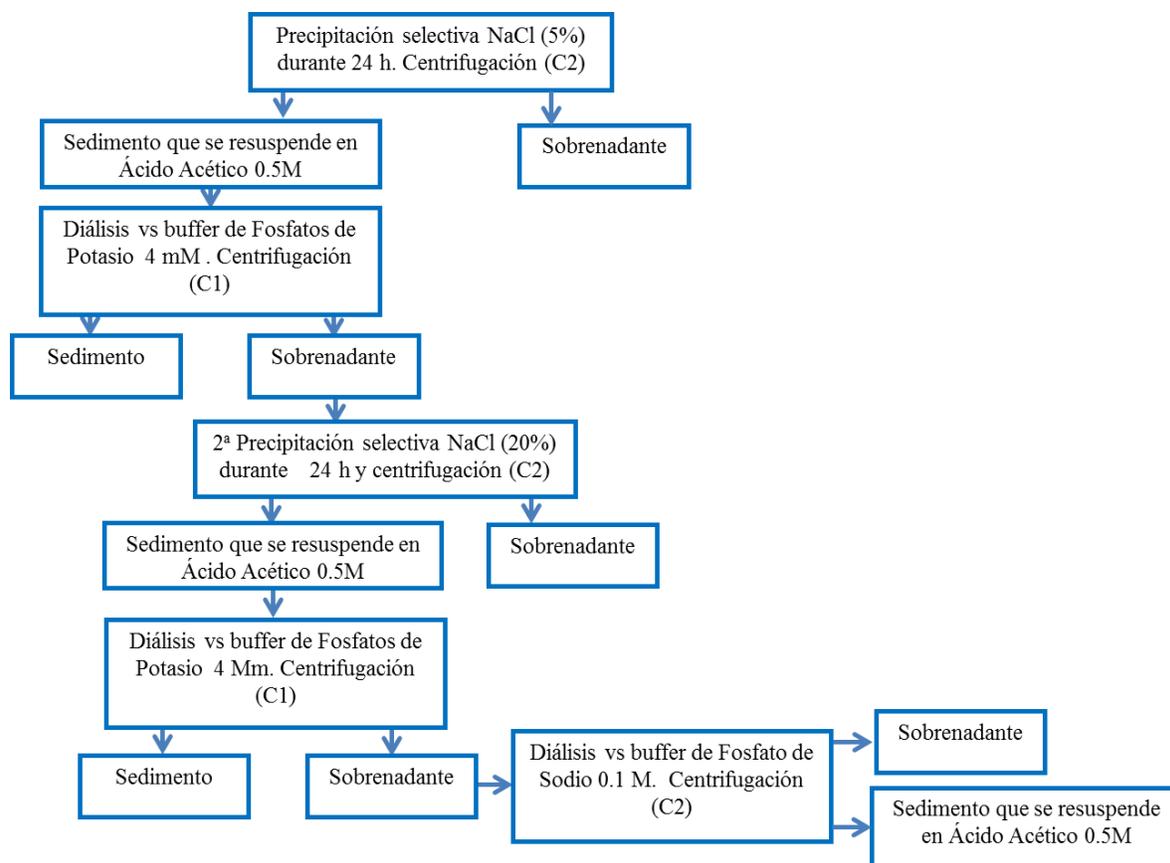
El proceso de purificación comenzó con una primera precipitación selectiva (*salting out*) adicionando cristales de NaCl al 5 % (5 g de NaCl por cada 100 mL de disolución). Se mantuvo en agitación constante durante aproximadamente 24 horas manteniendo una temperatura de aproximadamente 4 °C.

La mezcla se centrifugó a 9000 g durante 30 minutos a 4 °C (Condiciones C2), se conservó el sedimento y se resuspendió en Ácido Acético 0.5 M durante 24 horas.

La disolución se dializó en membranas semipermeables (Spectrum Labs), para retirar las sales que pudieran quedarse durante la precipitación, contra un amortiguador de acetatos de potasio con una concentración 4 mM durante 48 horas (se realizaron 3 cambios de amortiguador).

La disolución dializada se centrifugó bajo las condiciones C1, se desechó el sedimento y el sobrenadante se sometió a una segunda precipitación con NaCl, ahora al 20 % (20 g de cloruro de sodio por 100 mL de disolución). Así, el sobrenadante se centrifugó nuevamente bajo las condiciones C2, se resuspendió el precipitado en Ácido Acético y se mantuvo en agitación constante durante 24 horas. La disolución volvió a dializarse contra un amortiguador de Fosfatos de Potasio y a centrifugarse a condiciones C1.

Se realizó la última diálisis contra un amortiguador de Fosfatos de Sodio 0.01 M durante 48 horas (3 cambios de amortiguador). La disolución dializada se centrifugó por última vez bajo las condiciones C2. El sedimento fue recuperado en Ácido Acético 0.5 M y se conservó en refrigeración hasta su posterior manipulación. La **Figura 2.2** muestra un diagrama del proceso de extracción.



**Figura 2.2** Purificación de colágena tipo I.

### 2.1.1 Caracterización de la proteína

#### *Cuantificación de hidroxiprolina*

El contenido de colágena se determinó cuantificando la cantidad de hidroxiprolina presente en las muestras de acuerdo al método de J.F. Woessner [66]. Este aminoácido, como su

nombre lo indica, deriva de la reacción de hidroxilación de la prolina. Se encuentra presente en el tejido conectivo y es un aminoácido específico de la colágena.

La preparación de las muestras involucra una serie de pasos que se enlistan a continuación. Se colocó 1 ml de la muestra en una ampolleta, se agregó 1 ml de HCl concentrado, obteniendo una concentración final de 6M. Las ampolletas, previamente selladas, se colocaron en una mufla (Thermolyne modelo 48000) a 110°C durante 18 h, para así obtener un hidrolizado. Transcurrido ese tiempo, las ampolletas se abrieron y el contenido se vertió en matraces aforados de 10 ml, para después ajustar la solución a un pH neutro, utilizando soluciones de NaOH y HCl. Una vez neutralizadas, las muestras se aforaron a 10 ml con NaCl 0.2 M. Después de esto, se llevó cabo la reacción de oxidación de la hidroxiprolina, mediante el siguiente procedimiento:

1. Se prepararon tubos de ensayo por duplicado con 0.2 ml de muestra y se llevó a un volumen de 2 ml con agua destilada.
2. Se agregó 1 ml de solución de Cloramina T y se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se adicionó 1 ml de solución de Ácido Perclórico 2.5 M y se agitó vigorosamente.
4. Se agregó 1 ml de 4-Dimetilaminobenzaldehído (pDAB) y se agitó vigorosamente.
5. Después de esto se incubaron las muestras a 60°C durante 20 minutos.
6. Por último se dejaron enfriar y se leyeron en un espectofotómetro “*Epoch BioTek*” a 557nm.

La curva patrón se construyó utilizando soluciones de hidroxiprolina con concentraciones de 0 a 6 µg/ml, cada una por duplicado.

Para determinar la cantidad de colágena se utiliza un factor de conversión [67]:

$$mg \text{ colágena} = \frac{\mu g \text{ hidroxiprolina} * 7.42}{1000} \quad (1)$$

## *Electroforesis*

La electroforesis se realizó con base en el método de Laemmli [68]. Se utilizó una concentración de proteína de 10 µg. La muestra de colágena se mezcló con un buffer de muestra en relación 1:1, se procedió a desnaturalizar las proteínas, para esto, las muestras se colocaron en un baño de agua a 60°C durante 20 minutos.

Se empleó un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida con una concentración de 7.5% para el gel separador y 5% para el gel concentrador en una cámara Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad. La corrida se realizó a 80 mA/gel durante aproximadamente 1 hora. Al término de ésta, se retiró el gel de la cámara, se tiñó con una solución de azul de Coomassie R-250, ácido acético e isopropanol durante 12 h, para finalmente desteñir con una solución de metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua destilada 50%(v/v).

Las imágenes de los geles se obtuvieron en un Sistema de documentación de geles Gel Doc XR (Bio-Rad) utilizando el programa Quantity-One.

## *2.2 Elaboración y entrecruzamiento de andamios*

Los andamios se elaboraron colocando alícuotas de 3 ml de colágena (5mg/ml) en moldes de silicón con un diámetro de 30 mm y una altura de 10 mm. Los moldes se congelaron a -20°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la colágena congelada se liofilizó a -49°C y 0.050 mBar (Labconco *Free Zone 1*) durante 18 horas buscando eliminar el líquido contenido en las muestras. Con el fin de mejorar la bioestabilidad de los andamios, para así lograr una mayor estabilidad térmica y una menor degradación enzimática, estos fueron entrecruzados químicamente mediante una solución de etanol al 95% con diferentes concentraciones de EDC. Dichas concentraciones fueron de 0, 35, 45 y 55 mM a un pH de 5.5. Los andamios en general serán llamados como COL-EDC y el andamio sin entrecruzamiento (0 mM) será llamado COL. La reacción se llevó a cabo durante 24 horas manteniendo una temperatura de 4°C. Posterior al entrecruzamiento, los andamios se enjuagaron cinco veces con agua ultrapura tipo 1 Millipore en un sonicador Branson 1510

(10 minutos por cada lavado) para retirar los residuos del entrecruzante. Los andamios entrecruzados se congelaron y liofilizaron a las mismas condiciones utilizadas anteriormente. En la **Figura 2.3** se esquematiza el procedimiento aplicado para obtener los andamios entrecruzados.



**Figura 2.3** Esquema del procedimiento aplicado para la obtención de andamios de colágena tipo I entrecruzados. Brevemente, andamios de colágena tipo I, extraída de tendón bovino, se obtuvieron mediante liofilización. Posteriormente, los andamios fueron entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC y fueron liofilizados nuevamente.

### 2.2.1 Caracterización fisicoquímica de andamios COL-EDC

#### Morfología

La morfología de los andamios entrecruzados se evaluó mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB). La sección superficial de los andamios fue observada en un microscopio óptico. La microestructura de la sección transversal de los andamios se observó mediante MEB. Debido a que las muestras son biológicas, es decir no conductoras, se recubrieron con una capa fina de oro mediante electrodeposición o deposición asistida por plasma usando un equipo JEOL Fine Coat Ion Sputter JFC-1100.

Las imágenes de MEB se obtuvieron mediante un microscopio “JEOL JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope”, a 10 kV y con diferentes aumentos.

La porosidad es definida como el porcentaje de espacio vacío en un andamio tridimensional y puede ser determinada mediante el valor de la densidad relativa. La densidad relativa ( $\rho^*/\rho$ ) se calculó con la densidad del andamio ( $\rho^*=m/V$ ; donde  $m$  es la masa y  $V$  es el volumen del andamio tridimensional) y la densidad conocida de la colágena, 1.3 g/ml [69–71]. El porcentaje de porosidad se obtuvo mediante la siguiente fórmula [70]:

$$\text{Porosidad (\%)} = (1 - \rho^*/\rho) \times 100 \quad (2)$$

### ***Espectroscopia Infrarroja***

Para determinar los cambios en la estructura de la proteína después del entrecruzamiento con EDC, los andamios COL-EDC se analizaron mediante espectroscopia infrarroja, en un rango de longitud de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros se obtuvieron con el equipo “*Scientific Nicolet 6700 FT-IR*”.

### ***Análisis Térmico***

La estabilidad térmica de los andamios COL-EDC se evaluó a través de Calorimetría Diferencial de Barrido. Las mediciones se realizaron con un “*Differential Scanning Calorimeter 2910 Modulated TA Instruments*”. Los termogramas se obtuvieron al calentar las muestras desde 0 hasta 120 °C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min.

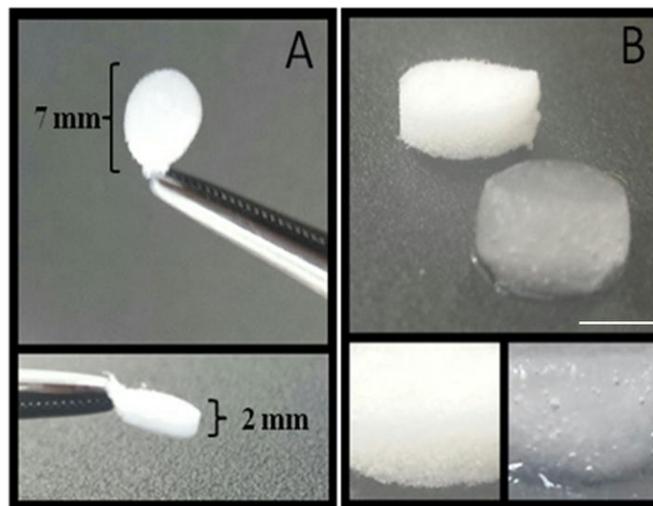
### ***Prueba de absorción***

La capacidad de absorción de agua de los andamios entrecruzados se determinó sumergiéndolos en PBS a temperatura ambiente (Figura 2.4). Un andamio de peso conocido se colocó en PBS por un periodo de tiempo requerido (1 hora). El peso húmedo del

andamio se determinó secando el andamio con papel de filtro para remover el agua absorbida de la superficie y pesándolos, inmediatamente después de esto, en una balanza electrónica. El porcentaje de PBS absorbido por los andamios COL-EDC se calculó empleando la siguiente fórmula [43]:

$$\% \text{ Absorción} = \frac{W_f - W_i}{W_i} * 100 \quad (3)$$

Donde  $W_f$  es el peso del andamio al equilibrio con el PBS y  $W_i$  es el peso inicial del andamio. El análisis se llevó a cabo por triplicado para cada concentración.



**Figura 2. 4** Prueba de absorción. A) Dimensiones utilizadas para la prueba de absorción. B) Andamio antes y después de ser sometido a hidratación con PBS. Barra de escala imagen B de 4 mm.

### *Degradación enzimática*

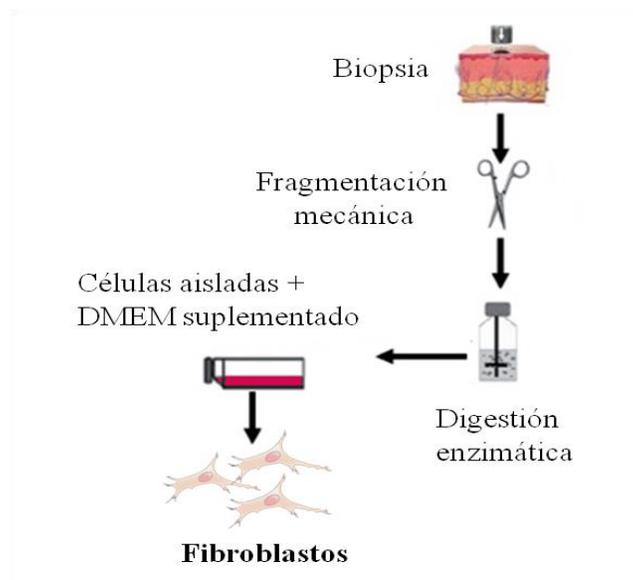
Los andamios entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC (0, 35 mM, 45mM y 55 mM, cada una por triplicado) se sometieron a digestión enzimática utilizando colagenasa tipo I (*clostridium hystolicum* 496 U/mg, Sigma-Aldrich). Los andamios se cortaron en discos, se pesaron ( $P_i$ ) y se sumergieron en una solución de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4) con colagenasa tipo I a una concentración de 5 U/ml, incubándolos a 37°C y cambiando la solución cada 8 horas con el fin de no saturar la solución y mantener siempre una actividad enzimática. A diferentes intervalos de tiempo (0, 12, 24, 48 y 96 h) los andamios se

retiraron de la solución enzimática y se enjuagaron con agua destilada, sometiéndose a liofilización durante 18 horas. Posteriormente se pesaron ( $P_f$ ) para obtener el porcentaje de pérdida de peso utilizando la fórmula (3).

### 2.2.2 Caracterización biológica de los andamios COL-EDC

#### Cultivo celular

Se utilizaron Fibroblastos humanos de cultivo primario para llevar a cabo pruebas biológicas. A partir de biopsias de piel (Figura 2.5), la epidermis y la dermis fueron separadas mediante fragmentación mecánica y agitación constante. Los fibroblastos se aislaron de la dermis mediante digestión enzimática en el Departamento de Biología celular y tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.



**Figura 2. 5** Aislamiento de fibroblastos dérmicos a partir de una biopsia de piel empleando fragmentación mecánica y digestión enzimática.

Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> utilizando medio de crecimiento compuesto por MEM (GibcoBRL), 1% penicilina /estreptomicina, 2 mM de glutamina y

10% de suero fetal bovino (FBS). Los cultivos se incubaron en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

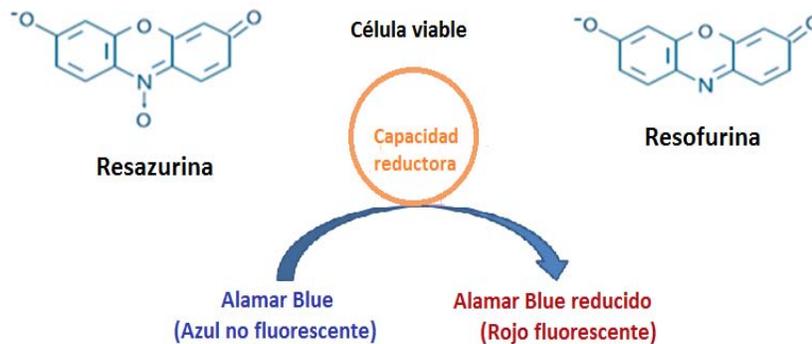
### *Esterilización de andamios*

Los andamios se cortaron en discos (diámetro: 2mm; espesor: 7mm) y se lavaron con PBS y 10% antibiótico-antimicótico durante 24 h, para posteriormente esterilizarlos con luz UV durante 1 hora (30 minutos por cada lado). Después de esto, los andamios se pre-humectaron con medio de crecimiento (MEM suplementado con 2 mM de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas y usados en experimentos subsecuentes.

### *Viabilidad y proliferación celular*

Se sembraron fibroblastos humanos sobre los andamios de COL-EDC pre-humectados a una densidad celular de 1500 células/pozo en una caja de 96 pozos. Se incubaron durante 24 horas con MEM suplementado y después de este tiempo la viabilidad se evaluó utilizando el reactivo AlamarBlue, siguiendo la guía del fabricante [72]. Brevemente, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco con 10% de reactivo de AlamarBlue. El agente AlamarBlue es un indicador REDOX que, en forma oxidante (Resazurina), es azul y no fluorescente. Cuando es incubado con células viables, el reactivo cambia a su forma reducida (Resofurina), la cual es de color rojo y se vuelve fluorescente (Figura 2.6) [72]. Este cambio puede ser detectado utilizando instrumentos de medición de fluorescencia o de absorbancia.

El ensayo con AlamarBlue es un procedimiento sencillo y no tóxico que permite el continuo monitoreo del comportamiento celular en cuanto a la viabilidad [10, 73]. El cambio de color en el AlamarBlue, durante el ensayo, se cuantificó mediante la medición de la absorbancia de 100 µl del sobrenadante en un espectrofotómetro Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) a 570 nm y como referencia a 600 nm. La primera medición se tomó inmediatamente después de la adición del AlamarBlue (tiempo 0).



**Figura 2. 6** Esquema representativo del comportamiento del agente alamarblue al estar en contacto con células viables. En su forma oxidada (Resazurina), el AlamarBlue es azul y no fluorescente. Al ser reducido en el citoplasma de la célula, el AlamarBlue se vuelve rojo y fluorescente (Resofurina).

Las mediciones siguientes se realizaron a diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 4, 5, 6, 8 días). Los experimentos se realizaron por triplicado y en la misma caja se sembraron 9 pozos con diferentes densidades celulares por triplicado como curva de calibración; así mismo, se sembraron células sin andamio con el fin de tener un control positivo y de la misma forma se estudió el comportamiento de andamios sin células. Tanto a la curva, como a los controles positivo y negativo se les realizó el mismo procedimiento y mediciones que a los experimentos.

### *Morfología celular*

La morfología de los fibroblastos en contacto con los andamios COL-EDC se evaluó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las células sembradas en los andamios se fijaron con Glutaraldehído 2.5% en Cacodilato de Sodio 0.1 M durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con Cacodilato de Sodio 0.1 M. Después se les realizó una deshidratación paulatina en soluciones de etanol/agua 30%, 40%, 50%, 60% y 70% por 10 min.

Posteriormente las muestras se sometieron a secado por punto crítico con CO<sub>2</sub>. Finalmente, se depositó una fina capa de oro sobre la muestra mediante deposición asistida por plasma.

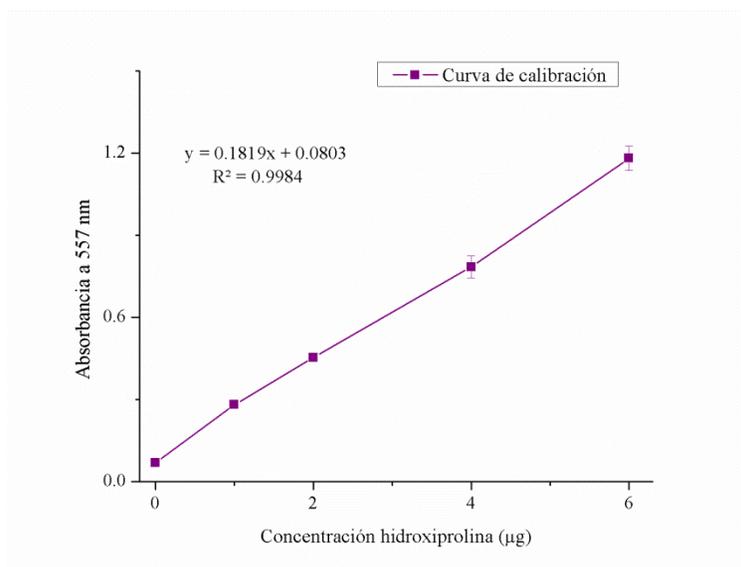
# CAPÍTULO 3

## RESULTADOS

### 3.1 Caracterización de la proteína

#### Cuantificación

Se extrajo colágena tipo I a partir de tendón bovino mediante el procedimiento descrito en la *Sección 2.1*. La determinación de hidroxiprolina se llevó a cabo mediante el método de Woessner [66], la curva de calibración, obtenida utilizando concentraciones de hidroxiprolina de 0 a 6 µg/ml, se muestra a continuación (*Figura 3.1*).



**Figura 3.1** Curva de calibración de hidroxiprolina. La colágena tiene un alto contenido de hidroxiprolina, así, la cuantificación de esta brinda una aproximación al porcentaje de colágena en una muestra.

Con la ecuación obtenida a partir de la curva patrón (Figura 3.1), los valores experimentales de absorbancia de las muestras de colágena y la ecuación 3, es posible obtener la concentración de colágena en las muestras. En la tabla 2 se muestran los datos obtenidos para la colágena extraída de tendón bovino, utilizada para la elaboración de los andamios entrecruzados. La colágena en solución se trabajó a una concentración de 5 mg/ml para la elaboración de los andamios.

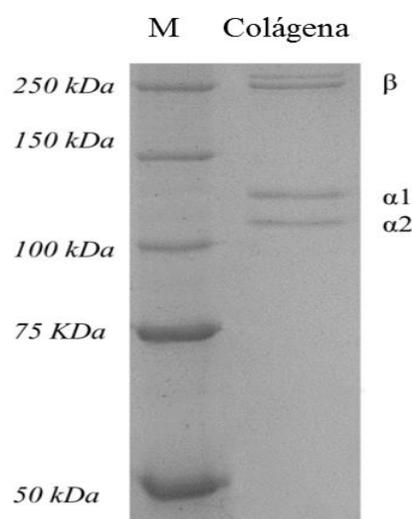
**Tabla 2** Concentración de colágena.

Absorbancia (nm)	Hyp ( $\mu\text{g}$ )	% Colágena	Concentración (mg/ml)
$1.159 \pm 0.17536$	$5.93018 \pm 0.96406$	$1.16328 \pm 0.03735$	$11.63279 \pm 0.37352$

$\pm$  Desviación Estándar

## Electroforesis

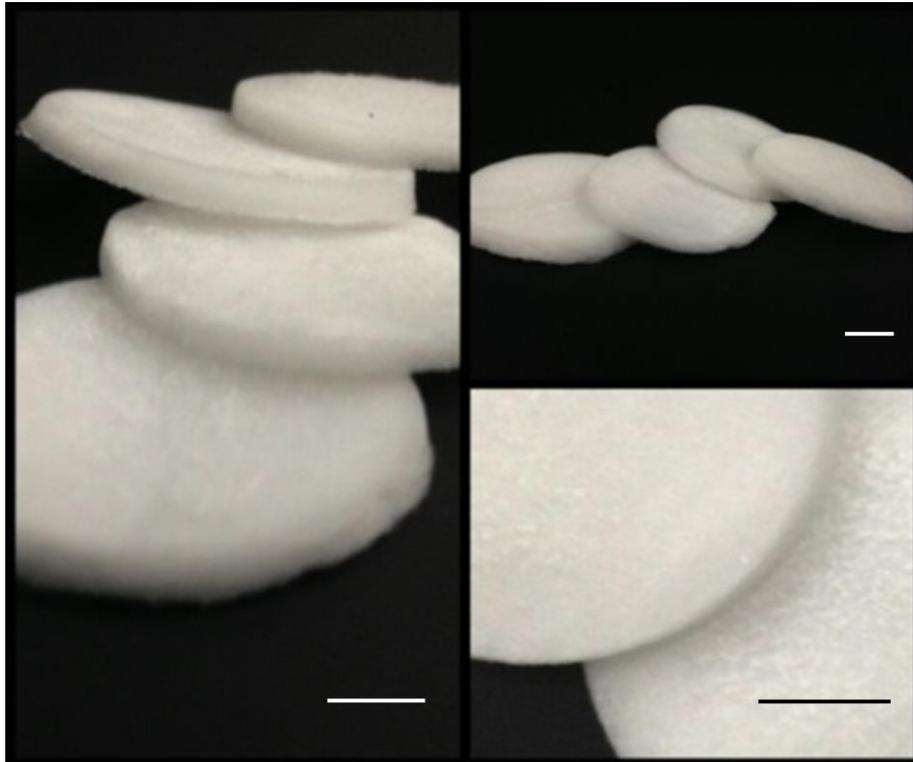
El patrón electroforético (Figura 3.2) muestra dos diferentes bandas de 130 y 140 kDa, correspondientes a las bandas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , respectivamente [74]. Además, el patrón revela una banda de alto peso molecular, la cual se relaciona con la forma dimérica  $\beta$ .



**Figura 3. 2** Patrón electroforético de colágena extraída de tendón de Aquiles bovino. Carril M: Marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Unstained Standadrs BIO-RAD). Condiciones de corrida: Sistema discontinuo (Gel separador 7.5%, Gel concentrador 5%) corrido a 80 mA durante una hora.

### 3.2 Caracterización fisicoquímica de andamios COL-EDC

Las membranas COL-EDC obtenidas en este trabajo (Figura 3.3), se sometieron a distintas técnicas de caracterización para evaluar sus propiedades fisicoquímicas.

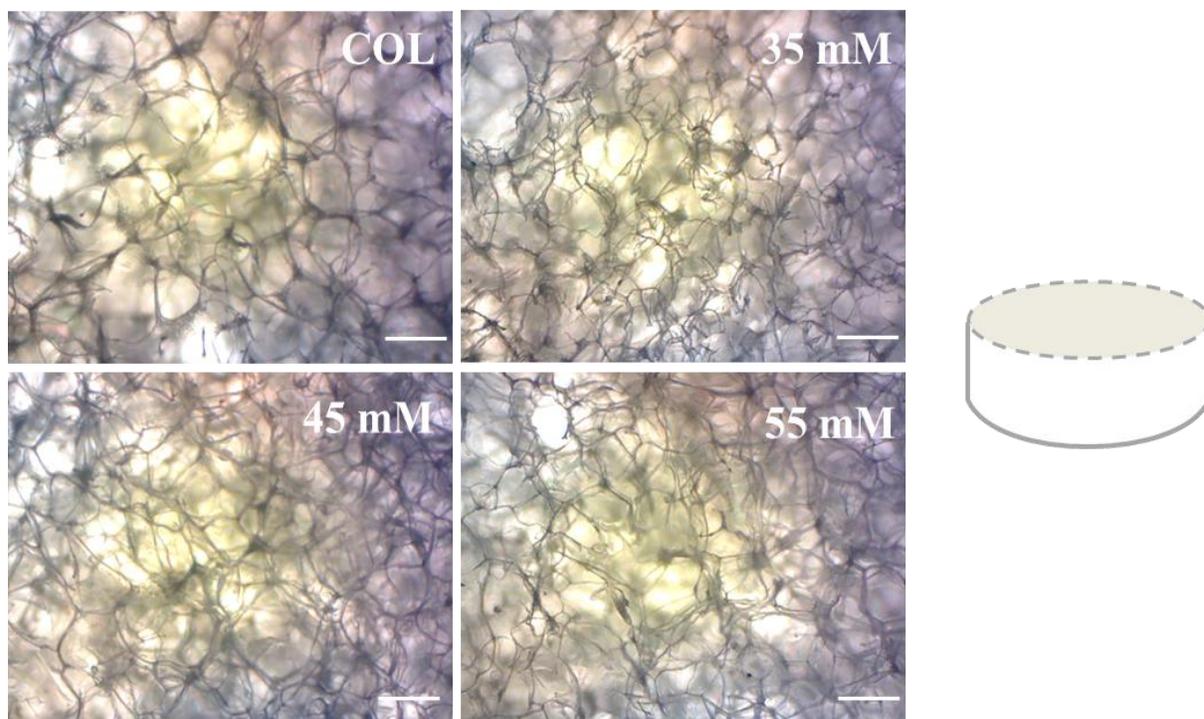


**Figura 3. 3** Andamios de colágena tipo I obtenidos mediante liofilización y entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC. Barra de escala 1 cm.

En la Figura 3.4 se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía óptica. Se observa la cara superficial de los andamios, presentándose una superficie mayormente porosa, con poros uniformes y homogéneos.

Las imágenes de MEB mostradas en la Figura 3.5 son imágenes representativas de un gran número imágenes tomadas; muestran la sección transversal de los andamios y en todos los casos se observa una estructura altamente porosa e interconectada. Se obtuvo la porosidad para los andamios mediante el procedimiento descrito en la Sección 2.2.1, encontrando en

todos los casos un porcentaje de aproximadamente 99%. Así mismo, el tamaño de poro de los andamios estimado, utilizando las micrografías y el programa AxioVision, fue muy similar para todos los andamios (Tabla 3).



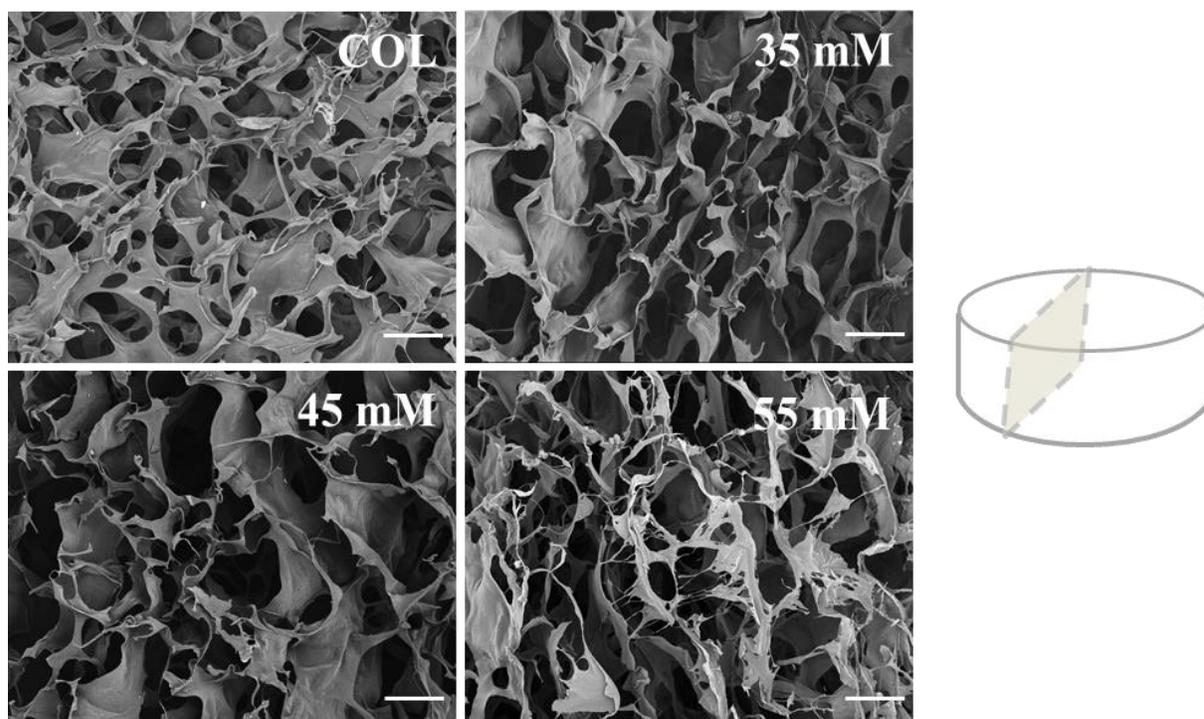
**Figura 3. 4** Imágenes de la sección superficial de los andamios COL-EDC obtenidas mediante Microscopía Óptica. Se observa una estructura porosa homogénea. Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 3** Porosidad relativa y tamaño de poro de andamios COL-EDC.

Muestra	Densidad (g/ml)	Densidad Relativa	Porosidad (%)	Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )
COL	$9.5\text{E-}6 \pm 1.3\text{E-}7$	$7.3\text{E-}6 \pm 0.9\text{E-}7$	$99 \pm 1.0\text{E-}5$	$115 \pm 54$
35mM	$9.9\text{E-}6 \pm 2.6\text{E-}7$	$7.65\text{E-}6 \pm 2.0\text{E-}7$	$99 \pm 2.0\text{E-}5$	$170 \pm 50$
45mM	$1.4\text{E-}5 \pm 2.7\text{E-}7$	$1.1\text{E-}5 \pm 2.1\text{E-}7$	$99 \pm 2.1\text{E-}5$	$121 \pm 72$
55mM	$1.3\text{E-}5 \pm 1.4\text{E-}7$	$9.9\text{E-}6 \pm 1.1\text{E-}7$	$99 \pm 1.1\text{E-}5$	$197 \pm 50$

*\*La densidad, densidad relativa y porosidad se obtuvieron a partir de mediciones de 5 muestras. El tamaño de poro se obtuvo a partir de mediciones de diferentes zonas de los andamios (500 mediciones por n imágenes, n=6).*

Los espectros infrarrojos de los andamios COL-ED se muestran en la [Figura 3.6](#). El espectro de COL (colágena sin entrecruzar) presenta las bandas características de la colágena, las bandas Amidas A, B, I, II y III (Tabla 4).



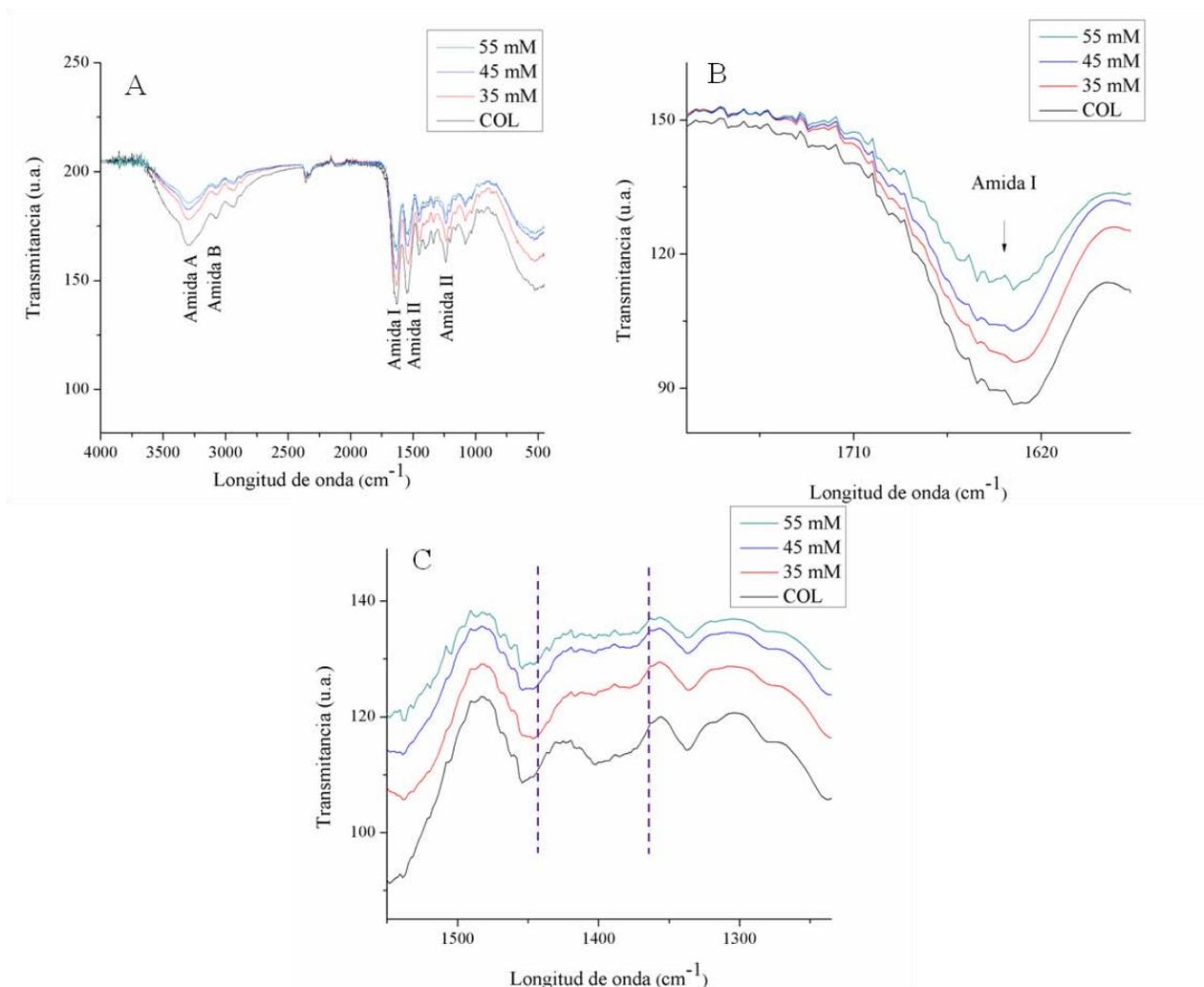
**Figura 3. 5** Sección transversal de los andamios COL-EDC observada mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Se observa una estructura porosa en todos los casos. Barra de escala 100 $\mu$ m.

**Tabla 4** Posición de las bandas de IR en andamios COL-EDC.

Muestra	Amida A	Amida B	Amida I	Amida II	Amida III
COL	3300	3077	1633	1538	1237
35	3204	3078	1631	1538	1234
45	3300	3078	1633	1538	1235
55	3292	3077	1633	1538	1235
Vibración	$\nu_{\text{NH}}$ , $\nu_{\text{OH}}$	$\nu_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{C=O}}$ , $\nu_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{CN}}$ , $\delta_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{CN}}$ , $\delta_{\text{NH}}$

Después del entrecruzamiento con EDC, las bandas en lo espectros de los andamios entrecruzados se presentaron en frecuencias muy similares a las de la colágena sin entrecruzar. La banda Amida I, presenta un decremento en su intensidad a medida que el

entrecruzamiento toma lugar (Figura 3.6B). De igual forma, la tensión característica del carboxilo, observada entre 1440 y 1390  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3.6C), aparece en el espectro de COL, sin embargo decrece (casi hasta desaparecer) en los espectros de los andamios entrecruzados.



**Figura 3. 6** Espectros IR de andamios COL-EDC. Se observan las bandas características de la colágena en todas las muestras (A). Hay un cambio en la intensidad de la banda Amida I debido al proceso de entrecruzamiento (B). Desaparición de la banda correspondiente al carboxilo (C).

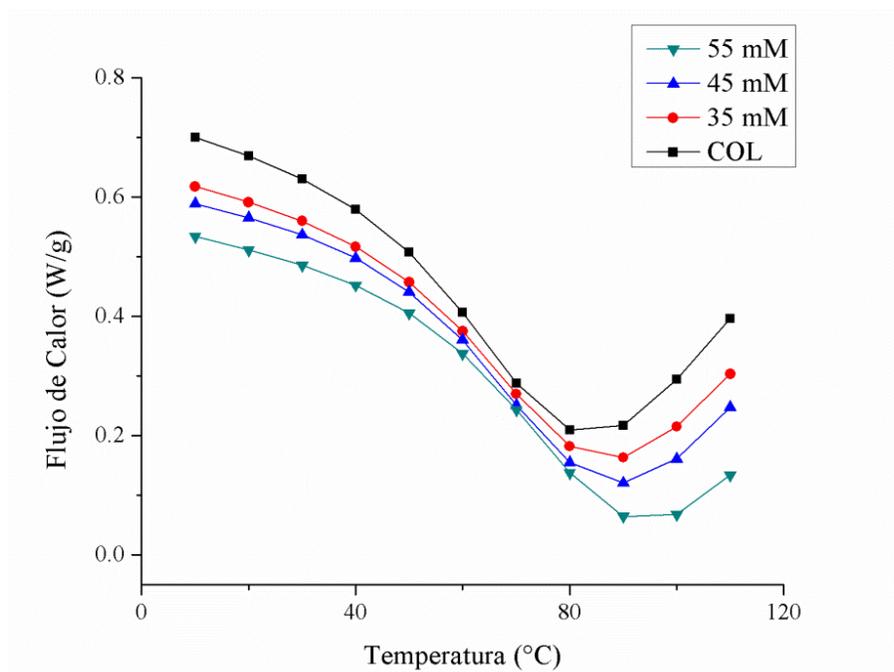
Los resultados de la absorción de PBS se muestran en la tabla 5. En general, los andamios entrecruzados presentan una mayor capacidad de absorción que el andamio sin entrecruzar (COL). La absorción máxima de PBS se presentó en el andamio con 55 mM de EDC.

**Tabla 5** Porcentaje de absorción de PBS en andamios COL-EDC.

Muestra	Absorción PBS (%)
COL	2050
35mM	2764
45mM	8620
55mM	12656

### *Análisis térmico*

Los termogramas de los andamios entrecruzados obtenidos a través de CDB muestran leves diferencias en la temperatura de desnaturalización  $T_d$ , a medida que la concentración del EDC aumenta (Figura 3.7).



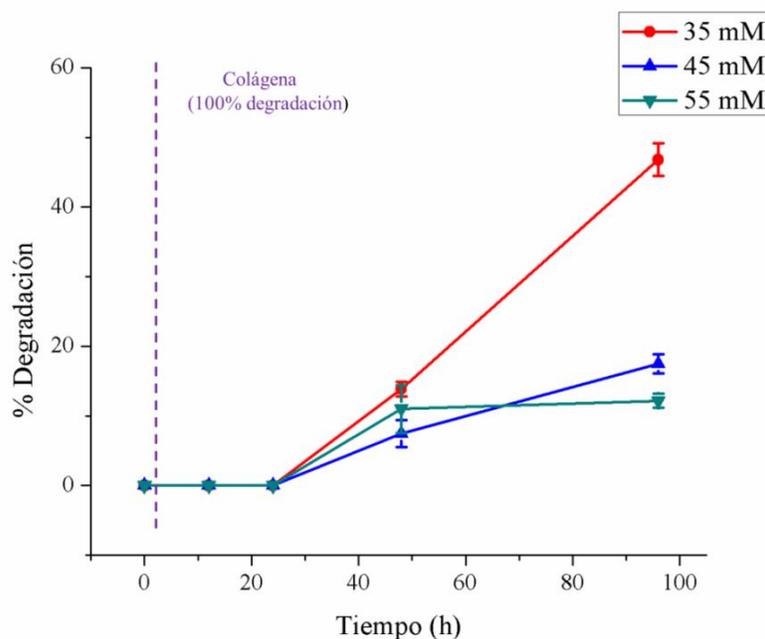
**Figura 3. 7** Termograma de andamios COL-EDC. Las muestras presentan el mismo perfil térmico, sin embargo, un corrimiento en la temperatura  $T_d$  se presenta a mayor concentración de EDC.

El andamio entrecruzado con 55 mM de EDC presentó el valor más alto, con una  $T_d$  de 95°C, seguido de 45 mM y 35 mM (ambos alrededor de 90°C). Finalmente COL, es decir el andamio sin entrecruzamiento, muestra el valor más bajo (80°C).

### Degradación enzimática

La degradación enzimática de los andamios COL-EDC fue evaluada mediante el monitoreo del porcentaje del peso residual después de diferentes tiempos de incubación en una solución de colagenasa tipo I (5 U/ml) en Tris-HCl 0.1 M.

En la **Figura 3.8** se grafica la pérdida de peso (%) como función del tiempo. La muestra COL presentó la menor resistencia a la degradación, disolviéndose en sólo dos horas después de haber comenzado la prueba. En contraste, los andamios tratados con EDC se disolvieron lentamente en la solución de colagenasa, presentado un 12%, 17% y 46% de degradación, después de 96 horas, para 55, 45 y 35 mM respectivamente.

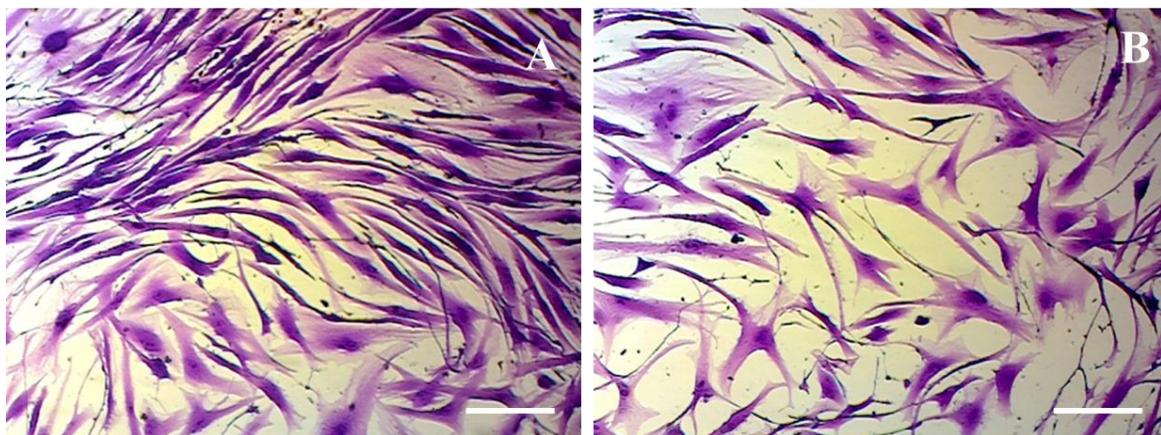


**Figura 3. 8** Degradación enzimática de andamios COL-EDC. La tasa de degradación enzimática decrece a mayor concentración de EDC. La línea punteada representa el tiempo en el que la muestra COL se disolvió por completo (2 horas).

### 3.3 Caracterización biológica de andamios COL-EDC

Los fibroblastos humanos obtenidos de dermis recién aislados se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fueron descongelados y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo; cuando estuvieron al 90% de confluencia se tripsinizaron y fueron resembrados (expansión).

En la **Figura 3.9** se muestra un cultivo de fibroblastos *in vitro* teñido con violeta de metilo (comúnmente conocido como cristal violeta) al 0.5 %; el cual es un colorante basófilo que atraviesa la membrana celular, se acumula en el citoplasma y tiene la habilidad de conectarse al ADN.



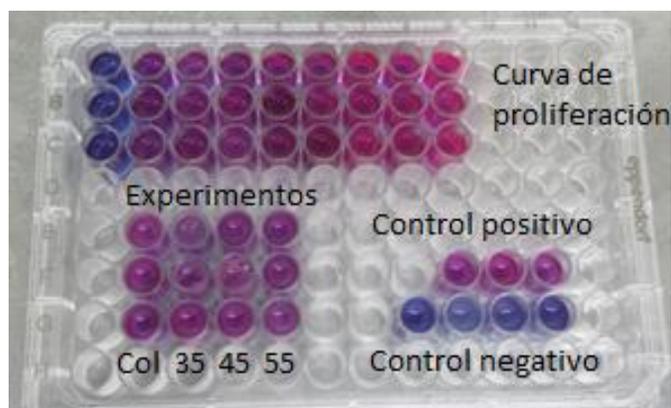
**Figura 3. 9** Fibroblastos teñidos con cristal violeta al 0.5% mostrando morfología fusiforme típica. Zona confluyente (A). Zona con menor confluencia (B). Barra de escala 40  $\mu\text{m}$ .

Esta imagen evidencia que en condiciones estándares, los fibroblastos presentaron una morfología fusiforme.

#### *Viabilidad y Proliferación celular*

La viabilidad y proliferación celular de los fibroblastos sembrados en los andamios COL-EDC se evaluaron durante 8 días de incubación utilizando el agente AlmarBlue. En la

Figura 3.10 se presenta una fotografía del ensayo de viabilidad y proliferación de fibroblastos utilizando AlamarBlue después de 18 h de haber comenzado. A este tiempo ya es perceptible el vire de color de las células viables que han metabolizado el agente.



**Figura 3. 10** Ensayo con AlamarBlue a las 18 horas de cultivo. Es posible observar el cambio de color (vire) del AlamarBlue al estar en contacto con células viables. En la imagen se muestra la curva patrón, los experimentos (andamios y células), así como los controles positivo (células sin andamio) y negativo (andamio sin células).

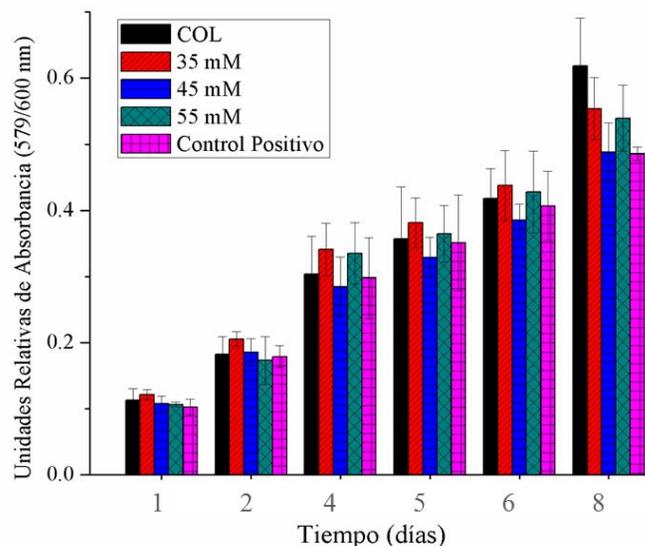
El cambio de color en los pozos correspondientes a los experimentos (andamios en contacto con andamios), indica que los andamios no son citotóxicos y que no afectan la viabilidad celular puesto que las células conservan su capacidad reductora dentro del citoplasma.

Por otra parte, en la **Figura 3.11** se demuestra cuantitativamente que el tratamiento con EDC no es citotóxico, mostrando una viabilidad equivalente en los andamios entrecruzados que el andamio COL; ya que se presenta el mismo perfil de proliferación en todos los casos.

### ***Morfología celular***

La morfología de los fibroblastos cultivados en presencia de los andamios COL-EDC se examinó mediante MEB (**Figura 3.12**). Las imágenes se obtuvieron a diferentes tiempos de cultivo (3 horas, 24 horas y 7 días). La morfología de los fibroblastos en los andamios COL

(no entrecruzados) no pudo observarse debido a la baja estabilidad de la muestra, lo cual generó la degradación y colapso de los andamios.

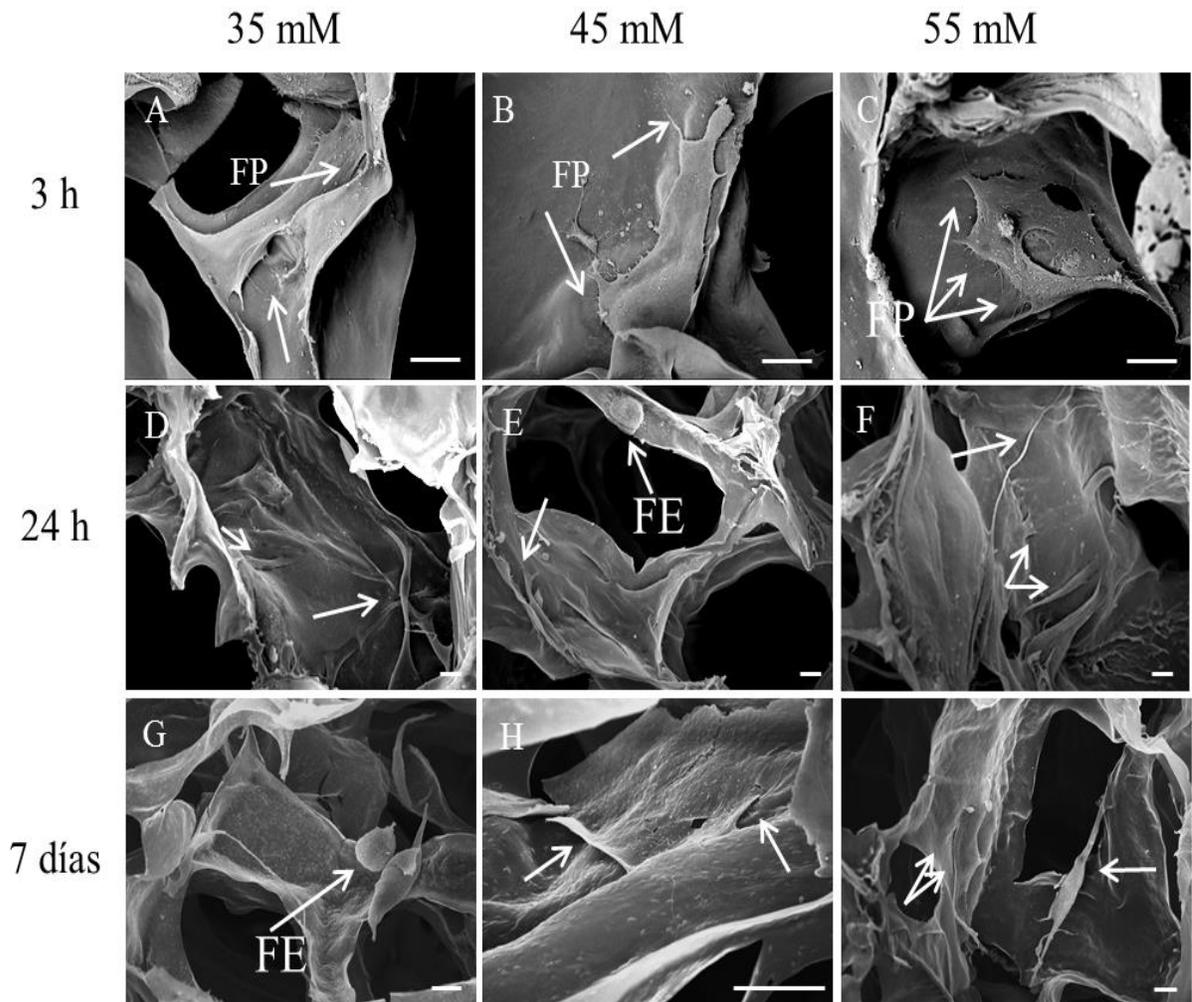


**Figura 3. 11** Efecto de los andamios COL-EDC en la proliferación de fibroblastos humanos. Tanto la viabilidad como la proliferación celular fueron evaluadas mediante la reducción de AlamarBlue expresada en unidades relativas de absorbancia.

Después de 3 horas de cultivo en los andamios, las células muestran una morfología elongada típica de los fibroblastos. Asimismo, las células presentaron extensiones citoplasmáticas, a través de filipodios (FP), que se enlazan con el andamio. Después de 24 h de cultivo, la densidad celular aumentó.

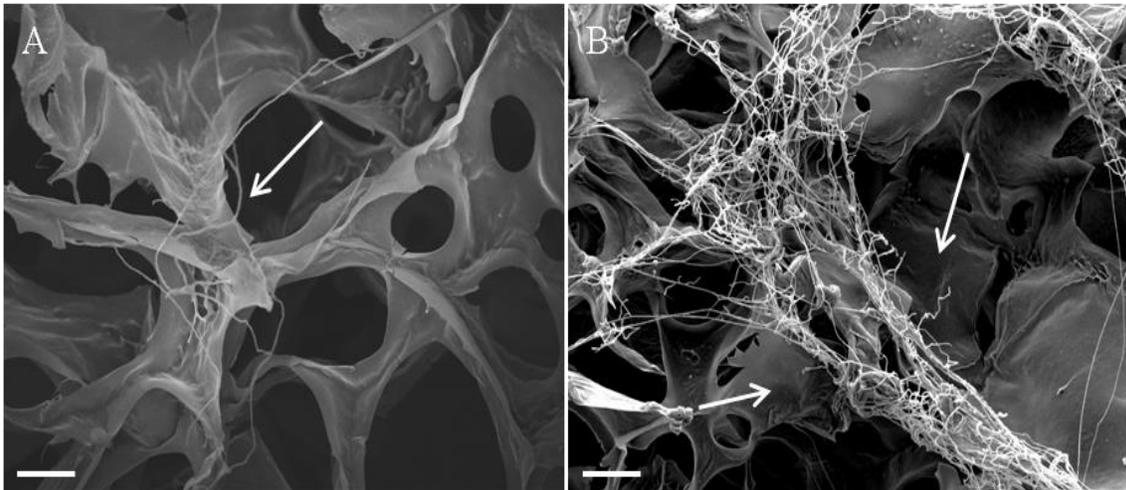
Las células cubrieron una gran parte de la superficie total de los andamios, presentando varios puntos de unión con los andamios.

Además, a las 24 h, en algunas regiones de los andamios 35 y 55 mM, fue posible observar la síntesis de una matriz fibrosa (Figura 3.13), mostrando el andamio de 55 mM un contenido mayor de fibras (Figura 3.13B). El comportamiento de crecimiento y proliferación de los fibroblastos fue analizado después de 7 días de cultivo.



**Figura 3. 12** Morfología celular de fibroblastos sembrados en COL-EDC. Células después de 3 horas de cultivo en los andamios; las células presentan extensiones citoplasmáticas a través de filipodios (FP) hacia la superficie de los andamios (A-C). A las 24 horas de cultivo, las células presentan varios puntos de unión con los andamios y con otras células; asimismo células en forma esférica (FE) pueden observarse (D-F). Después de 7 días de cultivo, las células han formado una delgada capa celular (G-I). Barra de escala 10  $\mu$ m.

Fue posible observar la formación de una delgada capa de células. A este tiempo, también se lograron identificar células en forma esférica, lo que significa que los fibroblastos seguían proliferando a los 7 días.



**Figura 3. 13** Flechas indicando la producción de matriz fibrosa en 35 mM (A) y 55 mM (B) observada a las 24 horas de cultivo. Barra de escala 40  $\mu$ m.

# CAPÍTULO 4

## DISCUSIÓN

---

Existen lesiones de piel que, debido a su extensión, profundidad u origen, no permiten la adecuada cicatrización; por lo que es necesario utilizar sustitutos cutáneos. Estos sustitutos, llamados muchas veces andamios, pueden ser elaborados por distintas técnicas y con diferentes materiales. Aunque la colágena es un material utilizado en el área de los biomateriales, sus aplicaciones se ven limitadas ya que presenta una baja estabilidad térmica y una tasa de degradación enzimática alta. Debido a esto es necesario encontrar un método que estabilice a la proteína sin que afecte su biocompatibilidad. En ese contexto, este trabajo tuvo como objetivo principal obtener andamios de colágena tipo I entrecruzados con EDC, para evaluar, mediante su caracterización fisicoquímica y biológica, su posible aplicación como sustituto cutáneo.

El proceso de extracción de la colágena se llevó a cabo utilizando tendón de Aquiles bovino como fuente de la misma. La colágena presenta la secuencia repetitiva Gly-X-Y, donde la posición X en general representa al residuo de 4-hidroxirolina. La hidroxiprolina en la colágena se encuentra en dos formas isoméricas. La *trans*-4-hidroxirolina (4-Hyp) constituye más del 95% de la hidroxiprolina total de las colágenas tipo I y tipo III. Una cantidad crítica de *trans*-4-hidroxirolina es un prerrequisito para el plegamiento de las cadenas  $\alpha$  en las triple hélices, conformación necesaria para la secreción normal de las moléculas de procolágena hacia el exterior de la célula [54]. Debido a la alta concentración de 4-Hyp que contiene la colágena (14% del peso en seco de la colágena está compuesto por 4-Hyp), la concentración de hidroxiprolina ha sido utilizada para estimar el contenido de colágena [67, 75]. La cuantificación de hidroxiprolina hizo posible conocer la

concentración de colágena extraída, para así poder fijar la concentración final usada en la elaboración de los andamios.

Con el fin de evaluar la pureza de la colágena extraída de tendón de Aquiles bovino, la proteína fue caracterizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). El patrón electroforético de la [Figura 3.2](#) muestra dos diferentes bandas, correspondientes a las bandas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , respectivamente [74]; estas bandas, se refieren a las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , las cuales se encuentran en la colágena tipo I. El patrón revela, también, una banda de alto peso molecular (250 kDa), la cual es relacionada con la forma dimérica  $\beta$ ; esto en concordancia con los resultados publicados por Phanat Kittiphattanabawon *et. al* [76]. Estos resultados sugieren que la colágena extraída tiene la estructura típica de la colágena tipo I y no existen productos de degradación.

La morfología de los andamios fue estudiada mediante microscopía óptica ([Figura 3.4](#)) y electrónica de barrido ([Figura 3.5](#)). En las imágenes mostradas se observa que, en todos los casos, los andamios presentan una estructura altamente porosa e interconectada. La porosidad calculada de los andamios fue de aproximadamente 99%, en todos los casos (Tabla 3). Esto sugiere que la morfología de los andamios, obtenida por la técnica de liofilización, no se ve afectada por el entrecruzamiento químico mediante EDC. Cabe destacar que los andamios biológicos deben presentar una microestructura apropiada, la cual consiste en una superficie larga y porosa y deben presentar una porosidad mayor al 90%. Esto es debido a que es conocido que estos factores influyen en el crecimiento, proliferación y adhesión celular [41]. Por lo tanto, los resultados anteriores exhiben que los andamios de COL-EDC, obtenidos en este trabajo, tienen una microestructura apropiada para ser aplicados en ingeniería de tejidos.

Los espectros infrarrojos de los andamios COL-EDC mostrados en la [Figura 3.6](#), sugieren que la estructura secundaria de la colágena no se ve afectada por el entrecruzamiento, ya que las bandas en los espectros de los andamios entrecruzados se presentaron en frecuencias muy similares a las de la colágena sin entrecruzar (Tabla 4). Esto es de vital importancia, ya que el objetivo de este trabajo es modificar las características de la colágena que limitan su aplicación en ingeniería de tejidos, sin afectar sus propiedades biológicas. A pesar de no

haber cambio en las bandas, la intensidad de las bandas varía en función de la concentración del EDC.

La Banda Amida I, que está asociada principalmente (en un 80%) a las vibraciones de tensión del grupo carbonilo ( $\nu_{C=O}$ ), a la tensión del enlace C-N (10%) y a las vibraciones de flexión del enlace N-H (10%), y es la banda infrarroja más útil para el análisis de la estructura secundaria de las proteínas; presenta un decremento en su intensidad a medida que el entrecruzamiento toma lugar (Figura 3.6B). Esto, debido a la formación de nuevos enlaces covalentes a través de los grupos carboxilo de los residuos del ácido glutámico y el ácido aspártico por medio del entrecruzamiento. La tensión característica del carboxilo (Figura 3.6C), que aparece en el espectro de COL, pero decrece (casi hasta desaparecer) en los espectros de los andamios entrecruzados, indica que varios grupos carboxilo toman parte en la reacción de entrecruzamiento. A pesar de no observar un incremento significativo en la banda Amida A, asociada con la vibración de tensión de los enlaces N-H y O-H ( $\nu_{NH}$  and  $\nu_{OH}$ ); el decremento en las intensidades de la Amida I sugiere la formación de una estructura con mayor entrecruzamiento covalente; así también, el debilitamiento de la banda característica del grupo carboxilo está relacionada con la formación de nuevos enlaces. Estos nuevos enlaces confieren una mayor estabilidad a los andamios.

Los resultados de la absorción de PBS muestran que los andamios entrecruzados presentan una mayor capacidad de absorción que el andamio sin entrecruzar (COL). Este andamio presenta un porcentaje de absorción de aproximadamente 2000%. Este resultado coincide con lo publicado por Martínez et.al. [77] y Skopinska-Winsniewska et.al. [78], quienes reportan porcentajes de 2000 y 2200 para colágena nativa, respectivamente. La absorción máxima de PBS se presentó en el andamio con mayor concentración de EDC, es decir, 55 mM. La influencia del EDC en las propiedades de absorción de los andamios se puede deber a las varianzas en la hidrofiliidad causadas por la reducción en los grupos laterales de la proteína y la presencia de los nuevos enlaces químicos producidos mediante el entrecruzamiento [79]. La formación de esto nuevos enlaces queda evidenciada gracias a los espectros IR de las muestras. La importancia de estudiar la capacidad de absorción de andamios biológicos reside en la posible aplicación de los mismos. En este caso, los andamios COL-EDC, podrían aplicarse como sustitutos cutáneos, y su alta capacidad de

absorción les confiere una característica excelente al hablar del exudado en quemaduras o en úlceras crónicas, puesto que puede ayudar a la regulación del mismo.

Es bien sabido que el conocimiento de la estabilidad térmica de un material, así como la caracterización de sus transiciones, es de primordial importancia en los materiales con potenciales aplicaciones biomédicas. Esto debido a que la estabilidad térmica de un material está ligada a la estabilidad de sus enlaces y a la cantidad de energía que será necesaria aplicar para romper dichos enlaces. Así pues, un material con una estabilidad térmica alta es aquel que posee enlaces fuertes y que no será tan fácil de romper y/o degradar. Las diferencias en la Temperatura de desnaturalización que se observan en los termogramas de los andamios entrecruzados se encuentran íntimamente ligadas a la concentración de EDC (Figura 3.7). La temperatura de desnaturalización, también conocida como temperatura de contracción, es considerada como la temperatura a la cual comienza la desnaturalización de la colágena, esto debido a la ruptura de los enlaces intercatenarios provocando la contracción de la proteína. Consecuentemente esta temperatura ha sido definida como una medida de la estabilidad estructural de la colágena. Ya que la  $T_d$  aumenta con el aumento de concentración de EDC, sugiere que el EDC brinda una mayor estabilidad a los andamios puesto que es necesaria una energía mayor para poder romper los enlaces intercatenarios. Estos resultados, en concordancia con los obtenidos con la espectroscopia infrarroja, nos hablan de una mayor estabilidad en los andamios entrecruzados, lo que puede ampliar su aplicación en ingeniería de tejidos. Algunos autores, como Krishnamoorthy [80], proponen métodos de entrecruzamiento de colágena utilizando ácido gálico, obteniendo una  $T_d$  de 80°C. Esto significa que el entrecruzamiento con EDC provoca una mejor estabilidad térmica en esta proteína. Debido a la estabilización de la triple hélice de la colágena mediante el entrecruzamiento, se requiere una energía adicional durante el calentamiento para romper los enlaces adicionales. Por lo tanto, es de esperarse que a partir de colágena entrecruzada con EDC se obtengan andamios con mayor estabilidad, previniendo la desnaturalización a bajas temperaturas.

Esta estabilidad se ve reflejada, también, en el ensayo de degradación enzimática (Figura 3.8). La colágena nativa presenta una alta tasa de degradación enzimática, reduciendo sus posibles aplicaciones clínicas [80]. La degradación enzimática de los andamios COL-EDC,

evaluada mediante la actividad de colagenasa tipo I (la cual, es un miembro de la familia de las MMP y está involucrada en la renovación de la matriz extracelular), deja claro que con el entrecruzamiento con EDC, los andamios presentan menores tasas de degradación. El andamio COL se degradó completamente dos horas después de empezar el ensayo y el andamio 55 mM mostró una degradación del 12% después de 96 horas. La estabilidad de un andamio, en términos de degradación enzimática, es muy importante debido a que dicho sustrato debe permitir que las células comiencen a poblarlo, antes de que sea degradado. Las lesiones de una extensión mayor al centímetro cuadrado, son incapaces de cicatrizar sin la aplicación de un sustituto cutáneo o sin una intervención quirúrgica, ya que los fibroblastos y queratinocitos de la periferia no llegan a encontrarse. Es por eso, que un sustituto cutáneo no debe degradarse tan rápidamente, ya que debe servir como puente para las células. Recientemente, diferentes tipos de entrecruzantes se han usado para aumentar la resistencia de la colágena ante la degradación enzimática. Skopinska-Wisniewska et.al. [14], utilizaron ácido escuárico como entrecruzante, encontrando una degradación aproximada del 17% para su andamio más entrecruzado después de estar en contacto con la solución de colagenasa durante sólo una hora. Otros autores [80], proponen el uso de ácido gálico como entrecruzante de andamios de colágena, observando que, al estar en contacto con la solución enzimática 96 horas, el andamio con el mayor contenido de ácido gálico presenta un 16% de degradación. Por lo tanto, utilizar EDC para mejorar la estabilidad estructural de andamios de colágena mediante la formación de nuevos enlaces, resulta un método más efectivo, previniendo la digestión provocada por la colagenasa.

Además de la caracterización fisicoquímica de los andamios y debido al objetivo principal de este trabajo, se evaluó la viabilidad, la proliferación y la morfología de fibroblastos humanos en contacto con los andamios COL-EDC. Está demostrado que células sembradas en andamios de colágena proliferan satisfactoriamente [81, 82]. Como se mencionó en la *Sección 1.1*, los fibroblastos representan la población celular más abundante dentro de la dermis. Es por ello que las pruebas biológicas se llevaron a cabo utilizando este tipo celular.

La viabilidad celular es un término utilizado para referirse a la cantidad o proporción de células que permanecen vivas después de alguna situación en particular. En este caso, la

situación que se presenta, es el contacto de las células con los andamios COL-EDC. En general, las células viables mantienen un ambiente reductor en su citoplasma.

La viabilidad y proliferación celular de los fibroblastos sembrados en los andamios COL-EDC fueron evaluadas utilizando AlmarBlue. Los resultados de esta prueba, demuestran que el entrecruzamiento con EDC no es citotóxico, puesto que el entrecruzamiento no afecta la viabilidad celular. En la [Figura 3.11](#) se aprecia que, tanto los andamios entrecruzados con el andamio COL, presentan el mismo perfil de proliferación, evidenciando que el entrecruzamiento químico con EDC no perturba la proliferación de los fibroblastos. Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, existen otros entrecruzantes que han sido estudiados con el fin de mejorar las características de la colágena. Es de vital importancia que el uso de estos entrecruzantes no afecten las características biológicas de la proteína, ya que se busca un conjunto de buenas características (físicoquímicas y biológicas) para así obtener un andamio con una alta posibilidad de implantación. Agentes entrecruzantes como Glutaraldehído o Formaldehído, han presentado una mejora en el comportamiento físicoquímico de la colágena. Sin embargo, se ha observado que estos agentes están asociados con un efecto citotóxico. Meyer et.al. [61] reportan negativos en las propiedades biológicas utilizando formaldehído y glutaraldehído al 0.1%. En ambos casos se presenta una alta toxicidad en los andamios, habiendo una inhibición de proliferación mayor al 30%. Esto demuestra que, el EDC es una de las mejores elecciones cuando se necesita mejorar las características de un andamio de colágena ya que, con los resultados mostrados hasta este punto, se ha observado una mejora en las propiedades de la colágena y no se ha afectado el comportamiento biológico. Esto se debe a la naturaleza del EDC, ya que al ser un agente entrecruzante de longitud cero, no forma parte del producto final y no promueve la inhibición del desarrollo celular dentro del andamio.

Igualmente se analizó la morfología de los fibroblastos cultivados en presencia de los andamios COL-EDC ([Figura 3.12](#)), esto mediante micrografías de MEB obtenidas a diferentes tiempos de cultivo (3 horas, 24 horas y 7 días). El andamio COL, al estar bajo condiciones de cultivo (temperatura, humedad, etc.), colapsó y comenzó a degradarse, esto debido a su baja estabilidad; por ello vale la pena reiterar que es de suma importancia encontrar métodos que mejoren su comportamiento de la colágena ante estas condiciones, siendo uno de estos, el entrecruzamiento con EDC.

En general, las células cultivadas en los andamios COL-EDC mostraron una morfología extendida colonizando así la estructura tridimensional de los andamios. Las células presentaron filipodios para enlazarse con los andamios, lo cual sugiere que los fibroblastos presentan una alta afinidad hacia los andamios entrecruzados.

Estos resultados corroboran que, después del entrecruzamiento con EDC, los andamios siguen siendo biocompatibles y brindan un ambiente amigable a las células. No se encontró un efecto significativo sobre la concentración de EDC en la unión celular.

Después de 7 días de cultivo se observaron células en forma esférica, lo que sugiere que los fibroblastos siguen proliferando a este tiempo, mismo comportamiento observado en el ensayo de proliferación con AlamarBlue. Debido a que los fibroblastos, la población celular mayoritaria en dermis, mostraron una gran afinidad hacia los andamios COL-EDC y que tuvieron una buena interacción con la superficie de los mismos, estos andamios entrecruzados pueden considerarse como biomateriales con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos de piel.

La [Figura 3.13](#) muestra una producción fibrosa en los andamios 35 mM y 55 mM, esto sugiere que los fibroblastos están activos dentro de los andamios, ya que esta matriz fibrosa puede ser la que las mismas células están produciendo. Sin embargo, es necesario hacer otro tipo de pruebas que corroboren esta información, y con las que se pueda evaluar a profundidad el comportamiento biológico de los andamios.

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

## *Conclusiones*

La búsqueda de técnicas que mejoren el comportamiento fisicoquímico de la colágena, para así poder ampliar las aplicaciones de este material, ha sido extensa y se ha llevado a cabo a lo largo de varios años. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran que es posible obtener andamios con base en colágena entrecruzados con diferentes concentraciones de EDC que presenten un comportamiento biológico adecuado así como propiedades fisicoquímicas reforzadas para poder ser aplicados como sustitutos cutáneos en lesiones dérmicas.

Los andamios obtenidos presentaron morfología porosa, con un tamaño de poro promedio que es adecuado para el crecimiento y la proliferación celular, y es un factor de vital importancia para los andamios con aplicaciones biomédicas. Esta morfología no se ve afectada por el entrecruzamiento con EDC, sin embargo, sí confiere una mayor capacidad de absorción a los andamios, la cual podría ser útil para la aplicación como apósitos cutáneos y ayudar en la regulación térmica del paciente.

El estudio estructural de los andamios demostró que la colágena en su estructura secundaria no se ve afectada por el entrecruzamiento, pero sí hay cambios respecto a la estabilidad de la molécula. Tanto el análisis térmico como el análisis de degradación, exhibieron que, entre mayor concentración de entrecruzante, mejores propiedades en los andamios.

Asimismo, mediante la caracterización biológica la citotoxicidad de los andamios fue evaluada. Los andamios presentaron un ambiente favorable para la proliferación y adhesión celular, debido a las excelentes características biológicas que la colágena posee y que mantiene aún después del entrecruzamiento.

Por lo tanto, las diferentes técnicas de caracterización, a las cuales fueron sometidos los andamios, demuestran que se obtuvieron biomateriales adecuados para la aplicación deseada, que presentan una microestructura y una composición apropiadas para el desarrollo celular (proliferación y adhesión) además de mostrar una mayor estabilidad térmica y una tasa de degradación enzimática menor que la del andamio control (colágena sin entrecruzar).

### *Perspectivas*

La experimentación llevada a cabo en esta investigación abarcó la caracterización, tanto físicoquímica como biológica, de andamios de colágena tipo I entrecruzada con EDC. Sin embargo, para lograr un estudio integral de éstos, es necesario realizar otras técnicas de caracterización para profundizar tanto en su comportamiento biológico como físicoquímico.

- Es primordial analizar la inmunogenicidad de la colágena entrecruzada, para analizar si esta no cambia después del proceso de entrecruzamiento químico.
- Es necesario analizar la degradación enzimática durante tiempos más largos a los estudiados para poder obtener un perfil de degradación más detallado. De igual forma, estudiar la degradación de los andamios COL-EDC *in vivo* es un paso requerido.
- Es preciso realizar pruebas de genotoxicidad, para demostrar que el fenotipo de los fibroblastos no se ve afectado después de estar en contacto con los andamios COL-EDC.
- Es necesario, también realizar pruebas que evalúen la actividad de las células dentro de los andamios.
- Asimismo, aunque las pruebas de viabilidad celular hayan sido favorecedoras y los andamios no hayan presentado citotoxicidad, realizar pruebas *in vivo* es primordial.

# REFERENCIAS

---

- [1] R. Sripriya, R. Kumar, S. Balaji, M. Senthil Kumar, and P. K. Sehgal, “Characterizations of polyanionic collagen prepared by linking additional carboxylic groups,” *React. Funct. Polym.*, vol. 71, no. 1, pp. 62–69, 2011.
- [2] G. Krishnamoorthy, P. K. Sehgal, A. B. Mandal, and S. Sadulla, “Novel collagen scaffolds prepared by using unnatural D-amino acids assisted EDC/NHS crosslinking,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, no. June 2014, pp. 1–21, 2012.
- [3] K. Madhavan, D. Belchenko, A. Motta, and W. Tan, “Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1413–1422, 2010.
- [4] J. Hua, Z. Li, W. Xia, N. Yang, J. Gong, J. Zhang, and C. Qiao, *Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels*. Elsevier B.V., 2016.
- [5] J. Kozłowska and a. Sionkowska, “Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen–calcium phosphate composite materials,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 397–403, 2015.
- [6] S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, “Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 9, pp. 1631–1641, 2003.
- [7] Alrubaiy, “Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications,” *Oman Med. J.*, vol. 24, no. 1, pp. 6–8, 2009.
- [8] M. Furth and A. Atala, “Tissue Engineering: Future Perspectives,” in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)Tissue Engineering*, Fourth Edi., R. Lanza, R. Langer, and V. Joseph, Eds. Elsevier, 2014, pp. 83–123.
- [9] E. Foley, A. Robinson, and M. Maloney, “Skin Substitutes and Dermatology: A Review,” *Curr. Dermatol. Rep.*, vol. 2, no. 2, pp. 101–112, 2013.
- [10] Y. Garcia, R. Collighan, M. Griffin, and A. Pandit, “Assessment of cell viability in a three-dimensional enzymatically cross-linked collagen scaffold,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 10, pp. 1991–2001, 2007.
- [11] P. Angele, J. Abke, R. Kujat, H. Faltermeier, D. Schumann, M. Nerlich, B. Kinner, C. Englert, Z. Ruszczak, R. Mehrl, and R. Mueller, “Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 14, pp. 2831–2841, 2004.
- [12] R. Lundblad, *Chemical Modification of Biological Polymers*. CRC Press, 2012.
- [13] E. M. Engelhardt, L. a. Micol, S. Houis, F. M. Wurm, J. Hilborn, J. a. Hubbell, and P. Frey, “A collagen-poly(lactic acid-co-e{open}-caprolactone) hybrid scaffold for bladder tissue regeneration,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 16, pp. 3969–3976, 2011.

- [14] J. Skopinska-wisniewska, J. Kuderko, A. Bajek, M. Maj, A. Sionkowska, and M. Ziegler-borowska, "Collagen / elastin hydrogels cross-linked by squaric acid," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, no. 32, pp. 100–108, 2016.
- [15] P.A.J. Kolarsick; Kolarsick M.A.; C. Goodwin., "Anatomy and physiology of the skin," in *Site-Specific Cancer Series: Skin Cancer*, P. Muehlba., Oncology Nursing Society, 2009, p. 120.
- [16] T. I. S. Amano, T. Ezure, "Beautification of the Skin," in *Skin Bioscience: A molecular Approach*, T. Imae, Ed. Singapore: Pan Stanford, 2014, p. 228.
- [17] M. Murphy, Kennet; Travers, Paul; Walport, *Janeway Immunology*. 2009.
- [18] J. M. Richmond and J. E. Harris, "Immunology and skin in health and disease," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 4, no. 12, 2014.
- [19] D. P. Orgill and R. Gobble, *Skin Regeneration and Bioengineering*. Elsevier Inc., 2014.
- [20] K. M. P. T. M. Walport., *Inmunobiología*, 7ma ed. México: McGrawHill, 2009.
- [21] A. Haake, S. G., and H. K., "Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis," in *The biology of the skin*, R. Freinkel and D. T. Woodley, Eds. The parthenon publishing group, 2001, pp. 19–46.
- [22] J. A. Mcgrath, R. A. J. Eady, and F. M. Pope, "Anatomy and Organization of Human Skin," in *Rook's Textbook of Dermatology*, 2010, pp. 45 – 128.
- [23] R. a. Kamel, J. F. Ong, E. Eriksson, J. P. E. Junker, and E. J. Caterson, "Tissue engineering of skin," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 217, no. 3, pp. 533–555, 2013.
- [24] D. H. Chu, "Generalidades de la biología, el desarrollo y la estructura de la piel," in *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General*, 7th ed., K. Wolff, L. Goldsmith, S. Katz, B. Gilchrest, A. Paller, and D. Leffell, Eds. Editorial Médica Panameicana, 2003, pp. 57–72.
- [25] A. Peña, "Histología de la piel: dermis y anejos cutáneos. Vascularización e inervación," in *Atlas de dermatología del pie*, A. Peña, Ed. Madrid, España: Editorial Médica Panameicana, 2007, pp. 17–24.
- [26] D. L. Snyder, N. Sullivan, and K. M. Schoelles, "Skin Substitutes for Treating Chronic Wounds - Technology Assessment," 2012.
- [27] L. Yildirimer, N. T. K. Thanh, and A. M. Seifalian, "Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 12, pp. 638–648, 2012.
- [28] M. A. A. G. DUE, M. S. B. E. DUE, M. C. S. M. GERIATRA, L. G. D. DUE, A. G. E. DUE, and M. T. M. P. DUE, *Heridas crónicas: un abordaje integral*. 2012.
- [29] R. A. F. Clark, "Wound Repair: Basic Biology to Tissue Engineering," in *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*, Fourth Edi., Elsevier, 2007, pp. 1595–1617.
- [30] J. P. Sterling, D. M. Heimbach, and N. S. Gibran, "Management of the Burn Wound," *Trauma and thermal injury*, pp. 1–13, 2010.
- [31] F. Santos, F. Ojer, and M. A. Iglesias, "Quemaduras y congelaciones," in *Generalidades medicquirúrgicas*, J. Arias, M. Á. Aller, J. I. Arias, and L. Lorente, Eds. Editorial Tebar, 2002, pp. 157–172.
- [32] P. A. Gómez Morell and R. Palao i Domenech, "Tratamiento de las Quemaduras en el Siglo XXI

- desde la Cirugía Surgical,” *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, vol. 28, pp. 69–74, 2002.
- [33] F. Werdin, M. Tennenhaus, H.-E. Schaller, and H.-O. Rennekampff, “Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds,” *Eplasty*, vol. 9, p. e19, 2009.
- [34] Mölnlycke Health Care, “Incidencia de la diabetes, complicaciones y úlceras de pie,” *Úlcera de pie diabético*, 2013. [Online]. Available: <http://www.molnlycke.es/conocimiento/ulceras-pie-diabetico/diabetes-y-los-pies/>. [Accessed: 01-Jul-2016].
- [35] I. F. Montes, S. De, C. Ortiz, M. Carolina, O. Vargas, S. H. Morales, M. Florencia, and C. Ponce, “Prevalencia de úlceras por presión en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez,” *Rev. Mex. Enfermería Cardiol.*, vol. 18, pp. 13–17, 2010.
- [36] C. L. Puga Cahuich, M. A. Mijangos Pacheco, L. del C. Guillen, and I. R. Zúñiga Carrasco, “Impacto de las úlceras por presión en el ambiente hospitalario,” *Boletín epidemiológico*, vol. 32, no. 34, pp. 1–5, 2015.
- [37] J. Marinell and L. Roura, *Úlceras de la extremidad inferior*. Barcelona: Editorial Glosa, 2005.
- [38] R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, and H. Tamura, “Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 2, pp. 227–232, 2010.
- [39] J. P. Vacanti and C. a. Vacanti, *The History and Scope of Tissue Engineering*, Fourth Edi. Elsevier, 2013.
- [40] J. F. Alvarez Barreto, “Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción,” *Rev. Estud. Transdiscipl.*, vol. 1, pp. 98–109, 2009.
- [41] F. Wang, M. Wang, Z. She, K. Fan, C. Xu, B. Chu, C. Chen, S. Shi, and R. Tan, “Collagen/chitosan based two-compartment and bi-functional dermal scaffolds for skin regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 52, pp. 155–162, 2015.
- [42] G. Ramanathan, S. Singaravelu, M. . Raja, and U. T. Sivagnanam, “Synthesis of highly interconnected 3D scaffold from Arothron stellatus skin collagen for tissue engineering application,” *Micron*, vol. 78, pp. 28–32, 2015.
- [43] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, and C. Han, “Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 26, pp. 4833–4841, 2003.
- [44] N. D. Barai, S. T. Boyce, S. B. Hoath, M. O. Visscher, and G. B. Kasting, “Improved barrier function observed in cultured skin substitutes developed under anchored conditions,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 14, no. 4, pp. 418–424, 2008.
- [45] D. D. Atherton, R. Tang, I. Jones, and M. Jawad, “Early excision and application of Matriderm with simultaneous autologous skin grafting in facial burns,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 125, p. 60e–61e, 2010.
- [46] P. Batheja, Y. Song, P. Wertz, and B. Michniak-Kohn, “Effects of growth conditions on the barrier properties of a human skin equivalent,” *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 1689–1700, 2009.
- [47] T. V. F. Vázquez, A. Vázquez, S. Fournier, “Estudios histológicos y bioquímicos de la piel

- envejecida,” in *El envejecimiento de la piel y las mucosas*, Primera Ed., Catelo-Branco Camil, Ed. Argentina; Madrid: Editorial Médica Panameicana, 2010, p. 136.
- [48] M. D. Shoulders and R. T. Raines, “Collagen Structure and Stability,” *Annu Rev Biochem*, pp. 929–958, 2010.
- [49] J. A. M. Ramshaw, Y. Y. Peng, V. Glattauer, and J. a. Werkmeister, “Collagens as biomaterials,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. SUPPL. 1, 2009.
- [50] R. Raghov, “Connective tissues of the subendothelium,” in *Vascular medicine: a companion to Braunwald’s heart disease*, M. Creager, B. J., and L. J., Eds. Philadelphia: Elsevier, 2013, pp. 43–69.
- [51] R. O. Hynes, A. Naba, P. Lu, K. Takai, V. M. Weaver, R. O. Hynes, A. Naba, A. Huttenlocher, A. R. Horwitz, J. C. Adams, J. Lawler, J. S. Munger, and D. Sheppard, “Overview of the Matrisome — An Inventory of,” 2014.
- [52] A. Garrido Pertierra, J. M. Tejón Rivera, D. Blanco Gaitán, C. Villaverde Gutiérrez, C. Mendoza Oltras, and J. Ramírez Rodrigo, *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid: Editorial Tébar, 2006.
- [53] D. Birk and P. Brückner, “Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly,” in *The Extracellular Matrix: an Overview*, R. Mecham, Ed. Springer, 2011, pp. 77–118.
- [54] T. Koide and K. Nagata, “Collagen Biosynthesis,” in *Collagen. Primer in Structure, Processing and Assembly*, J. Brinckmann, H. Nontbohm, and P. K. Müller, Eds. Springer, 2005, pp. 85–114.
- [55] “Crush Biochem 3,” *StudyBlue. Wright State University School of Medicine*. [Online]. Available: <HTTPS://www.studyblue.com/NOTES/NOTE/N/CRUSH-BIOCHEM-3/DECK/14767094>. [Accessed: 01-Mar-2016].
- [56] R. F. Loeser, “Conective tissue structure and function,” in *Goldman’s Cecil Medicine*, 24th ed., L. Goldman and A. Schafer, Eds. New York: Elsevier, 2012, pp. 123–128.
- [57] P. Campbell, A. Smith, and T. Peters, *Bioquímica Ilustrada. Bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*, 5th ed. Elsevier, 2006.
- [58] L. Cen, W. E. I. Liu, L. E. I. Cui, W. Zhang, Y. Cao, R. S. W. L, S. People, and S. J. Tong, “Collagen Tissue Engineering : Development of Novel Biomaterials,” vol. 63, no. 5, pp. 492–496, 2008.
- [59] A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, and A. Planecka, “Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 4, pp. 570–577, 2010.
- [60] W. Friess, “Collagen--biomaterial for drug delivery.,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 45, no. 2, pp. 113–136, 1998.
- [61] M. Meyer, H. Baltzer, and K. Schwikal, “Collagen fi bres by thermoplastic and wet spinning,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 8, pp. 1266–1271, 2010.
- [62] F. Albericio, P. Lloyd-Williams, and E. Giralt, “Métodos de síntesis peptídica,” in *Péptidos en biología y biomedicina*, 1a Edición., D. Andreu and L. Rivas, Eds. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1997, p. 529.
- [63] M. Ogawa, R. J. Portier, M. W. Moody, J. Bell, M. A. Schexnayder, and J. N. Losso, “Biochemical

properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*),” *Food Chem.*, vol. 88, no. 4, pp. 495–501, 2004.

- [64] Thermo Scientific, “EDC Instructions,” vol. 0747, no. 22980, pp. 1–3, 2011.
- [65] Del Prado Audelo M.L., “Extracción y caracterización de colágena tipo I a partir de diferentes tejido biológicos,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [66] J. F. Woessner, “The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 93, pp. 440–447, 1961.
- [67] M. L. Colgrave, P. G. Allingham, and A. Jones, “Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1212, no. 1–2, pp. 150–153, 2008.
- [68] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.,” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [69] N. Davidenko, C. F. Schuster, D. V. Bax, N. Raynal, R. W. Farndale, S. M. Best, and R. E. Cameron, “Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics,” *Acta Biomater.*, vol. 25, pp. 131–142, 2015.
- [70] D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, and E. Chiellini, “Polymeric materials for bone and cartilage repair,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 403–440, 2010.
- [71] E. Khor, “Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses,” *Biomaterials*, vol. 18, no. 2, pp. 95–105, 1997.
- [72] B. Pierce, “AlamarBlue Cell Viability Assay Reagent Thermo Scientific,” 2012.
- [73] M. M. Nociari, A. Shalev, P. Benias, and C. Russo, “A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity,” *J. Immunol. Methods*, vol. 213, no. 2, pp. 157–167, 1998.
- [74] S. Benjakul, Y. Thiansilakul, W. Visessanguan, S. Roytrakul, H. Kishimura, T. Prodpran, and J. Meesane, “Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*),” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, no. 1, pp. 132–138, 2010.
- [75] C. M. L. da Silva, E. Spinelli, and S. V. Rodrigues, “Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay,” *Food Chem.*, vol. 173, pp. 619–623, 2015.
- [76] P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, and M. Tanaka, “Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*),” *Food Chem.*, vol. 89, no. 3, pp. 363–372, 2005.
- [77] A. Martínez, M. D. Blanco, N. Davidenko, and R. E. Cameron, “Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 606–619, 2015.
- [78] J. Skopinska-Wisniewska, a. Sionkowska, a. Kaminska, a. Kaznica, R. Jachimiak, and T. Drewa, “Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration,” *Appl. Surf.*

- Sci.*, vol. 255, pp. 8286–8292, 2009.
- [79] P. Velmurugan, R. R. Jonnalagadda, and B. U. Nair, “Biochemical and biophysical characterization of EDC treated rattus type i collagen,” *Process Biochem.*, vol. 48, no. 7, pp. 1059–1064, 2013.
- [80] G. Krishnamoorthy, R. Selvakumar, T. Parvathaleswara, S. Sadulla, A. Baran, and M. Doble, “Experimental and theoretical studies on Gallic acid assisted EDC / NHS initiated crosslinked collagen scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 164–171, 2014.
- [81] L. Chen, Z. Xiao, Y. Meng, Y. Zhao, J. Han, G. Su, B. Chen, and J. Dai, “The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1437–1444, 2012.
- [82] T. Zhou, N. Wang, Y. Xue, T. Ding, X. Liu, X. Mo, and J. Sun, “Development of Biomimetic Tilapia Collagen Nanofibers for Skin Regeneration through Inducing Keratinocytes Differentiation and Collagen Synthesis of Dermal Fibroblasts,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 5, pp. 3253–3262, 2015.
- [83] R. L. Switzer and L. Garrity, *Experimental Biochemistry*, Third. Freeman, W. H. & Company, 1999.
- [84] B. Lomonte, “Electroforesis en Gel de Poliacrilamida,” in *Manual de Métodos Inmunológicos*, Universidad de Costa Rica, 2007, p. 138.
- [85] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, vol. 8. 2004.
- [86] University of Helsinki, “Homepage of the Molecular Biophysics Group.” .
- [87] H. Mantsch, “Historical Survey of Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials,” in *Infrared and Raman Spectroscopy in Biological Materials*, H.-U. Gremlich and B. Yan, Eds. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001, pp. 1–15.
- [88] J. Bandekar, “Amide modes and protein conformation,” *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1120, no. 2, pp. 123–143, 1992.
- [89] H. Staroszczyk, K. Sztuka, J. Wolska, A. Wojtasz-Pająk, and I. Kołodziejska, “Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 117, pp. 707–712, 2014.
- [90] C. Spink, “Differential Scanning Calorimetry,” *Methods Cell Biol.*, vol. 84, pp. 115–141, 2008.
- [91] K. Lukas and P. LeMaire, “Differential scanning calorimetry: Fundamental overview,” *Resonance*, vol. 14, no. 8, pp. 807–817, 2009.
- [92] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, “Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience.,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 21, no. 4, pp. 167–93, 2010.
- [93] “Netzsch, productos y soluciones,” *DSC 214 Polyma*. .
- [94] M. Cueto, J. M. Dorta, O. Munguía, and M. Llabrés, “New approach to stability assessment of protein solution formulations by differential scanning calorimetry,” *Int. J. Pharm.*, vol. 252, no. 1–2, pp. 159–166, 2003.

TÉCNICAS DE  
CARACTERIZACIÓN

## Electroforesis

El término electroforesis se relaciona con cualquier técnica experimental que se base en la migración de moléculas cargadas en un campo eléctrico dentro de un medio líquido [83]. Cuando cualquier partícula, cargada eléctricamente, disuelta en una solución acuosa es sometida a un campo eléctrico constante, comenzará a migrar hacia el electrodo de carga opuesta. La velocidad de migración de las partículas será directamente proporcional al voltaje aplicado y a la carga de la partícula, pero inversamente proporcional al tamaño de la partícula. De esta manera, moléculas que difieran en tamaño y/o carga, pueden ser separadas una de la otra bajo este concepto. El análisis electroforético, en principio, puede ser utilizado con cualquier partícula que, bajo condiciones experimentales, se encuentre cargada; por ejemplo, cationes o aniones pequeños, ácidos orgánicos, péptidos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Sin embargo, en la práctica, las proteínas y ácidos nucleicos son, por mucho, los más utilizados en la separación electroforética.

En la electroforesis en gel, las moléculas están separadas en tampones acuosos compatibles dentro de una matriz de gel polimérico. Muchos agentes de tipo gel se utilizan en electroforética sistemas. Geles de agarosa han demostrado ser eficientes, sobre todo cuando se aplica a muy grandes macromoléculas tales como nucleico ácidos, lipoproteínas, entre otros [83].

Otro agente utilizado es la poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos [84].

La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la Acrilamida y la bis-Acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la Tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el Persulfato de Amonio. El radical Persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bis-Acrilamida, formándose así

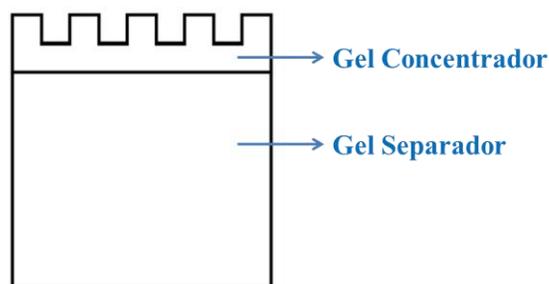
una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "*polyacrylamide gel electrophoresis*"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

Esta técnica nos permite estimar el PM de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de peso molecular conocido. La determinación del PM de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM. Si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol (u otro reductor como el ditioneitol), los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales. La movilidad electroforética relativa ( $R_f$ ) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. El  $R_f$  se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario) [84].

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH,

que primero compactan las muestras (en el gel superior o concentrados) y luego las separan (en el gel inferior o separador) (Figura A.1).



**Figura A. 1** Partes de un gel de SDS-PAGE. Compuesto por dos geles de distinta porosidad, que cumplen con funciones distintas. Imagen modificada de [84].

En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, por ejemplo 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10.000-90.000 daltons.

El protocolo más ampliamente utilizado en este tipo de electroforesis es el de Laemmli [68], mismo que se utilizó en este trabajo (*Sección 2.1.1*).

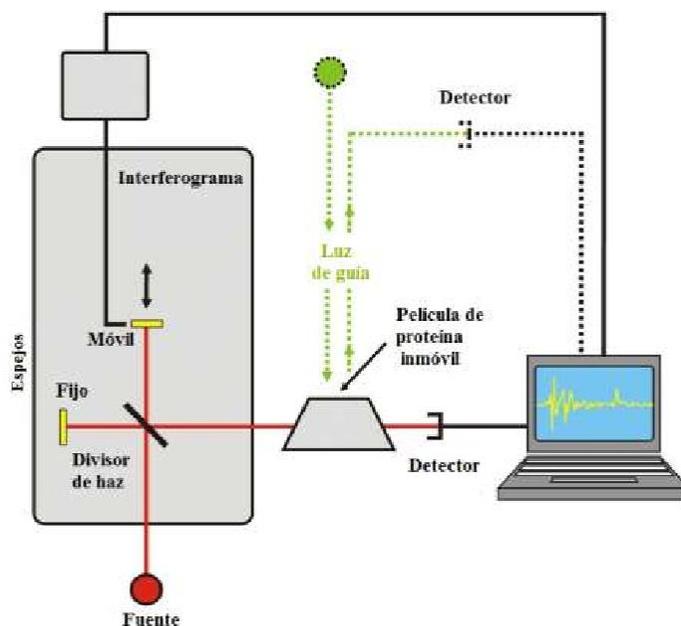
## Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas analíticas más útiles en el campo de las proteínas. Una de las mayores ventajas de IR es que prácticamente cualquier muestra en prácticamente cualquier estado puede ser estudiada. La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo es comúnmente obtenido mediante el paso de radiación infrarroja a través de una muestra para así determinar qué fracción de la radiación incidida es absorbida a una energía en particular [85].

Tradicionalmente, instrumentos dispersivos eran usados para obtener espectros de infrarrojo. En la actualidad, los espectrómetros infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) son los más utilizados y serán descritos brevemente, a continuación.

### *FT-IR*

Su nombre proviene del hecho de que a la señal que llega al detector de estos espectrómetros se le efectúa un proceso matemático llamado Transformación de Fourier. Su funcionamiento es el siguiente: un haz colimado, proveniente de una fuente que emite en toda la región infrarroja, incide sobre un divisor de haz. El haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de los cuales incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo. Los haces son reflejados por ambos espejos y se recombinan al llegar al divisor de haz. Esto da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la posición relativa del espejo móvil con respecto del espejo fijo. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede una absorción selectiva de longitudes de onda y, finalmente, llega al detector (Figura A.2).



**Figura A. 2** Esquema de un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Imagen modificada de [86].

De la mediada del instrumento se obtiene un *espectro*. La mayoría de los instrumentos comerciales presentan un espectro con un número de onda decreciente de izquierda a derecha.

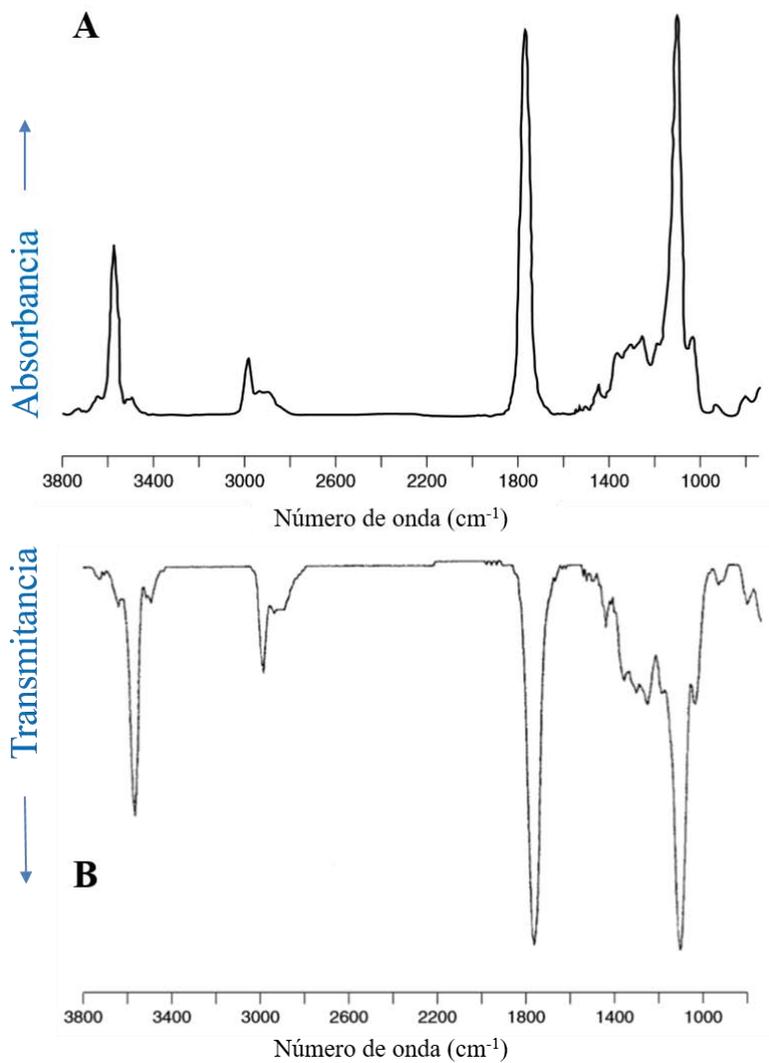
El espectro infrarrojo se puede dividir en tres regiones principales: el Infrarrojo Lejano ( $<400\text{ cm}^{-1}$ ), el infrarrojo medio ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) e infrarrojo cercano ( $13000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ). En general, la región del espectro infrarrojo más estudiada es la región media, aunque las otras dos regiones también pueden dar información importante, dependiendo de la naturaleza del material. El eje de las ordenadas (Y) se puede representar como el porcentaje de la transmitancia, colocando el 100% en la parte superior del espectro. Sin embargo, también es adecuado presentar la absorbancia como medida de intensidad de las bandas obtenidas (Figura A.3) [85]. Esto se basa en la preferencia de personal, ya que ambas maneras de presentar los espectros son correctas, aunque la transmitancia es la más utilizada para la interpretación de espectros.

### ***Aplicaciones biológicas (proteínas)***

Sistemas biológicos, como por ejemplo lípidos, proteínas péptidos, biomembranas, tejidos animales, entre otros; han sido estudiados satisfactoriamente mediante espectroscopia infrarroja [87].

Los espectros de infrarrojo de las proteínas presentan bandas de absorción asociados con su grupo amida característica. Los modos vibracionales dentro del plano se deben al estiramiento del enlace C=O, al estiramiento de C-N y de N-H, y a la flexión del enlace O-C-N, mientras que un modo de fuera de plano se debe a la torsión del enlace C-N. Las bandas características de los grupos amida en las cadenas proteicas son similares a las bandas de absorción exhibidas por amidas secundarias en general, y están etiquetados como Bandas de Amida. Hay nueve bandas de este tipo, llamadas amida A, B y amidas amida I-VII, en orden decreciente en función del número de onda [88, 89].

La espectroscopia infrarroja se ha utilizado en un gran número de estudios de proteínas y las asignaciones espectrales se basan en el hecho de que las estructuras secundarias de estas proteínas han sido caracterizadas a profundidad mediante otras técnicas (como cristalografía de rayos X). Los números de onda característicos de las estructuras secundarias de las proteínas también se han estimado a partir de cálculos, en coordenadas normales, en modelos peptídicos y en proteínas de estructura conocida [85].



**Figura A. 3** Espectro de absorbancia del Ácido Láctico (A). Espectro de transmitancia del Ácido Láctico (B). Imagen modificada de [85].

## Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante o cuando es calentada o enfriada a una velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. La CDB es una técnica importante en el campo de la Ciencia de Materiales debido a su elevado grado de sensibilidad y a su rápida velocidad de análisis. Asimismo, la CDB ha emergido como una técnica muy poderosa para determinar las propiedades termodinámicas de biomacromoléculas.

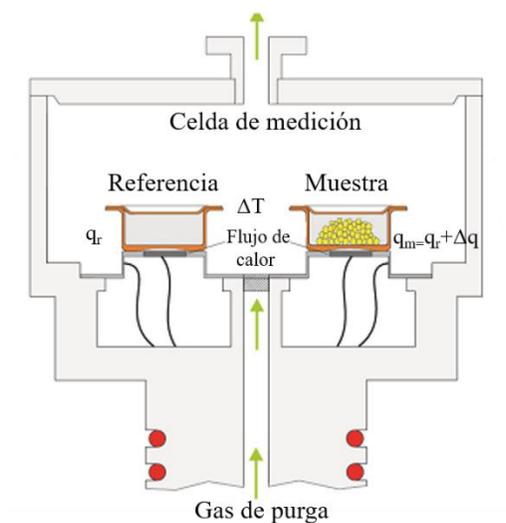
La capacidad de monitorear el desdoblamiento o las fases de transición de proteínas, polinucleótidos y lípidos, no sólo proporciona datos sobre la estabilidad termodinámica de estas moléculas, sino que también ha hecho posible examinar detalles de los procesos de desdoblamiento así como analizar las características de los estados intermedios involucrados en la fusión de los biopolímeros [90].

El uso de la calorimetría diferencial de barrido permite medir la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura, obteniéndose así, lo que comúnmente se denomina termograma. A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, determinar los parámetros termodinámicos asociados con la transición inducida por la temperatura: cambios de entalpía ( $\Delta H$ ), de entropía ( $\Delta S$ ), de energía de Gibbs ( $\Delta G$ ) y de capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ), así como, la temperatura de transición térmica (que puede considerarse la temperatura de fusión).

La CDB se utiliza comúnmente para el estudio de reacciones bioquímicas, las cuales se refieren a la transición molecular de una conformación a otra que puede presentar una molécula.

En un experimento básico de CDB, en una celda se coloca la muestra a analizar, mientras que la otra celda se queda vacía o se coloca un material de referencia. Entonces, durante el calentamiento de la muestra, se mide el flujo de calor manteniendo un equilibrio térmico

entre la referencia y la muestra. La referencia y la muestra se calientan, a una velocidad determinada, hasta que la muestra empieza a consumir o emitir calor (durante un proceso endotérmico o exotérmico, respectivamente). Si se trata de un proceso endotérmico, la temperatura de la muestra será menor que la de la referencia [91, 92].



**Figura A. 4** Montaje de un experimento de Calorimetría Diferencial de Barrido. Imagen modificada de [93].

### ***Aplicaciones biológicas (proteínas)***

Es bien sabido que la formación de estructuras únicas de macromoléculas biológicas, como proteínas y sus complejos específicos, es un proceso reversible y que, dichas reacciones, son controladas termodinámicamente. Debido a esto, llevar a cabo investigaciones sobre la termodinámica de estos procesos es de vital importancia. Para lograr este objetivo, se requieren mediciones directas de los efectos del calentamiento sobre los procesos intra- e intermoleculares de las macromoléculas; técnicas calorimétricas muy sensibles, como la CDB, son utilizadas para estas mediciones. La CDB es una de las técnicas más utilizadas para determinar la estabilidad de las proteínas y para medir parámetros del desdoblamiento de las mismas [92, 94]. En los estudios de CDB, la temperatura en el punto máximo representa la estabilidad de la proteína.

ARTÍCULO  
DE INVESTIGACIÓN

# Development of collagen-EDC scaffolds for skin tissue engineering: physicochemical and biological characterization

María Luisa Del Prado Audelo<sup>1</sup>, Karla Karina Gómez Lizárraga<sup>2</sup>, David Mauricio Giraldo Gómez<sup>3</sup>, Héctor Martínez Hernández<sup>4</sup>, Nayeli Rodríguez Fuentes<sup>5</sup>, Andrés Eliú Castell Rodríguez<sup>6</sup>, Edgar B. Montufar<sup>7</sup>, María Cristina Piña Barba<sup>8</sup>

<sup>1-5,8</sup>Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, Del. Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., México.

<sup>6</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, Del. Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., México.

<sup>7</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology (CEITEC-BUT), Brno, Czech Republic.

**Abstract**—A leading consequence of burns is the loss of large extensions of skin. Thus, skin tissue engineering has been increased and promoted development of biomimetic skin scaffolds. Type I collagen is one of the most materials used in tissue engineering due to its biological characteristics. However, the applications of collagen as biomaterial are severely limited by its reduced physicochemical and mechanical properties, such as high susceptibility to enzymatic degradation *in vivo* and low thermo stability. To enhance collagen properties, crosslinked collagen scaffolds at different concentrations of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) were prepared by freeze-drying technique. The effect of crosslinking and concentration on scaffolds physicochemical and biological behavior was evaluated. Scaffolds morphology was observed by Scanning Electron Microscopy, showing in all cases an appropriate microstructure for biological applications. Differential Scanning Calorimetric showed an increase in shrinkage temperature (TS) with increase in EDC concentration. Infrared Spectroscopy suggested that the secondary structure of collagen is not affected after the crosslinking. Enzymatic degradation test indicated that scaffolds treated with EDC dissolved slowly in enzymatic solution (just 12% of degradation after 96 h). Cell viability and attachment tests suggested that EDC treatment do not affect the excellent biological characteristics of collagen.

**Keywords**— collagen, crosslinking, enzymatic degradation, freeze-drying, skin.

## I. INTRODUCTION

Skin is the largest organ of the body and it is composed of epidermis, dermis, and hypodermis layers, together with a complex nerve and blood supply systems [1], [2]. Loss of large part of skin, related to illness or injury, would not only affect the appearance of the patient, but also can lead to infection and even causing death. Thus, the necessity of skin substitutes for wound healing has increased skin tissue engineering research and promoted development of biomimetic skin scaffolds that help to regenerate large points of damaged skin [3], [4].

Collagen has been widely used to fabricate scaffolds due to its high biocompatibility, low antigenic response and because it naturally contains cell adhesion motives that improve cell-scaffold interactions [5]–[8]. Type I collagen is the most common type of collagen and it is the major protein of all connective tissue, such as bone, tendon, cartilage and skin [9]–[12]. Despite the huge efforts and developments, the uses of collagen for tissue engineering applications is currently limited by its high susceptibility to enzymatic degradation and low thermo stability *in vivo* [13]–[15]. For the development of new skin tissue engineering therapies, the enhancement of thermal, mechanical and enzymatic stability of collagen is needed. The crosslinking is the most used method collagen properties [8], [16], [17].

Glutaraldehyde has been extensively used as crosslinker, but it is associated with cytotoxicity effects, reduced cellular ingrowth *in vitro* and *in vivo* [13], [17], [18]. The search of “green” crosslinkers that avoid denaturation protein and can be easily removed after the crosslinking is the topic of current research in the field. Among potential alternatives, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) has demonstrated to be a mild [8], [19] and water-soluble crosslinker. EDC induce the formation of covalent amine bonds thought carboxyl and amino groups of collagen [8], [19], [20]. Usha *et.al.* [19] reported the physicochemical behavior of collagen crosslinked with EDC (10 mM). However, they do not report the biological performance of the scaffolds obtained. In contrast, Krishnamoorthy *et.al.* [21] report physicochemical and biological behavior of collagen crosslinked with EDC, but they use only one EDC concentration (40

mM). EDC is considered as a zero length crosslinker. Nevertheless, some authors have questioned about the cytotoxicity of EDC and the facility of the technique [22]. Thus, comprehensive study, about physicochemical and biological properties, of collagen crosslinked scaffolds with different concentrations of EDC is needed to assess the modification of collagen structure and its effects on cell viability.

The objective of this study was to access the effects of several EDC concentrations, if any, on the physicochemical and biological properties *in vitro* of collagen scaffolds for skin tissue engineering. The scaffolds were prepared by freeze-drying technique, crosslinked with different concentrations of EDC and characterized in terms of morphology, thermal stability, molecular structure, enzymatic degradation and cell attachment, viability and proliferation.

## II. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Extraction of type I collagen

Type I collagen was isolated from fresh bovine Achilles tendon by acetic acid extraction and pepsin digestion method. Briefly, the minced tendons were suspended in 0.5 M acetic acid solution during 48 h, the viscous collagenous material was separated from the insoluble components by sieving and digested with pepsin (1g pepsin/ 100 g tendon) at 4°C during 12 h. Trypsin digestion was halted by 0.2 M sodium phosphate dialysis. The dialyzed collagen was centrifuged at 12000 g for 40 min to get rid of insoluble impurities. The supernatant was precipitated by NaCl (5 w/v %) and the precipitated was re-dissolved in 0.5 M acetic acid. Then, the solution was dialyzed with 4 mM potassium phosphate buffer to repeat the same process to achieve the protein purification. Finally, collagen was re-dissolved in 0.5 M acetic acid and the collagen solution was stored at 4°C. The purity of the collagen extracted was confirmed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE was performed following the method of Laemmli [23] using discontinuous Tris/HCl/Glycine buffer system.

### 2.2 Fabrication and crosslinking of collagen scaffolds

Freeze-drying technique was used for fabrication of the collagen scaffolds. Briefly, the collagen solution (5 mg/ml) was dropped onto silicon molds (diameter: 30 mm, depth: 10 mm) and frozen at -20 °C for 24 h. After that, the frozen collagen was lyophilized at -40 °C and 0.05 mBar for 18 h. For crosslinking the lyophilized scaffolds were immersed in 5 ml of EDC-ethanol solutions with different concentrations of EDC (0, 35mM, 45mM and 55mM) during 24 h at 4 °C. The crosslinked scaffolds were washed three times with distilled water during 10 minutes using a sonicator (Branson) at room temperature. The scaffolds were freeze-dried again applying the same conditions derived above. Non-crosslinked scaffold (0 mM EDC) was named COL and was prepared as a control to could compare the changes in the protein after the crosslinking. Changes in the protein structure after EDC crosslinking were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR Nicolet 6700) from 4000 cm<sup>-1</sup> to 400 cm<sup>-1</sup>.

The ultrastructure of the scaffolds was observed by field emission scanning electron microscope (JEOL JSM-7600F). The crosslinked collagen scaffolds were cut along its diameter and the cross-section was coated with a thin layer of gold (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100) to prevent charging during observation. Pore size was determinate image analysis (AxioVision 4.0). The percentage of porosity was obtained applying equation 1.

$$\text{Porosity (\%)} = (1 - \rho^*/\rho) \times 100 \quad (1)$$

Where  $\rho^*$  is the apparent density of the scaffold determined by the ratio between the dry mass of the scaffold and its external volume, and  $\rho$  is the theoretical density of collagen (1.3 g/ml [24]).

### 2.3 Swelling test

To determinate the absorption of water, the scaffolds were immersed in sealed tubes containing PBS and incubated at 37°C during 60 min. Afterwards, the scaffolds were removed, gently dry with filter paper to remove the excess of PBS, and the percentage of water uptake was calculated using equation 2:

$$\text{Water uptake (\%)} = \frac{W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}}{W_{\text{dry}}} \times 100 \quad (2)$$

Where  $W_{dry}$  is the weight of the sample and  $W_{wet}$  is the weight of the sample after immersion in PBS. The test was performed in triplicate.

#### 2.4 Thermal stability of collagen-EDC scaffolds

The thermal stability of the EDC crosslinked collagen scaffolds was measured through differential scanning calorimetry (DSC 2910 Modulated TA Instruments). The thermograms were obtained by heating the samples from 0 to 120 °C with a heating rate of 5 °C/min.

#### 2.5 Enzymatic Degradation

Enzymatic degradation of collagen-EDC scaffolds was performed using collagenase digestion. Scaffolds were cut into disks (superficial area), and were immersed in 2 ml of Tris-HCl buffer solution (pH 7.4) containing 5 U/ml of collagenase type I (*Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich) at 37 °C. The solution was renewed every 8 h. Scaffold samples were removed after 12, 24, 48, 72 and 96 h of immersion, rinsed with distilled water and lyophilized. The percentage of enzymatic degradation was calculated according to equation 3. All samples were tested in triplicate.

$$\text{Mass loss (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (3)$$

Where,  $W_i$  is the weight of the scaffold before collagenase digestion and  $W_f$  is the weight of the scaffold after degradation.

#### 2.6 Cell culture of human dermal fibroblasts

Primary human dermal fibroblasts were obtained from voluntary donors of the Faculty of Medicine, UNAM, following protocols reviewed and approved by Ethics committee of Faculty. The cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM; GibcoBRL), supplemented with 2 mM glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) maintaining the culture environment at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Prior cell seeding, scaffold disks (diameter: 6 mm, depth: 2 mm) were placed in tubes with PBS 1% penicillin/streptomycin overnight, sterilized by UV treatment for 1 hour (30 minutes each side) and pre-moistened in MEM during 24 h. Fibroblasts were seeded in the scaffolds using 96 well cell culture plates at a density of 1500 cells/well. After 24 h cell viability was evaluated using AlamarBlue reagent (Invitrogen) following the instructions of the producer [25]. Briefly, the culture medium was discarded and fresh medium with 10% of AlamarBlue was added. The color turnover was quantified by measuring the optic absorbance of 100µl of supernatant in a BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer at 570 nm and 600 nm. The first measure was obtained immediately after the AB was added (time 0), the next measurements were performed at different times (6 h, 12 h, 1, 2, 4, 5, 6 and 8 days). The morphology of the fibroblasts attached to the scaffolds was evaluated after 3 h, 24 h and 7 days of proliferation. Scaffolds were rinsed three times with Na-cacodylate buffer, fixed in 4% glutaraldehyde solution, dehydrated in ethanol series and prepared for SEM observation applying a thin layer of gold to prevent charging.

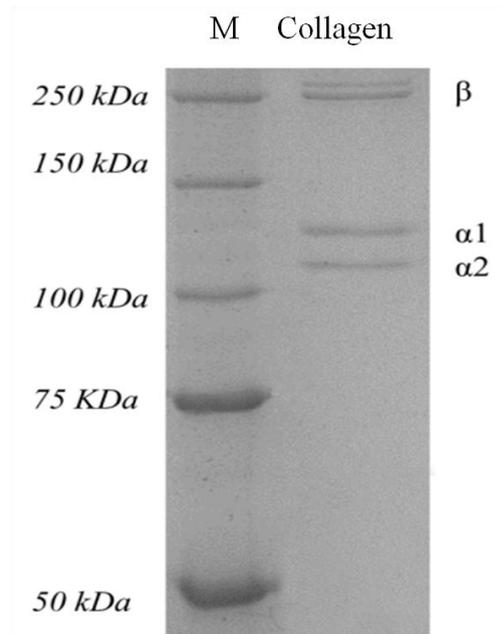
#### 2.7 Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA to determinate statistical significance between groups,  $p$ -values <0.05 were considered as significant.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Purity of type I collagen extracted from Achilles bovine tendon

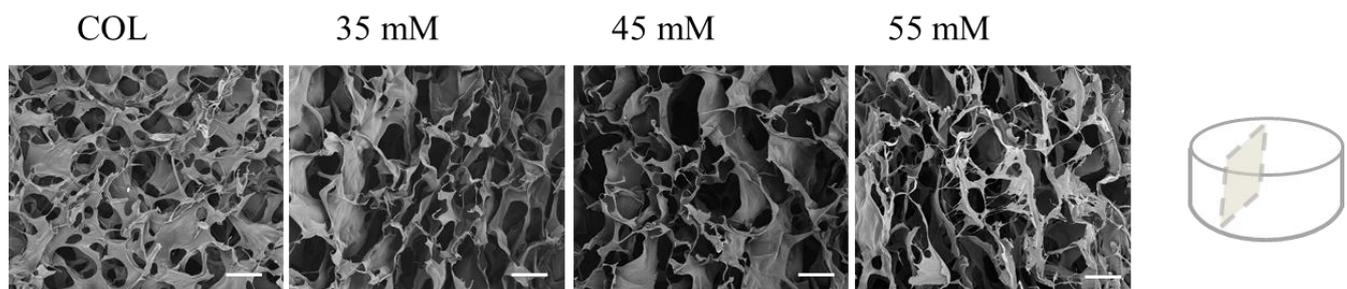
Figure 1 shows a representative electrophoresis pattern of extracted collagen. The pattern of collagen shows two well differentiated bands at 130 and 140 kDa, corresponding to  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  [26] chains, respectively. Besides, in agreement with Phanat Kittiphattanabawon *et. al.* [27], the pattern shown a high molecular weight band (250 kDa) related with  $\beta$  components, which is considered a dimer of the  $\alpha$  chains. The structure of type I collagen is formed by two  $\alpha 1$  chains and one  $\alpha 2$  chain ( $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ ) [28]. These results suggested that the collagen isolated had the typical type I collagen structure and do not show any detectable degradation products.



**FIGURE 1. SDS-PAGE PATTERN OF M: PRECISION PLUS PROTEIN UNSTAINED STANDARDS BIO-RAD AND TYPE I COLLAGEN FROM *BOVINE ACHILLES TENDON*.**

### 3.2 Collagen-EDC scaffolds characterization

SEM images of longitudinal cross sections of collagen-EDC scaffolds show highly porous structure in all samples (Fig.2). The scaffolds have a continuous network of open porous. Porosity was estimated around 99% for all scaffolds without significant differences between them (table 1). Furthermore, the pore size estimated from SEM images was similar for all scaffolds (table 1). Therefore, the structure of the scaffolds was not significantly affected by EDC crosslinking. Similar results were obtained by Davidenko *et.al.* [29]. The minimum pore size found was about 21  $\mu\text{m}$  while the biggest one was 566  $\mu\text{m}$ . Therefore, the pore size was within a range suitable for growth of cells, such as, fibroblasts, myocytes and endothelial cells [24], [29]. Accordingly, the morphology of all scaffolds can be considered as appropriate for their use in skin tissue engineering applications [30].



**FIGURE 2. REPRESENTATIVE SEM IMAGES OF LONGITUDINAL CROSS SECTIONS OF COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS (SCALE BAR OF 100  $\mu\text{m}$ ).**

The results of PBS absorption are shown in Table 1. In general, crosslinked scaffolds show higher swelling ability than uncrosslinked scaffold (COL) which shows a PBS uptake about 2000%. This result is in accordance with the work of Martinez *et.al.*[24] and Skopinska-Winsniewska *et.al.* [22] who found, for native collagen, uptakes around 2000% and 2200%, respectively. The maximum PBS absorption was observed on 55 mM collagen-EDC scaffold. These properties of absorption are favorable for wound healing application.

**TABLE 1**  
**POROSITY AND PORE SIZE OF COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS**

Sample	Density (g/ml)	Relative density	Porosity (%)	Pore size ( $\mu\text{m}$ )	PBS uptake (%)
COL	9.5 E-6 $\pm$ 0.12 E-6	7.31 E-6 $\pm$ 0.09 E-6	99 $\pm$ 9.81E-6	115 $\pm$ 54	2050 $\pm$ 13.6
35mM	9.94 E-6 $\pm$ 0.26E-6	7.65 E-6 $\pm$ 0.2 E-6	99 $\pm$ 2.01E-5	110 $\pm$ 50	2764 $\pm$ 5.8
45mM	1.40 E-5 $\pm$ 0.02 E-5	1.08 E-5 $\pm$ 0.02 E-5	99 $\pm$ 2.121E-5	121 $\pm$ 72	8620 $\pm$ 3.7
55mM	1.28 E-5 $\pm$ 0.01E-5	9.89 E-6 $\pm$ 0.11 E-6	99 $\pm$ 1.106-5	108 $\pm$ 51	12656 $\pm$ 1.6

*\*Mean  $\pm$  SD*

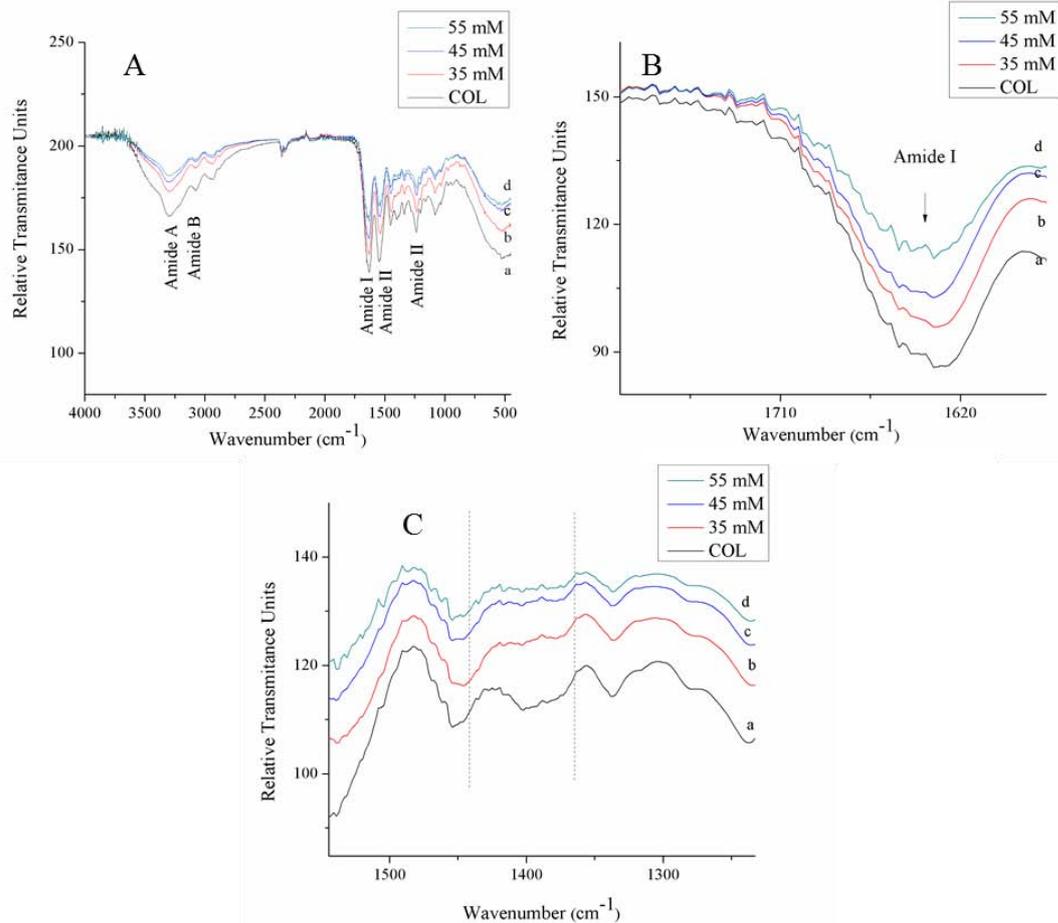
The influence of the EDC on swelling properties of scaffolds could be due to variances in hydrophilicity caused by reduction in lateral groups and the presence of new chemical bonds [31].

The FT-IR spectra for collagen-EDC scaffolds are shown in Fig. 3. In the uncrosslinked collagen spectrum (COL), the four typical collagen bands can be observed. Amide A band at 3300  $\text{cm}^{-1}$  it is commonly associated with the N-H and O-H stretching vibrations ( $\nu_{\text{NH}}$  and  $\nu_{\text{OH}}$ ) [32], [33]; Amide B was found at 3077  $\text{cm}^{-1}$ . The Amide I band represents 80% of the stretching vibrations of the peptide carbonyl group ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) with some C-N stretching (10%) and N-H bending (10%), it is found at 1633  $\text{cm}^{-1}$  [34], [35]. Amide II band at 1538  $\text{cm}^{-1}$  and corresponds to N-H deformation vibrations ( $\delta_{\text{NH}}$ ) and C-N stretching ( $\nu_{\text{CN}}$ ) [33]. After EDC crosslinking, the wavenumber of collagen bands are almost the same as non-crosslinked samples (table 2). This may suggest that the secondary structure of collagen was not affected [36]. However, the intensity of bands varies with the EDC concentration.

**TABLE 2**  
**BAND POSITION ( $\text{cm}^{-1}$ ) IN THE FT-IR SPECTRA OF COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS**

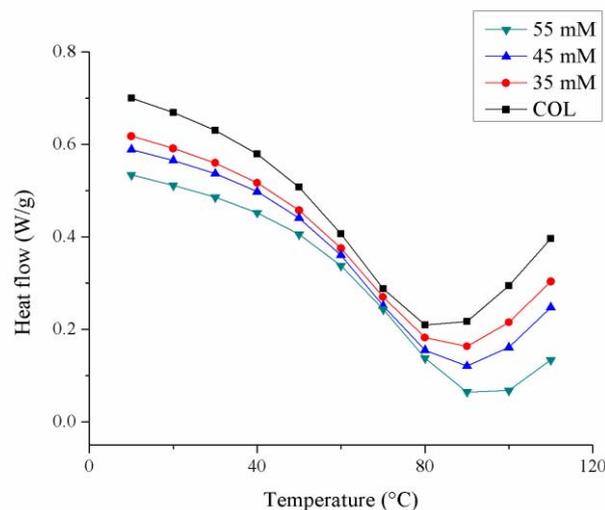
Sample	Amide A	Amide B	Amide I	Amide II	Amide III
COL	3300	3077	1633	1538	1237
35	3204	3078	1631	1538	1234
45	3300	3078	1633	1538	1235
55	3292	3077	1633	1538	1235
<b>Band assignment</b>	$\nu_{\text{NH}}, \nu_{\text{OH}}$	$\nu_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{C=O}}, \nu_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{CN}}, \delta_{\text{NH}}$	$\nu_{\text{CN}}, \delta_{\text{NH}}$

The Amide I band, which is the most useful infrared band for the analysis of the secondary structure of proteins, presented decrease on its intensity (Fig. 3B). This due to the formation of new covalent bonds because crosslinking. In addition, the characteristic carboxyl stretching, observed between 1440 and 1390  $\text{cm}^{-1}$  [35] appear in COL spectrum (Fig. 3C), but decrease (almost disappear) in crosslinked-EDC scaffolds. This indicates that several carboxyl groups take part in crosslinking reaction. Although that no significant increment in the N-H bound was observed (Amide A band), the decrement of Amide I intensities suggest a more covalent crosslinked structure and weakened carboxyl group related to formation of new bonds. Moreover, this result is in agreement with the higher thermal stability of the crosslinked samples. Therefore, the stabilization effect of EDC on collagen could spread its applications in tissue engineering.



**FIGURE 3. FT-IR SPECTRA OF COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS. ALL SPECTRA SHOW TYPICAL COLLAGEN BANDS (A). THE INTENSITY OF AMIDE I BAND DECREASED AS CONCENTRATION OF EDC INCREASED (B). THE CARBONYL BAND DECREASED AS CROSSLINKING TAKE PLACE (C). COL LINE (a), 35 mM line (b), 45 mM line (c), 55 mM line (d).**

DSC thermogram of collagen-EDC scaffolds crosslinked showed slight differences in shrinkage temperature ( $T_S$ ) with increase in EDC concentration (Fig. 4).  $T_S$  was the highest for 55 mM (95°C), followed by 45 mM and 35 mM (both with 90°C), and finally by COL with 80 °C.  $T_S$  is considered as the temperature at which collagen denaturation begins, due to the rupture of interchain bonds causing the collagen shrinks [37], [38]. Consequently, this temperature has been defined as a measure of the structural stability of collagen [39].



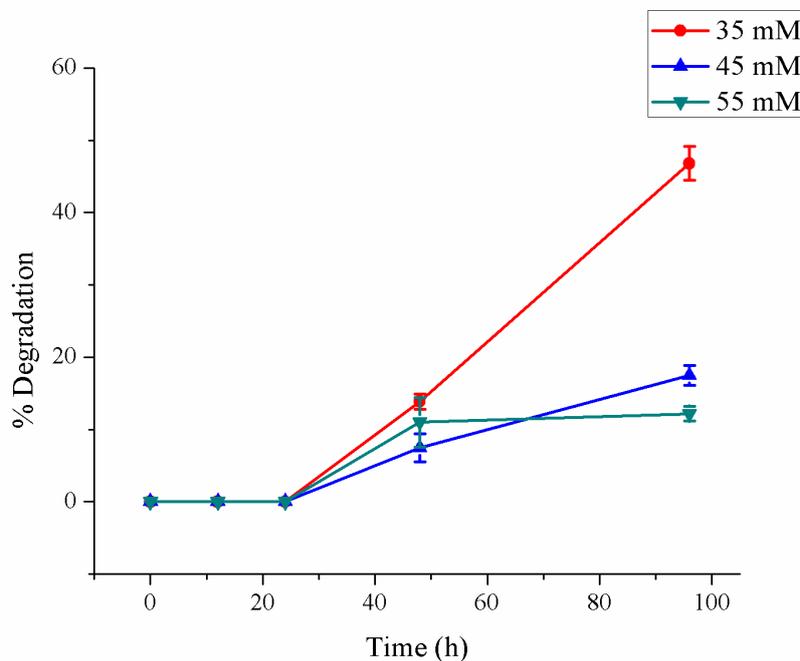
**FIGURE 4. DSC THERMOGRAM OF COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS.**

For comparison, Krishnamoorthy et. al. [40] reported that collagen crosslinked with gallic acid obtained a value of  $T_s$  of 80 °C, this means that EDC gives a better thermal stability.

Due to the stabilization of triple helix in collagen structure by crosslinking, break these additional crosslinks requires more energy during heating. Then, it could be expected that collagen treated with EDC provides scaffolds with increased stability preventing the denaturation at low temperatures.

### 3.3 Enzymatic Degradation

Collagen is one of the most used materials in tissue engineering due to its excellent biocompatibility and weak antigenicity. However, native collagen presents a high enzymatic degradation rate, reducing its possible clinical applications [40], [41]. Enzymatic degradation of crosslinked collagen scaffolds was studied by monitoring the residual weight percent after different times of incubation with type I collagenase Tris-HCl buffer. Fig. 5 shows the weight loss (%) as a function of time. COL presented the lowest resistance to enzymatic degradation, dissolving it in just two hours after test started (result not shown). In contrast, scaffolds treated with EDC dissolved slowly in collagenase solution, presenting mainly 12, 17 and 46% of degradation after 96 hours respectively for 55, 45 and 35 mM collagen-EDC scaffolds.



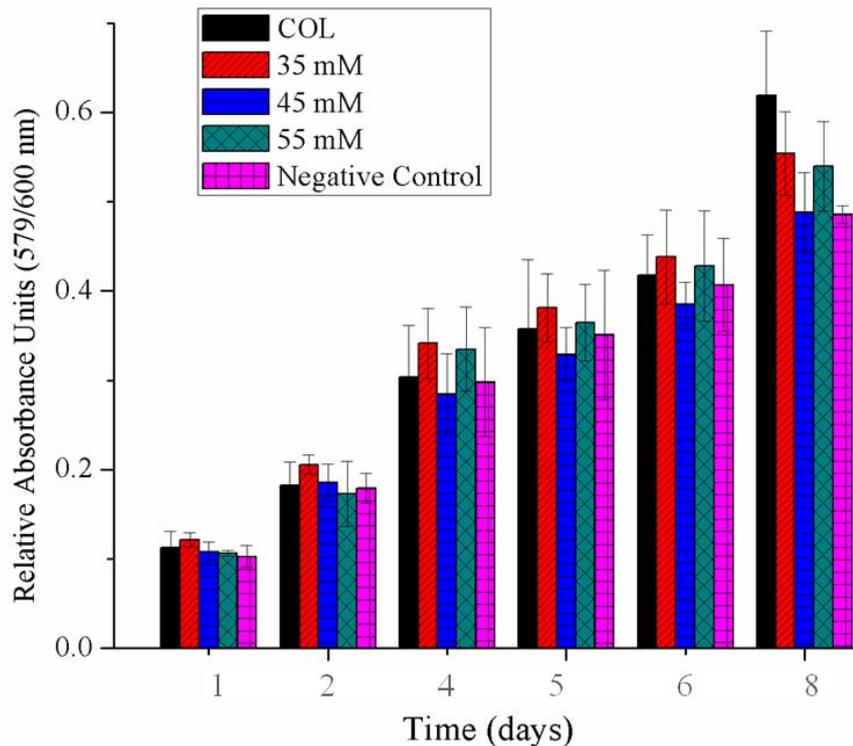
**FIGURE 5. MASS LOSS (%) IN PRESENCE OF COLLAGENASE IN TRIS-HCL AT 37°C FOR COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS.**

Recently, different kind of crosslinkers has been used to decrease degradation rate of collagen. Skopinska-Wisniewska [42], used squaric acid as crosslinker. About 17% of the highest crosslinked scaffold was degraded by collagenase within 1 h. Other authors [40], used gallic acid as crosslinker on collagen scaffolds, and it was observed that, at 96 h on contact with collagenase solution, the scaffold with highest content of crosslinker presented 16% of degradation. Therefore, enhance the structural stability of collagen scaffolds with additional crosslinks by EDC crosslinking is a better and effective method to prevent the cleavage by collagenase and improve the characteristics of collagen as biomaterial.

### 3.4 Cell culture test

It is well accepted that cells be seeded and proliferated successfully in collagen scaffolds [43], [44]. Formaldehyde and Glutaraldehyde has been commonly used as crosslinkers. However, this kind of agents has been associated with cytotoxicity effect. Meyer et.al. [45] report the cytotoxicity effects in scaffolds crosslinked with Formaldehyde and 0.1% Glutaraldehyde. In both, it presented a highly cytotoxicity. As mentioned above, EDC is a zero-length crosslinker, which means that the crosslinker will not part of the final product. Therefore, the use of EDC should present not cytotoxic results. However, it is

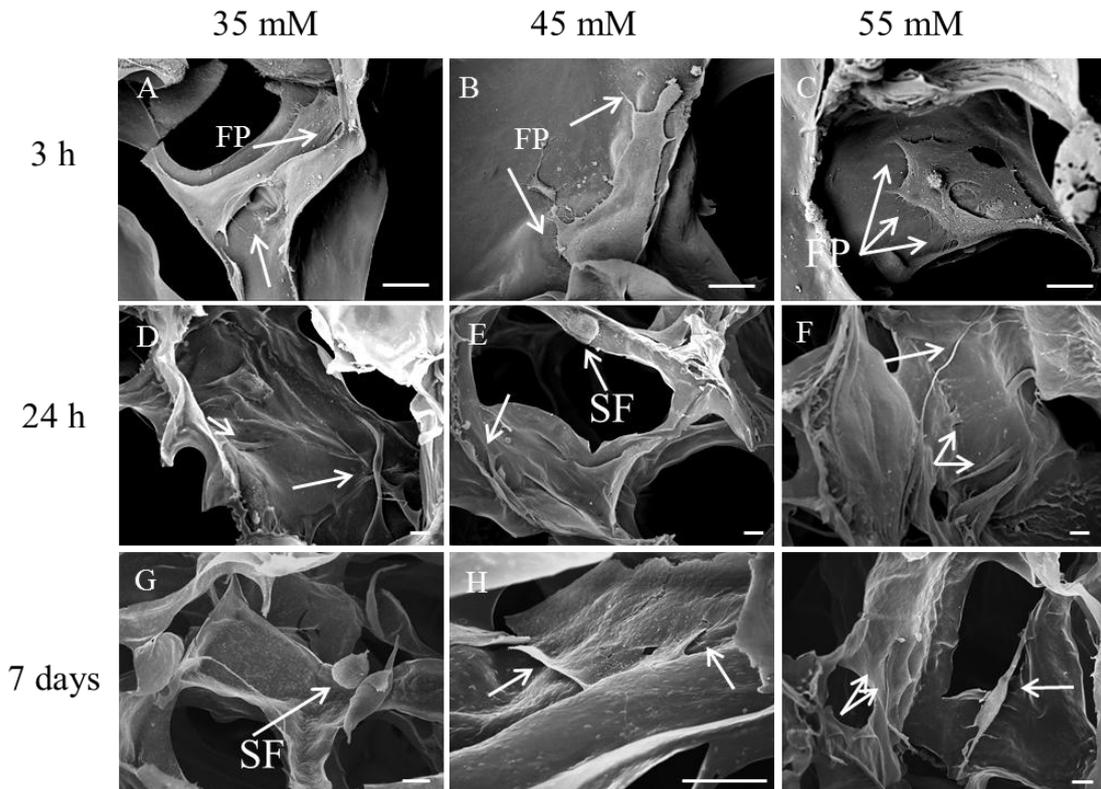
important to evaluate if EDC crosslinking method affects the cytocompatibility of the scaffolds, this is usually done by viability and proliferation assays. The viability and proliferation of human dermal fibroblasts in presence of crosslinked collagen scaffolds were evaluated for 8 days of incubation using AB reagent. Results shown in Fig. 6 demonstrated that EDC treatment is not cytotoxic, showing equivalent cell viability than the non-crosslinked scaffold and no significant difference between the samples and the negative control. The negative control (cells with AlamarBlue medium, but without the presence of the scaffolds), show the lower cell population. These results suggest that the collagen of the scaffolds keep its excellent biological characteristics after the crosslinking method.



**FIGURE 6. EFFECT OF COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS. CELL VIABILITY AND PROLIFERATION WAS EVALUATED BY ALAMARBLUE REDUCTION ALONG DURING 8 DAYS OF INCUBATION. THERE IS NO SIGNIFICANCE DIFFERENCE BETWEEN GROUPS (N=5)**

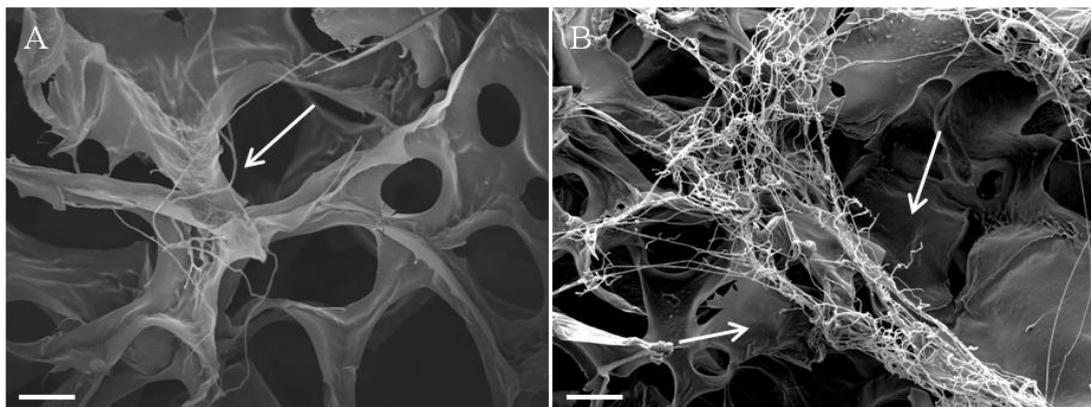
The morphology of fibroblasts cultured on collagen-EDC a scaffold was examined by SEM. Images were collected at different times of culture (3h, 24h and 7 days). However, fibroblasts morphology on COL scaffolds was not observed due to low stability of the sample, which generates scaffold degradation and collapse. It is worth to mention that collagen presents good biological properties but, as commented above, has very low stability under biological conditions, being remarkable important to find methods that improve mechanical performance, such as EDC crosslinking. In fact, EDC crosslinked scaffolds, presented structural stability along the cell culture test, allowing imaging of the cells.

The cells within the collagen-EDC scaffolds showed spread morphology and cells colonize the three-dimensional structure of the scaffolds (Fig. 7). After 3 h of seeding, the cells showed the typical elongated morphology of fibroblasts in contact with the crosslinked scaffolds. Furthermore, cells presented cytoplasmatic extensions, through filipodia (FL), to link with the matrix; this result suggests that fibroblasts present a high affinity with crosslinked scaffolds.



**FIGURE 7. REPRESENTATIVE SEM IMAGES SHOWING THE MORPHOLOGY OF THE FIBROBLASTS CULTURED ON COLLAGEN-EDC SCAFFOLDS. AT 3 H OF SEEDING (A-C). AT 24 H OF SEEDING (D-F). AT 7 DAYS OF SEEDING (G-I). SCALE BAR 10  $\mu$ M.**

After 24 h of culture, cell density was increased. Cells cover almost all the sample surfaces presenting several attachment points with the scaffold. Furthermore, at 24 h, in some regions of scaffolds 35 and 55 mM it was possible to observe the synthesis of fibrous matrix (Fig. 8). These results corroborate that after crosslinking EDC the scaffolds are still biocompatible. Nonetheless, no significant effect on EDC concentration on cell attachment was found under the described experimental conditions. Fibroblast growing behavior and proliferation were analyzing after 7 days of culture. The formation of a thin cell layer was observed; these results demonstrated a good cell interaction with the surface of the collagen-EDC scaffolds. Cells in spheroidal form (SF) were also identified, this means that fibroblasts continued to proliferate after 7 days. Due to fibroblasts, the main cell type in dermis, showed high affinity to the collagen-EDC scaffolds, these are potential biomaterials for skin tissue engineering, specially the scaffold crosslinked at 55 mM of EDC, because it presented the higher thermal and enzymatic stability.



**FIGURE 8. SEM MICROGRAPHS OF SYNTHESIS OF FIBROUS MATRIX IN A) 35 mM SCAFFOLD (SCALE BAR 20  $\mu$ M) AND B) 55 mM SCAFFOLD (SCALE BAR 40  $\mu$ M). ARROWS INDICATE THE PRESENCE OF MATRIX.**

#### IV. CONCLUSION

Type I collagen scaffolds were successfully stabilized by crosslinking treatment with EDC. The results of the physicochemical characterization of the crosslinked scaffolds indicate that EDC treatment has not significantly altered the porous morphology of scaffolds, but improve the structural stability and thermal properties, necessary behavior in materials for tissue engineering applications. Scaffolds showed the same proliferation profile and before and after crosslinking treatment, besides the cells showed affinity for the crosslinked scaffolds. All these results suggest that this study could be useful for development a collagen-based biomaterial for tissue engineering applications having suitable physicochemical properties and reduced antigenicity, even with high EDC concentrations. The findings of this study are limited to the *in vitro* behavior. Furthermore, they are a starting point and the *in vivo* performance should be evaluated.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to Miguel Ángel Canseco, Armando Zepeda Rodríguez, Francisco Pasos Nájera and Josué Esaú Romero Ibarra for their technical assistance. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Materials Science and Engineering at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Del Prado-Audelo M.L. acknowledges the scholarship provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 346323). This study was supported by DGAPA-UNAM through the project: PAPIIT- IG100114 and CONACyT through the project: 214128. EBM acknowledged the project CEITEC 2020 (LQ1601) with financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the National Sustainability Programme II.

#### REFERENCES

- [1] F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer, and K. Schenke-Layland, "Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 4, pp. 352–366, 2011.
- [2] L. Cen, W. E. I. Liu, L. E. I. Cui, W. Zhang, Y. Cao, R. S. W. L. S. People, and S. J. Tong, "Collagen Tissue Engineering : Development of Novel Biomaterials," vol. 63, no. 5, pp. 492–496, 2008.
- [3] L. Yildirimer, N. T. K. Thanh, and A. M. Seifalian, "Skin regeneration scaffolds: A multimodal bottom-up approach," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 12, pp. 638–648, 2012.
- [4] F. Wang, M. Wang, Z. She, K. Fan, C. Xu, B. Chu, C. Chen, S. Shi, and R. Tan, "Collagen/chitosan based two-compartment and bi-functional dermal scaffolds for skin regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 52, pp. 155–162, 2015.
- [5] H. Tan, B. Wu, C. Li, C. Mu, H. Li, and W. Lin, "Collagen cryogel cross-linked by naturally derived dialdehyde carboxymethyl cellulose," *Carbohydr. Polym.*, vol. 129, pp. 17–24, 2015.
- [6] A. L. S. Padmanabhan, L. Salvatore, F. Gervaso, M. Catalano, A. Taurino, A. Sannino, "Synthesis and Characterization of Collagen Scaffolds Reinforced by Eggshell Derived Hydroxyapatite for Tissue Engineering - ResearchGate.pdf." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, United States of America, pp. 1–6, 2014.
- [7] M. H. Santos, R. M. Silva, V. C. Dumont, J. S. Neves, H. S. Mansur, and L. G. D. Heneine, "Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 2, pp. 790–800, 2013.
- [8] G. Krishnamoorthy, P. K. Sehgal, A. B. Mandal, and S. Sadulla, "Novel collagen scaffolds prepared by using unnatural D-amino acids assisted EDC/NHS crosslinking," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, no. June 2014, pp. 1–21, 2012.
- [9] J. A. M. Ramshaw, Y. Y. Peng, V. Glattauer, and J. a. Werkmeister, "Collagens as biomaterials," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. SUPPL. 1, 2009.
- [10] K. Matmaroh, S. Benjakul, T. Prodpran, A. B. Encarnacion, and H. Kishimura, "Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*)," *Food Chem.*, vol. 129, no. 3, pp. 1179–1186, 2011.
- [11] D. Liu, X. Zhang, T. Li, H. Yang, H. Zhang, J. M. Regenstien, and P. Zhou, "Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)," *Food Biosci.*, vol. 9, pp. 68–74, 2015.
- [12] M. Ogawa, R. J. Portier, M. W. Moody, J. Bell, M. A. Schexnayder, and J. N. Losso, "Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*)," *Food Chem.*, vol. 88, no. 4, pp. 495–501, 2004.
- [13] J. E. Gough, C. A. Scotchford, and S. Downes, "Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen / poly ( vinyl alcohol ) films is by the mechanism of apoptosis," 2001.
- [14] C. Ding, M. Zhang, and G. Li, "Preparation and characterization of collagen / hydroxypropyl methylcellulose ( HPMC ) blend film," *Carbohydr. Polym.*, vol. 119, pp. 194–201, 2015.
- [15] J. Kozłowska and a. Sionkowska, "Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen–calcium phosphate composite materials," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 397–403, 2015.
- [16] K. Madhavan, D. Belchenko, A. Motta, and W. Tan, "Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1413–1422, 2010.

- [17] H. M. Powell and S. T. Boyce, "EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability," *Biomaterials*, vol. 27, no. 34, pp. 5821–5827, 2006.
- [18] A. Cooke, R. F. Oliver, and M. Edward, "An in vitro cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen.," *Br. J. Exp. Pathol.*, vol. 64, no. 2, pp. 172–176, 1983.
- [19] R. Usha, K. J. Sreeram, and a. Rajaram, "Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of l-lysine: A comprehensive study," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 90, no. 1, pp. 83–90, 2012.
- [20] S. A. Madison and J. O. Carnali, "PH optimization of amidation via carbodiimides," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 38, pp. 13547–13555, 2013.
- [21] G. Krishnamoorthy, R. Selvakumar, T. P. Sastry, A. B. Mandal, and M. Doble, "Effect of d-amino acids on collagen fibrillar assembly and stability: Experimental and modelling studies," *Biochem. Eng. J.*, vol. 75, pp. 92–100, 2013.
- [22] J. Skopinska-wisniewska, K. Olszewski, A. Bajek, A. Rynkiewicz, and A. Sionkowska, "Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 40, pp. 65–70, 2014.
- [23] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [24] A. Martínez, M. D. Blanco, N. Davidenko, and R. E. Cameron, "Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 606–619, 2015.
- [25] B. Pierce, "AlamarBlue Cell Viability Assay Reagent Thermo Scientific," 2012.
- [26] S. Benjakul, Y. Thiansilakul, W. Visessanguan, S. Roytrakul, H. Kishimura, T. Prodpran, and J. Meesane, "Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*)," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, no. 1, pp. 132–138, 2010.
- [27] P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, and M. Tanaka, "Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)," *Food Chem.*, vol. 89, no. 3, pp. 363–372, 2005.
- [28] M. H. Uriarte-Montoya, J. L. Arias-Moscoso, M. Plascencia-Jatomea, H. Santacruz-Ortega, O. Rouzaud-Sáñez, J. L. Cardenas-Lopez, E. Marquez-Rios, and J. M. Ezquerro-Brauer, "Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 11, pp. 4212–4219, 2010.
- [29] N. Davidenko, C. F. Schuster, D. V. Bax, N. Raynal, R. W. Farndale, S. M. Best, and R. E. Cameron, "Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics," *Acta Biomater.*, vol. 25, pp. 131–142, 2015.
- [30] L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, and C. Han, "Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 26, pp. 4833–4841, 2003.
- [31] P. Velmurugan, R. R. Jonnalagadda, and B. U. Nair, "Biochemical and biophysical characterization of EDC treated rattus type i collagen," *Process Biochem.*, vol. 48, no. 7, pp. 1059–1064, 2013.
- [32] A. Barth, "Infrared spectroscopy of proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1767, no. 9, pp. 1073–1101, 2007.
- [33] H. Staroszczyk, K. Sztuka, J. Wolska, A. Wojtasz-Pająk, and I. Kołodziejska, "Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 117, pp. 707–712, 2014.
- [34] B. D. C. Vidal and M. L. S. Mello, "Collagen type I amide I band infrared spectroscopy.," *Micron*, vol. 42, no. 3, pp. 283–9, 2011.
- [35] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, vol. 8. 2004.
- [36] A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, and A. Planecka, "Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 4, pp. 570–577, 2010.
- [37] A. J. Kuijpers, G. H. M. Engbers, J. Krijgsveld, S. a. J. Zaat, J. Dankert, and J. Feijen, "Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 11, no. 3, pp. 225–243, 2000.
- [38] K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida, "Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 20, pp. 3153–62, 2007.
- [39] T. C. H. H. C. W. Stringer, "The shrinkage temperature of skin collagen," *Aust. J. Dermatol.*, vol. 5, no. 4, pp. 230–234, 1960.
- [40] G. Krishnamoorthy, R. Selvakumar, T. Parvathaleswara, S. Sadulla, A. Baran, and M. Doble, "Experimental and theoretical studies on Gallic acid assisted EDC / NHS initiated crosslinked collagen scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 164–171, 2014.
- [41] L. Sang, D. Luo, S. Xu, X. Wang, and X. Li, "Fabrication and evaluation of biomimetic scaffolds by using collagen – alginate fibrillar gels for potential tissue engineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 2, pp. 262–271, 2011.
- [42] J. Skopinska-wisniewska, J. Kuderko, A. Bajek, M. Maj, A. Sionkowska, and M. Ziegler-borowska, "Collagen / elastin hydrogels cross-linked by squaric acid," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, no. 32, pp. 100–108, 2016.
- [43] L. Chen, Z. Xiao, Y. Meng, Y. Zhao, J. Han, G. Su, B. Chen, and J. Dai, "The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1437–1444, 2012.
- [44] T. Zhou, N. Wang, Y. Xue, T. Ding, X. Liu, X. Mo, and J. Sun, "Development of Biomimetic Tilapia Collagen Nanofibers for Skin Regeneration through Inducing Keratinocytes Differentiation and Collagen Synthesis of Dermal Fibroblasts," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 5, pp. 3253–3262, 2015.
- [45] M. Meyer, H. Baltzer, and K. Schwikal, "Collagen fibres by thermoplastic and wet spinning," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 8, pp. 1266–1271, 2010.