



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE FIBROBLASTOS  
HUMANOS CULTIVADOS EN UN HIDROGEL DE FIBRINA,  
ALGINATO Y AGAROSA CONSTRUIDO MEDIANTE INGENIERÍA DE  
TEJIDOS

TESIS  
QUE PARA OTORGAR EL TÍTULO DE:  
INGENIERA QUÍMICA  
PRESENTA:  
RAMÍREZ BRAVO VANESSA MONSERRAT

DIRECTOR: M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA ENRÍQUEZ  
ASESORA: M. EN I. MA. ESTELA DE LA TORRE GÓMEZ TAGLE  
ASESORA: DRA. ANA LILIA MALDONADO ARELLANO

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

24-11-2023





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.

## Dedicatoria

---

*A mis padres María y Rodolfo, a mis hermanos Jessy y Rodó con todo mi amor y satisfacción les dedico uno de mis logros más importantes porque su amor y apoyo incondicional fueron motivo para no rendirme. Así también agradezco a mis abuelitos (Rodó, Soco y Luz) y mis tíos en especial a mi tía Bella, Esther y mi tía Soco por el apoyo y la ayuda que me brindaron durante el tiempo que cursé mi carrera.*

*Les dedico este logro a todos mis familiares, amigos y profesores que estuvieron apoyándome y fueron parte de esta trayectoria profesional. Muchas gracias.*

## Agradecimientos

---

*Agradezco primeramente a Dios por darme vida, salud y la oportunidad de poder concluir este proyecto; agradezco profundamente al Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina, por supuesto al Dr. Andrés Castell Rodríguez por brindarme la oportunidad de trabajar con él y abrirme las puertas del laboratorio, por permitirme conocer su lado profesional y sobre todo el gran ser humano y amigo que es, lo admiro demasiado doctor. A mis asesores los doctores Miguel Herrera, Katya Jarquín y Judith Álvarez por darme las herramientas y ayudarme con el desarrollo de mi proyecto de investigación; por guiarme en la elaboración de mis experimentos y darme las bases para realizar mi proyecto. A todo el equipo del laboratorio a Bety y Judith por ayudarme con las técnicas histológicas y las inmunohistoquímicas, a la Dra. Gaby, la señora María Elena y a todos mis compañeros del laboratorio; gracias por hacer de esta una muy grata experiencia y hacer mi estancia en el laboratorio muy amena; gracias por las risas, los consejos y sus enseñanzas, a todos los llevo en mi corazón.*

*También agradezco a Armando Zepeda y Francisco por ayudarme en el procesamiento de mis muestras para poder tomar las fotos en el Microscopio Electrónico de Barrido al departamento de Biología Celular e histología médica de la Facultad de Medicina UNAM por permitirme utilizar los equipos de trabajo.*

*Agradezco a la Universidad, esta gran casa de estudios por tantas oportunidades que me ha brindado; en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y todos los maestros que fueron pieza clave para mi formación profesional y que sirvieron de guía e inspiración para concluir esta etapa profesional, así como a todos aquellos amigos y compañeros que estuvieron conmigo durante mi carrera universitaria.*

*Gracias, mamá, papá y hermanos por no soltarme y apoyarme infinitamente a lo largo de mi vida. Gracias a toda mi familia, amigos y personas especiales porque con su aporte, consejos y acompañamiento me ayudaron a concluir de manera satisfactoria este proyecto de vida.*

# Contenido

---

Dedicatoria .....	1
Agradecimientos.....	2
Resumen .....	5
Introducción.....	6
Capítulo I. Marco Teórico .....	8
1.1 Histología de la Piel .....	8
1.1.1. Epidermis.....	8
1.1.2. Dermis.....	10
1.2 Fibroblastos y Matriz Extracelular Dérmica.....	12
1.2.1. Matriz Extracelular Dérmica .....	12
1.2.2. Fibroblastos.....	13
1.3 Funciones principales de la piel.....	15
1.4 Heridas cutáneas y su clasificación .....	17
1.4.1 Problemas y estadísticas de la atención de heridas en México .....	20
1.5 Apósitos en el tratamiento de heridas crónicas .....	21
1.6 Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos.....	24
1.7 Biomateriales y Andamios en Ingeniería de Tejidos. ....	25
1.7.1. Fibrina .....	29
1.7.2. Alginato .....	31
1.7.3. Agarosa.....	33
1.8 Hidrogeles.....	34
Capítulo II. Antecedentes .....	36
Capítulo III. Contexto general de la investigación .....	42
3.1 Planteamiento del problema .....	42
3.2 Hipótesis .....	42
3.3 Objetivos.....	42
3.3.1 Objetivo general .....	42
3.3.2 Objetivos específicos.....	42
3.4 Diseño experimental .....	43
3.5 Materiales y métodos .....	45

3.5.1. Toma de biopsia y cultivo de fibroblastos.....	45
.....	46
3.5.2. Suspensión celular .....	46
3.5.3. Construcción del andamio dérmico .....	47
3.5.4. Procesamiento de las muestras para histología.....	48
3.5.5. Procesamiento de las muestras para citotoxicidad/viabilidad, vida/muerte. ....	48
3.5.6. Procesamiento de las muestras para DAPI.....	48
3.5.7. Procesamiento de las muestras para procolágena 1. ....	49
3.5.8. Procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica de Barrido .....	50
3.6 Universo.....	50
3.7 Variables.....	50
3.8 Análisis estadístico .....	51
Capítulo IV Resultados.....	52
Capítulo V Discusión y Conclusiones.....	61
Bibliografía .....	65

## Resumen

---

En el presente proyecto de investigación realizado en el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina UNAM; se presenta el desarrollo y la evaluación de un andamio dérmico a base de fibrina, adicionado con diferentes concentraciones de alginato y agarosa respectivamente y sembrado con fibroblastos dérmicos humanos. Al adicionar estos biomateriales, se garantiza una adecuada biocompatibilidad es decir que los biomateriales empleados no interaccionen de manera destructiva con el sistema biológico (no tóxico), que el biomaterial permita la proliferación del componente celular, que sea resistente para desarrollar correctamente su función en el individuo receptor, así como un adecuado manejo quirúrgico y biodegradarse en el tiempo que les tome a las células reparar o regenerar el nuevo tejido.

Entre los materiales seleccionados para la elaboración del andamio dérmico se emplea alginato, agarosa y fibrina debido a que estudios posteriores han comprobado que estos polímeros naturales representan una buena alternativa como base en el desarrollo y diseño de sustitutos dérmicos. Este tipo de biomateriales se caracteriza por poseer propiedades físicas y químicas que se asemejan al tejido nativo; como es el caso de la fibrina, la cual al reactivar la cascada de coagulación se genera una red de fibrillas que podrían ser aprovechadas para el crecimiento celular de queratinocitos y fibroblastos, células presentes en la epidermis y la dermis respectivamente. En tanto que el alginato da resistencia y conserva la actividad biológica que favorece la adhesión y proliferación celular; y la agarosa, nos va a permitir que se forme un hidrogel.

Para el cultivo celular *In vitro* se toma una biopsia de piel de un individuo sano, se procesa la muestra separando la epidermis de la dermis para obtener los fibroblastos los cuales se implantan en el andamio elaborado con fibrina, alginato y agarosa para posteriormente aplicar las siguientes técnicas: 1) Marcaje fluorescente con calceína y homodímero de etidio (Kit Vida y muerte) para determinar la viabilidad celular; 2) Evaluación de la síntesis de elementos de matriz extracelular mediante inmunohistoquímica dirigida contra procolágena tipo I; 3) Evaluación histológica en cortes de parafina con las tinciones H&E y Tricrómico de Masson y 4) Morfología del andamio, mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

## Introducción

---

Los andamios dérmicos constituyen una alternativa novedosa, eficaz y factible para el tratamiento de múltiples heridas consideradas como problemas de salud pública. Países desarrollados cuentan con equivalentes cutáneos, comercialmente disponibles y usados en el tratamiento de lesiones de la piel; sin embargo, en países en vías de desarrollo, como México, ha sido limitado su uso por razones como falta de representación directa o indirecta de los laboratorios que los producen, dificultad para el transporte e importación de los equivalentes, altos costos, falta de cobertura en los sistemas asistenciales, entre otros, ante lo cual los profesionales de la salud no incluyen rutinariamente estos tratamientos para los pacientes (Malagón Romero, 2014).

Gracias a la Ingeniería de tejidos se han podido crear este tipo de andamios ya que esta ciencia multidisciplinaria que combina el conocimiento y la tecnología del cultivo celular, principios y métodos de la ingeniería en materiales, biorreactores, biología, medicina y factores de crecimiento bioquímicos se ha podido reparar o regenerar órganos y tejidos dañados. Uno de los tejidos que presenta una alta demanda en el país es la piel, por lo cual ha sido ampliamente investigado en el mundo, por su aplicabilidad y las implicaciones que tiene dentro de los indicadores de salud pública, ya que la falta de piel afecta considerablemente la calidad de vida de las personas. La pérdida de piel es debida principalmente a heridas traumáticas, quemaduras y úlceras (venosas, arteriales, diabéticas, infecciosas, inflamatorias, de presión y tumorales) (Malagón Romero, 2014). Ante esta problemática se cree necesaria la creación de un andamio dérmico que sea accesible para la población y reduzca los costos por hospitalizaciones en México ya que un estudio realizado por la Secretaría de Salud en 159 unidades médicas en México obtuvo un total de 36,022 casos de heridas, donde las heridas más recurrentes fueron las heridas traumáticas y las úlceras de pie diabético; los costos directos mensuales para el tratamiento de estas lesiones fueron estimados en \$46 563 070.76 (ambulatorio) y \$1 864 124 436.89 (hospitalización) (Vela Anaya, et al 2018).

El desarrollo de un equivalente dérmico conlleva procedimientos *in vitro* e implica el crecimiento de fibroblastos sobre materiales biocompatibles, que garanticen y promuevan la proliferación celular y faciliten la formación de la matriz extracelular. Muchos materiales poliméricos, tanto naturales como sintéticos se han evaluado a lo largo de los últimos años con excelentes resultados en sus aplicaciones en pacientes.

Los biomateriales se utilizan ampliamente para la creación de andamios dérmicos ya que, por lo general, estos apósitos son biodegradables, biocompatibles y no tóxicos para la piel; además, presentan buenas propiedades de manipulación de fluidos que fomentan la curación de las heridas en un ambiente húmedo y controlado. Los andamios preparados con biomateriales son elaborados principalmente de polisacáridos, proteínas y lípidos. Los

polisacáridos poliméricos son los componentes más importantes de estos sistemas debido a sus características de liberación de fármacos y permeabilidad, así como a sus propiedades mecánicas, químicas y biológicas, las cuales dependen de la formulación de cada material (Valencia Gómez, et al 2016).

Algunos de los biomateriales más estudiados para la creación de equivalentes dérmicos han sido el alginato y la agarosa ya que numerosos estudios demuestran que estos polisacáridos poliméricos permiten crear hidrogeles que tienen la capacidad de atraer y retener grandes cantidades de agua lo que permite mantener un ambiente húmedo en el lecho de las heridas; tiene propiedades mecánicamente estables, presentan actividad inmunoestimulante y facilitan la formación de una matriz inerte y no tóxica. Por otro lado los derivados sanguíneos se presentan como el biomaterial biológico idóneo para formar parte de la composición de un andamio dérmico por su facilidad de obtención y la posibilidad de obtener equivalentes autólogos. En condiciones fisiológicas, la reparación tisular de un tejido dañado se inicia con la formación de una compleja red proteica a base de fibrina en la zona afectada. Los sustitutos de fibrina se caracterizan por promover la proliferación y la adhesión celular y facilitar la correcta distribución de las células en la estructura tridimensional (Fernández González, et al 2016).

# Capítulo I. Marco Teórico

## 1.1 Histología de la Piel

El sistema tegumentario compuesto por la piel, y los distintos tipos de anexos cutáneos (folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y uñas) (ver fig.1), conforma la cubierta que reviste toda la superficie externa de nuestro cuerpo, dentro de este sistema la piel es el órgano más grande y pesado del cuerpo, ya que constituye del 15 al 20% de su masa total; la piel está compuesta por dos capas principales, la epidermis y la dermis (Ross & Pawlina, 2012). Estas dos capas forman una estructura compacta y resistente que descansa sobre una capa subyacente de tejido conjuntivo más laxo, la hipodermis o también conocida como tejido celular subcutáneo, que está conformada por tejido adiposo unilocular y que participa en relacionar la piel con las estructuras más profundas (Brüel, et al 2012).

### 1.1.1. Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel, compuesta por un epitelio plano estratificado con estrato córneo, que crece constantemente, pero mantiene su espesor normal gracias al proceso de la descamación.

En la epidermis se encuentran cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

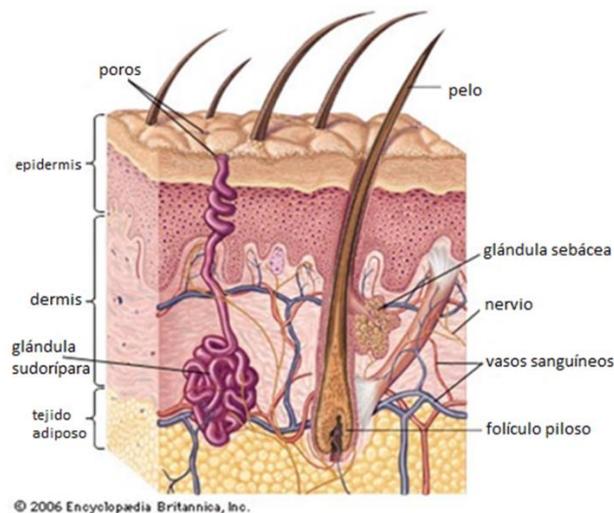


Fig. 1. La piel y sus anexos cutáneos. En este esquema Podemos observar ambas capas de la piel: epidermis y dermis, así como los anexos cutáneos que la conforman (glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, folículos pilosos y algunos vasos sanguíneos).

Los queratinocitos son las células más abundantes de la epidermis, (aproximadamente el 80% del total de las células epidérmicas) están en continua renovación por abundante descamación, sufren una morfo diferenciación a medida que ascienden en la epidermis este proceso es la citomorfosis o cornificación y dura 30 días aproximadamente.

Gracias al proceso de cornificación se pueden observar varios estratos bien definidos dentro de la epidermis (ver fig. 2), donde los queratinocitos de cada estrato comparten características morfológicas y funcionales. Los estratos de la región profunda a superficial son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Ross, et al 2012).

- El estrato basal o germinativo: es la capa más profunda de la epidermis, encontramos células cúbicas o cilíndricas, con núcleos ovales y citoplasma basófilo. Las células se relacionan entre sí mediante desmosomas y están ancladas a la membrana basal subyacente mediante hemidesmosomas (anclan la epidermis a la dermis); muestran una elevada actividad mitótica, renovando la población celular de manera continua.
- Estrato espinoso: Este se conforma por 5 o más capas celulares de gran tamaño de forma poliédrica y conforme se van dirigiendo a la superficie se van aplanando de manera gradual, los núcleos son redondeados y el citoplasma posee moderada basofilia. En este estrato se inicia la formación de los gránulos laminares que contienen lípidos agrupados densamente, también hay actividad mitótica en la zona suprabasal que junto con el estrato basal representa la región proliferativa de la epidermis.
- Estrato granuloso: representa el último estrato con células nucleadas y se compone de 3 a 5 capas de células aplanadas cuyo citoplasma contiene una cantidad creciente de gránulos muy basófilos denominados gránulos de queratohialina; estos gránulos son los que le dan el aspecto característico a este estrato. Los queratinocitos de este estrato liberan el contenido lipídico de los gránulos laminares mediante exocitosis en forma de láminas de ceramidas formando una barrera impermeable al agua en el espacio intercelular.
- Estrato lúcido: sólo se encuentra en la piel gruesa, se distingue como una delgada capa pálida de queratinocitos que carecen de núcleo y organelos, poseen abundantes filamentos de queratina agrupados de forma densa paralelos a la superficie formando moléculas de eleidina.
- Estrato córneo: es la capa más superficial de la epidermis y está formada por restos celulares sin organelos, aplanadas y totalmente cornificadas; en consecuencia, el estrato

se distingue como una gruesa capa muy eosinófila de láminas onduladas, en la que no se diferencian células. En la superficie, tiene lugar una continua descamación de las células córneas que están separadas entre sí. Este estrato representa la primera barrera mecánica de la epidermis y la barrera impermeable formada por la cubierta celular cornificada y la cubierta lipídica (Ross, et al 2012), (Brüel, et al 2012).

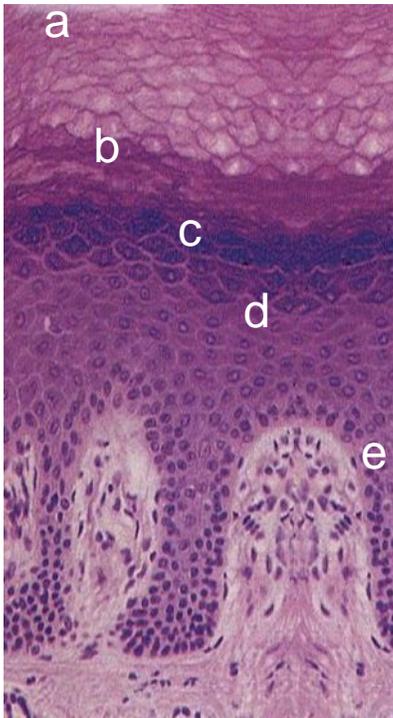


Fig. 2. Estratos de la Epidermis. En esta fotomicrografía teñida con H&E podemos observar los 5 estratos de la epidermis de abajo hacia arriba tenemos el a) estrato basal, b) estrato espinoso, c) estrato granuloso, d) estrato lúcido y e) estrato córneo.

### 1.1.2. Dermis

La dermis está compuesta por tejido conjuntivo denso que provee sostén mecánico, resistencia y espesor a la piel. Situada debajo de la epidermis con un espesor de entre 0.6 a 3 mm, la interfaz entre la epidermis y la dermis está formada por papilas dérmicas y rebordes epidérmicos.

La dermis se compone de dos capas claramente diferenciadas: subyacente a la epidermis se encuentra la dermis papilar, y por debajo la dermis reticular de mayor grosor y conteniendo a los anexos cutáneos (fig.3) (Brüel, et al 2012).

La dermis papilar consiste en tejido conjuntivo laxo y forma los rebordes dérmicos. Esta delicada estructura contiene predominantemente moléculas de colágena tipo III y fibras elásticas. Contiene abundantes vasos sanguíneos de tipo capilar continuo que irrigan a la dermis papilar y nutren a la epidermis por difusión, también se observan numerosas prolongaciones nerviosas. Las células que predominan en esta capa son: fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y células cebadas, característicamente las células se encuentran separadas entre sí por una gran cantidad de matriz extracelular.

La dermis reticular, aunque su espesor varía de acuerdo con la región anatómica de la superficie corporal que se estudie, siempre es la parte más gruesa de la dermis y contiene mucho menos células que la dermis papilar. Está formada por tejido conjuntivo denso irregular con un predominio de fibras de colágeno tipo I y fibras elásticas, esta se localiza por debajo de la red capilar superficial e inicia a la altura de los conductos de desembocadura de las glándulas sebáceas en los folículos pilosos. En ella se alojan los distintos anexos cutáneos, incluyendo a los folículos pilosos y su correspondiente músculo piloerector, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas (Ross, et al 2012).

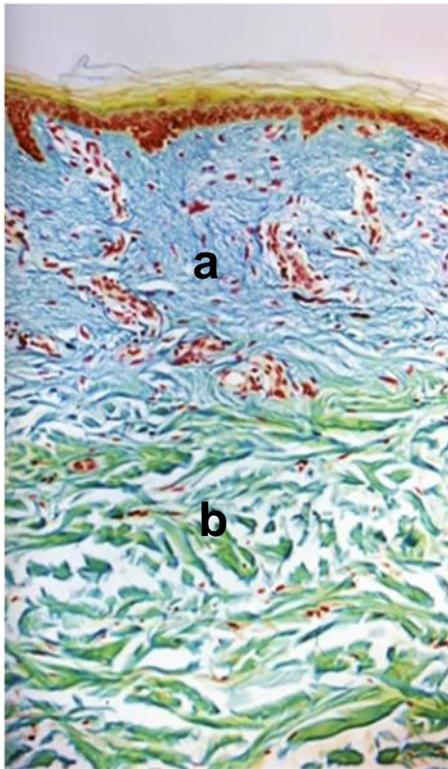


Fig. 3. Dermis papilar y Dermis reticular. En esta fotomicrografía teñida con Tricrómico de Gallego, podemos distinguir la Dermis papilar (a) con su característico tejido conjuntivo laxo conformado por finas fibras de colágena I y III en color azul así como una gran cantidad de células y vasos sanguíneos; en la porción profunda del corte se aprecia la Dermis reticular (b) conformada por tejido conjuntivo denso irregular donde las fibras de colágeno I se tornan en gruesos fascículos lo que les da la coloración verde-azul y se observan muchas menos células en comparación con la dermis papilar. *Atlas de histología*, Fuente Depto. de Biología Celular y Tisular, Fac Med., UNAM.

## 1.2 Fibroblastos y Matriz Extracelular Dérmica

### 1.2.1. Matriz Extracelular Dérmica

La matriz extracelular conjuntiva está compuesta por una sustancia fundamental amorfa (SFA) y fibras. La sustancia fundamental amorfa es una sustancia viscosa, amorfa constituida por líquido tisular que contiene agua, sales minerales, proteínas, iones etc., junto con proteoglicanos y glicoproteínas. Los proteoglicanos son complejos formados por glucosaminoglicanos (GAGs, polímeros largos no ramificados de cientos de hidratos de carbono), que se unen a una cadena proteica central, de manera que forman macromoléculas altamente hidrofílicas debido a la gran cantidad de cargas negativas proporcionadas por los GAGs, lo que confiere a la matriz una consistencia gelatinosa. La matriz extracelular (MEC) basada en colágeno constituye el principal elemento de soporte estructural de los animales multicelulares; la proteína de colágeno amortigua y lubrica las células, en donde la MEC desempeña un papel principal en los procesos de organización y orientación tisular, adhesión celular, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis (Saavedra Torres, et al 2018). La composición molecular de la matriz extracelular es típica de cada tejido y sus componentes son renovados continuamente por las células que la producen. Esto supone que la matriz extracelular está en constante renovación (Saavedra Torres, et al 2018).

Las glicoproteínas son proteínas con distintas cadenas de carbohidratos ancladas a ellas, este grupo de proteínas cuenta con numerosos motivos de adhesión que les permite interactuar específicamente tanto con componentes de la MEC como con distintas células, por lo tanto, sirven de puente de anclaje entre ambas; de entre estas glicoproteínas de adhesión, algunas de las más conocidas son la fibronectina y la laminina.

Las fibras presentes en la matriz extracelular de un tejido conjuntivo como la dermis son las fibras de colágena, las fibras reticulares y las fibras elásticas. Las fibras de colágena son flexibles pero muy resistentes a la tracción, y se disponen formando haces más o menos gruesos que a su vez están formadas por fibrillas proteicas dispuestas en paralelo, orientadas según la fuerza a la que están sometidas. Se conocen hasta 28 tipos de colágena diferentes, según la variación en la secuencia de aminoácidos que las componen. La colágena tipo I es la más abundante en la dermis y forma haces gruesos de colágena. Otra variedad de colágena es el tipo III, conocida como fibras reticulares, cuyas fibrillas forman finas redes tridimensionales, las cuales también están presentes en la dermis. (Sacho Tello, et al 2015)

Las fibras de colágeno son cordones de 0.5-20 micrometros de diámetro y longitud indefinida, se presentan ligeramente onduladas y presentan una estriación longitudinal.

El colágeno está constituido por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas agrupadas en una estructura helicoidal. La glicina constituye la tercera parte de los aminoácidos de cada cadena, hecho único entre todas las proteínas del organismo. La repetición de 333 tripletes de forma Gli-X-Y preside la estructura de cada una de las cadenas.

En la mayoría de los casos, en posición X se encuentra la prolina, en posición Y se encuentran la hidroxiprolina y la hidroxilisina; dos aminoácidos que no abundan en la constitución de las otras proteínas del organismo (Saavedra Torres, et al 2018).

El tejido conjuntivo laxo o areolar es el que contiene una cantidad equilibrada de todos los elementos (células, SFA, y fibras), y es el tipo de tejido conjuntivo que encontramos en la dermis papilar por debajo de la epidermis. Esta variedad conjuntiva contiene abundantes células conjuntivas de varios tipos, junto con un reticulado fino de fibras de colágeno, elásticas y reticulares, así como una SFA relativamente abundante, lo que permite la fácil difusión de gases y sustancias nutritivas.

Sin embargo, cuando el componente mayoritario son las fibras se denomina tejido conjuntivo denso, como el que se encuentra en la dermis reticular. En donde predominan gruesas fibras de colágeno tipo I, orientadas en los tres planos del espacio, junto con una red de gruesas fibras elásticas, mientras que la proporción de células conjuntivas es menor que en el tejido conjuntivo laxo. Esta disposición confiere a la dermis reticular una resistencia a las fuerzas de tensión en todas las direcciones del espacio (Sacho Tello, et al 2015)

### 1.2.2. Fibroblastos

Las células más abundantes del tejido conjuntivo son los fibroblastos, que representan el mayor porcentaje celular en la dermis. Son los principales responsables de sintetizar y mantener los diferentes componentes de la matriz extracelular conjuntiva que les rodea (fig. 4).

Los fibroblastos son células funcionalmente activas, de morfología fusiforme y prolongaciones finas en sus extremos. (Sacho Tello, et al 2015)

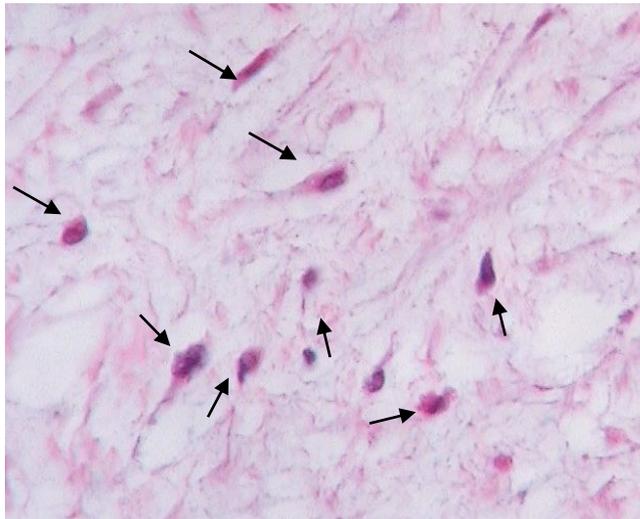


Fig. 4. En esta imagen se observan varios fibroblastos rodeados de sustancia intercelular. Los fibroblastos tienen una forma alargada con núcleos centrales alargados; el citoplasma es basófilo. Fuente: Depto. de Biología Celular y Tisular Fac Med, UNAM.

Los fibroblastos mantienen la homeostasis de las células vecinas y controlan los infiltrados inflamatorios presentes en el tejido conjuntivo, ya que son capaces tanto de secretar citocinas y factores de crecimiento como de responder a ellos.

Por otra parte, los fibroblastos tienen capacidad mitótica, por lo que proliferan ante determinados estímulos, mediado por el factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*, FGF), el cual es secretado por otros tipos celulares como los macrófagos. (Sacho Tello, et al 2015)

Los fibroblastos tienen la capacidad no sólo de sintetizar a la colágena, sino también de degradarla mediante actividad enzimática, al igual que a los demás componentes de la matriz extracelular participando activamente en procesos de remodelación del tejido conjuntivo (Acosta , 2006). También desempeñan un papel importante en el proceso de la cicatrización de las heridas mediante la producción de enzimas de remodelación, tales como proteasas y colagenasas.

Los fibroblastos constituyen una población heterogénea, es decir no todos los fibroblastos tienen las mismas características, ni siquiera entre los fibroblastos residentes de un mismo órgano. En la dermis se conocen diferentes subpoblaciones de fibroblastos con localizaciones concretas, orígenes diferentes, expresión genética específica y que desarrollan distintas funciones. Así se ha descrito que existen diferencias entre los fibroblastos de la dermis papilar, los de la dermis reticular y los fibroblastos asociados a folículos pilosos (Sacho Tello, et al 2015).

Bajo el microscopio de luz, los fibroblastos son normalmente reconocidos en asociación con agrupaciones de fibras colágenas. En cortes teñidos con hematoxilina-eosina, éstos se presentan como células con aspecto fusiforme, con finas prolongaciones, núcleo oval, algo achatado y escaso citoplasma, el cual es eosinófilo, pero con una coloración tan débil que puede dificultar su apreciación en estos cortes. (Acosta , 2006)

Una vez diferenciados, los fibroblastos poseen la capacidad de replicarse mediante divisiones mitóticas. En cultivos de fibroblastos de tejido embrionario, éstos pueden experimentar aproximadamente 50 divisiones antes de que adquieran una condición de senescencia y mueran. Sin embargo, este número se reduce a 20 cuando los fibroblastos provienen de tejido adulto (Acosta , 2006).

### 1.3 Funciones principales de la piel

La piel y sus anexos cutáneos forman un órgano complejo compuesto por muchos tipos celulares diferentes. La diversidad de estas células y la capacidad de actuar en conjunto provee una serie de funciones que le permiten a la persona enfrentarse al medio externo. Las funciones principales de la piel son:

- Actúa como una barrera que delimita al medio interno y protege contra agentes físicos, químicos y biológicos provenientes del medio externo.
- Nos protege de los rayos ultravioleta.
- Regula la temperatura corporal (termorregulación) y pérdida de agua (homeostasis).
- Transmite información sensitiva del medio externo al sistema nervioso.
- Interviene en la excreción a través de la secreción exocrina de las glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas.
- Cubierta flexible para el organismo. (Ross, et al 2012)
- Interviene en la inmunidad del organismo.
- Es reservorio de sangre debido a que la dermis tiene extensas redes de capilares que transportan del 8 al 10% del flujo sanguíneo total en un individuo en reposo.
- Interviene en la síntesis de la vitamina D

(Saavedra Torres, et al 2018).

Las propiedades y estado de la piel varían según la zona del cuerpo en donde la piel se localiza y pueden verse influidos por varios factores tales como; el tipo de piel, el origen étnico, la edad, el género, el índice de masa corporal e incluso el estilo de vida.

La hidratación de la piel es un parámetro muy importante responsable de la homeostasis de la piel, todas las variaciones de un nivel normal de hidratación pueden provocar cambios significativos en las propiedades y funciones de la piel. Un nivel bajo de hidratación resulta

en baja elasticidad de la piel, envejecimiento prematuro, aparición de arrugas, mayor rugosidad de la piel y menor resistencia mecánica (Dąbrowska, et al 2017).

La piel protege al cuerpo de sustancias penetrantes a través de varios mecanismos ya sea mecánicamente bloqueando la migración de partículas hacia la piel o neutralizándolas, atacándolas o degradándolas

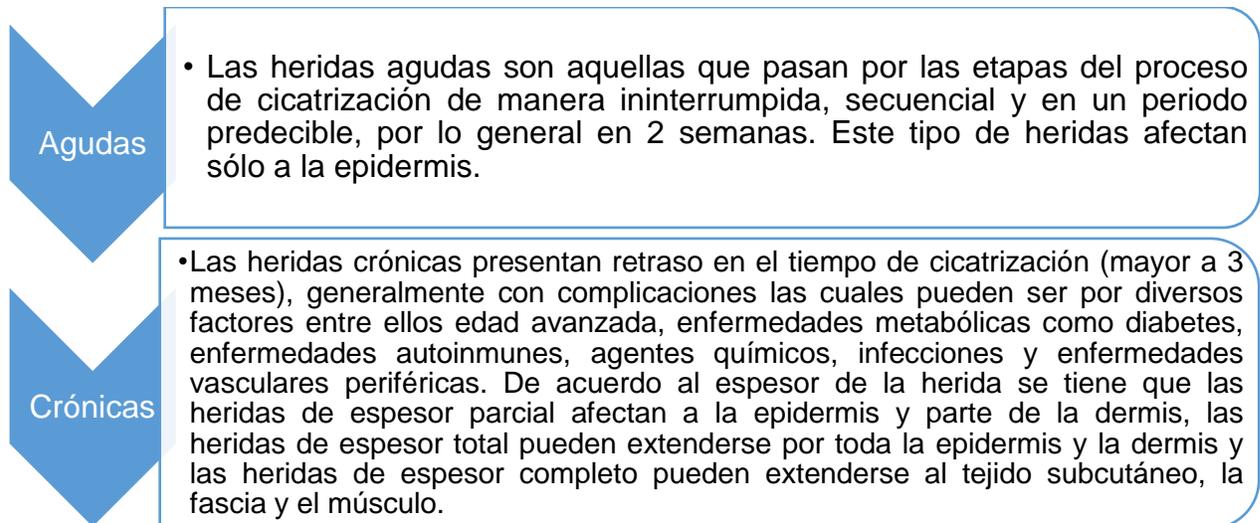
La resistencia mecánica de la piel se encuentra en la dermis, supone también una importante reserva de agua y electrolitos; debido a su rica vascularización juega un papel importante termorregulador, y debido a la red nerviosa formada en su interior actúa procesando información sensitiva referente al dolor, presión y temperatura, además de que la dermis y su suministro de sangre son responsables de proporcionar nutrientes. En ella se encuentran los anexos cutáneos (pelo, uñas, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas) (Míguez Burgos, 2012)

La piel comprende un aspecto importante de la apariencia, lo que por supuesto tiene una influencia significativa en la vida social; por lo tanto, la piel también puede considerarse como un factor importante de la salud mental y reproductiva.

Dado que la piel es un elemento tan crítico tanto para la salud física como mental, se debe dar un cuidado óptimo a cualquier herida sostenida, de modo que la región de la piel dañada se restablezca a una estructura y forma similar a la original lo más rápido posible para que la piel pueda reanudar sus funciones (Seung-Kyu, 2016).

## 1.4 Heridas cutáneas y su clasificación

La *Wound, Ostomy and Continence Nurses Society* (WOCN) define herida como una interrupción en la estructura y funciones de la piel y de los tejidos subyacentes, relacionada con diversas etiologías, como los traumatismos, las cirugías, la presión sostenida y las enfermedades vasculares (Vela Anaya, et al 2018). Estas se pueden clasificar con distintos criterios, uno de ellos es el tiempo que puede dilatar la reparación del tejido dañado, clasificándolas como heridas agudas y crónicas:



(Seung-Kyu, 2016)

El mecanismo de la curación de heridas depende de la comunicación entre los fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos, moléculas de la matriz extracelular (MEC) y vascularización, que se regula por la liberación de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento.

La cicatrización de heridas en la piel es una integración de procesos dinámicos altamente regulado por mecanismos celulares, moleculares y humorales; involucra elementos sanguíneos, matriz extracelular y células parenquimatosas. Estos procesos de reparación de heridas siguen una secuencia de tiempo específica (Lanza, et al 2007).

- Hemostasis: Inicia con la formación provisional de una matriz, que ocurre inmediatamente después de la lesión y se completa después de unas horas. El organismo recluta muchas células y factores para el proceso de reparación de la herida en ausencia de la fuerza mecánica de la herida. Cuando la herida atraviesa la capa epidérmica, la sangre y los vasos linfáticos están lesionados, hay vasoconstricción. Se inicia la cascada de coagulación activándose los diferentes

factores de la coagulación y por el colágeno expuesto los trombocitos se activan para agregarse, hay acaparamiento de plaquetas para reducir la pérdida de sangre y formar un coágulo de sangre compuesto de citocinas, factores de crecimiento, moléculas de fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondinas formando una matriz provisional para la migración de leucocitos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Reinke, et al 2012).

- Fase inflamatoria: La fase inflamatoria comienza simultáneamente con la homeostasis y la coagulación, los cuerpos extraños, las bacterias y los restos de piel muerta, originados al momento de la lesión, deben ser eliminados del área lesionada, ya que pueden interferir con el proceso de curación de la herida. Esto se hace principalmente mediante la participación de las células inflamatorias que salen del torrente sanguíneo (plaquetas, neutrófilos y monocitos) y se alojan en el tejido conjuntivo de la zona lesionada (ver fig. 5).

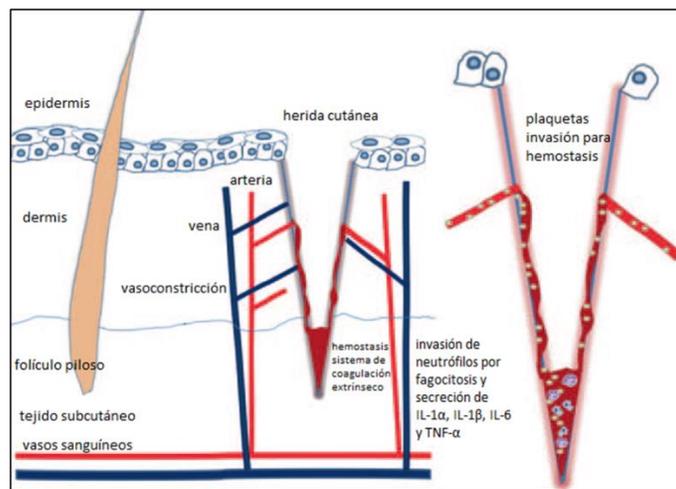


Fig. 5. Fase inflamatoria después de una lesión cutánea; hemostasis e invasión de las células inflamatorias. Imagen tomada de (Reinke & Sorg, 2012).

- Fase de proliferación: Las células de la piel, como lo son los fibroblastos y los queratinocitos, son las responsables de la regeneración de la piel afectada, mientras los fibroblastos producen colágeno, proteoglicanos y otros elementos de la matriz extracelular, los queratinocitos y las células endoteliales producen una gran cantidad de factores de crecimiento con la finalidad de que se rellene el espacio ocupado por la lesión, esta etapa dura aproximadamente 3 semanas (ver fig. 6).

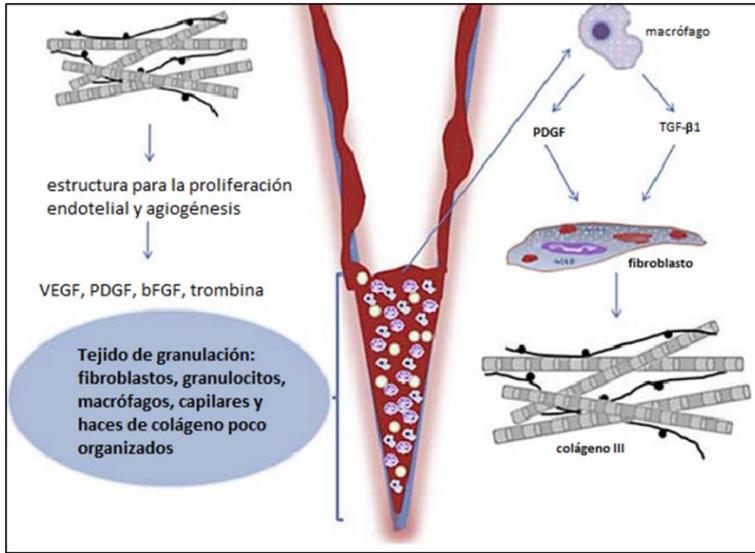


Fig. 6 Fase de proliferación; secreción de factores de crecimiento, síntesis de colágeno tipo III. Imagen tomada de (Reinke, et al 2012)

- Maduración y remodelación: El tejido de granulación conformado principalmente por leucocitos de tipo neutrófilos y linfocitos comienza a disminuir aumentando la población de macrófagos los cuales se encargan de la remoción de detritos celulares y tisulares al mismo tiempo que los fibroblastos depositan una mayor cantidad de fibras en la nueva matriz dérmica, formando una cicatriz pálida y avascular constituida de fibroblastos fusiformes y tejido conjuntivo denso irregular rico en haces gruesos de colágeno tipo I y pocas fibras elásticas (ver fig.7) (Seung-Kyu, 2016).

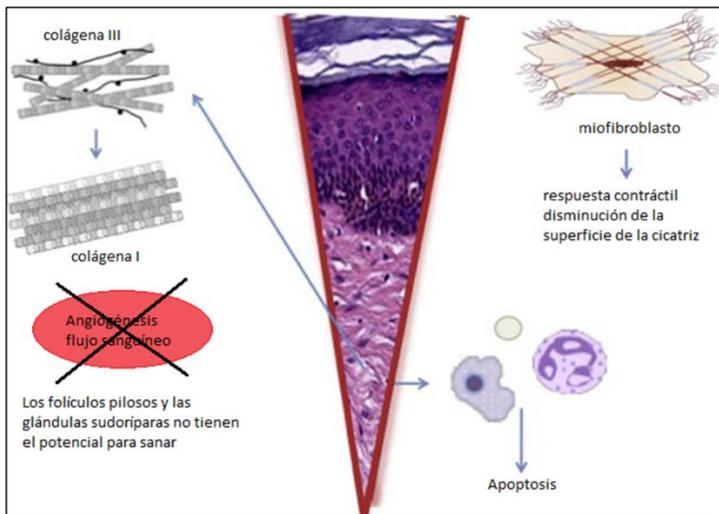


Fig. 7 Remodelación, el proceso de regeneración del nuevo tejido y la reorganización del tejido conjuntivo y la respuesta contráctil

#### 1.4.1 Problemas y estadísticas de la atención de heridas en México

Tras una lesión cutánea, la pérdida de continuidad que se produce puede comprometer piel, tejido subcutáneo, músculos, tendones, nervios, huesos y órganos blandos, dependiendo de su severidad. Las tasas de cicatrización oscilan entre 21 y 35% y la tasa de recurrencia de la lesión es alta, lo cual repercute en un alto nivel de ocupabilidad de las camas hospitalarias, gastos excesivos en tratamientos y repercusiones negativas en la calidad de vida de las personas. Desde el punto de vista económico, se estima que, el comercio de productos para el tratamiento de heridas será de entre los 15 a 22 billones de dólares para el 2024 (Casado, et al 2020).

La atención de las heridas agudas y crónicas representa diversos desafíos tanto para las personas que las desarrollan como para los sistemas de salud de todo el mundo. En lo que se refiere a los pacientes, vivir con una herida crónica incide de manera negativa en todos los niveles de la persona que padece la herida, lo cual impacta en su esfera física debido a la presencia de dolor constante, incomodidad, limitaciones en la movilidad, trastornos del sueño y disminución del apetito; también en la esfera emocional de la persona por la manifestación de sentimientos de ansiedad, depresión, enojo, frustración y alteraciones en la imagen corporal; y, por último, en su esfera social mediante el desarrollo de comportamientos de aislamiento, la pérdida parcial o total de su independencia y la disminución de su capacidad para trabajar (Vela Anaya, et al 2018).

En lo que corresponde a los sistemas de salud, la atención de las heridas implica una importante inversión económica, relacionada con la formación y contratación de recursos humanos especializados en el cuidado de heridas, la adquisición de insumos de alta tecnología, el incremento en los días de estancia hospitalaria de los pacientes o del número de reingresos y la respuesta legal ante inconformidades de pacientes relacionadas con la falta de calidad en la atención sanitaria.

En un estudio realizado por la Secretaría de Salud en 159 unidades médicas en México, se obtuvo un total de 36,022 casos de heridas donde: la atención de las heridas principalmente fue en unidades de segundo nivel (79.4%) y ambulatorias (75.1%). Las heridas más recurrentes fueron las heridas traumáticas (26.6%) y las úlceras de pie diabético (23.4%). Los costos directos mensuales en pesos fueron estimados en \$46 563 070.76 (ambulatorio) y \$1 864 124 436.89 (hospitalización) (Vela Anaya, et al 2018).

Debido a lo expuesto y a la problemática existente a nivel hospitalario y de gestión en las diferentes instituciones de salud en México, se cree importante la creación de un andamio dérmico económico y de fácil acceso para la población.

## 1.5 Apósitos en el tratamiento de heridas crónicas

Las lesiones que comprometen los tejidos blandos alterando el lecho vascular, independientemente de su extensión y profundidad, hacen complejo establecer un protocolo de tratamiento que optimice el tiempo de formación de tejido de granulación para lograr un cierre eficaz en primera o segunda intención (Casado, et al 2020). El tratamiento tópico seleccionado para conseguir la cicatrización de las úlceras cutáneas crónicas o heridas dependerá de las características y estadios de la lesión: necrosis, tejido de granulación, profundidad, exudado, signos de infección, pH tisular, dolor, región anatómica, piel perilesional (Fornes Pujalte, et al 2008).

Un apósito es un producto que cubre, protege y aísla la úlcera de factores externos perjudiciales al medio y que actúa de manera pasiva absorbiendo exudados, o de manera activa modificando el lecho de la herida e interviniendo en el proceso de cicatrización. Los requisitos que debe reunir un apósito son: proteger la úlcera de microtraumatismos y de agentes microbianos, mantener la temperatura corporal en el lecho de la lesión y una humedad adecuada que no dañe la piel perilesional ni interfiera en los procesos bioquímicos de la cicatrización, favorecer la autólisis, promover la cicatrización, ser absorbente y controlar el exudado, ser de fácil aplicación y no doloroso al retirarlo, resultar adaptable y poder proteger la piel lesionada y mantener un pH idóneo de 6.6 en el lecho de la herida (Fornes Pujalte, et al 2008).

Los beneficios que proporciona un apósito son tanto la reducción de los tiempos de curación, reducción de tiempos de enfermería, disminución del dolor por seguir los principios de la cura en ambiente húmedo y menos manipulación de la herida y por tanto también una mejor calidad de vida del paciente (Fornes Pujalte, et al 2008).

Hoy en día existen en el mercado una amplia variedad de apósitos para el tratamiento de heridas, sin embargo es importante conocer esta amplia gama de productos para poder elegir el producto más adecuado para cada úlcera o herida, según el proceso de cicatrización en el que se encuentra.

A continuación se mencionaran algunas de las formas en las cuales podemos encontrar a los apósitos en el mercado:

- **Gasas:** Los apósitos tradicionales son fundamentalmente los de gasa tejida, impregnada o no con parafina, cremas, pomadas, o humedecida con solución salina u otras soluciones. Su composición es de algodón hidrófilo o sintético. Son útiles para la limpieza de las lesiones y de la piel. Hay que cambiarlos diariamente para evitar infecciones y la incorporación con el tejido de granulación, los inconvenientes a la

hora de retirarlos son: dolor, hemorragias e incluso retroceso de la cicatrización, suelen quedarse restos de filamentos (Fornes Pujalte, et al 2008).

- Hidrocoloides: Estos apósitos están compuestos de polímeros en una fina suspensión y en ocasiones contienen polisacáridos, proteínas y adhesivos. Al contacto con la herida los polímeros se mezclan con el exudado y forman una masa gelatinosa (Casado, et al 2020). Los hidrocoloides hacen que las úlceras se mantengan en un ambiente húmedo y cálido, debido a la gelificación del apósito y aumento de su volumen en contacto con el lecho de la herida con el propio exudado, las heridas presentan un cambio de color y olor originado por el desbridamiento autolítico, aumento de tamaño en la lesión en los primeros días originada por el desbridamiento autolítico lo cual estimula la angiogénesis en la herida, la proliferación de los queratinocitos y diferenciación de los fibroblastos; estos apósitos se ponen en fase de granulación y con exudado bajo o moderado. En el mercado se presenta en todas las variedades: apósitos finos, absorbentes, hidrofibra, malla y pastas por mencionar algunos (Fornes Pujalte, et al 2008).
- Espumas poliméricas: Estos apósitos de polímeros tienen diferentes capas con una superficie adhesiva y una externa repelente al agua. Son similares a los hidrocoloides pero en vez de formar un gel, el exudado es absorbido por el apósito que a su vez mantiene un ambiente húmedo (Casado, et al 2020). Esponjas con capacidad de absorber (4 ó 5 veces su volumen), el exudado de lesiones con moderado a alto nivel de exudado, mantienen un ambiente húmedo y protegen frente a presiones externas, ayudan a un desbridamiento autolítico, hay intercambio gaseoso pero actúan como una barrera frente a microorganismos y líquidos, no se adhieren al lecho de la herida, pueden tener una capa adhesiva o necesitar de un apósito secundario para su sujeción (Fornes Pujalte, et al 2008).
- Hidrogeles: Se presentan en forma de gel, malla o placa, compuestos por agentes humectantes que son polímeros hidrófilos, se componen entre un 60 y un 95% de agua, polisacáridos, pectina, almidón, hidrocoloides, cloruro sódico, e incluso algún producto lleva en su composición alginatos. Son desbridantes autolíticos, alivian el dolor del lecho de la úlcera, favorecen el tejido de granulación y la fase de epitelización y no se recomiendan para úlceras o lesiones muy exudativas por el riesgo de maceración de la piel perilesional. Es compatible tanto con lesiones infectadas, tejido necrótico y tejido de granulación. Necesitan para su acoplamiento un apósito secundario (Fornes Pujalte, et al 2008).
- Poliuretanos: Se usan en heridas superficiales y limpias, en la prevención de úlceras por presión o en heridas post quirúrgicas. Son apósitos transparentes, finas películas de poliuretano bañados con una capa de adhesivo acrílico, semioclusivos, permeables a gases y vapor de agua e impermeables al agua, nula capacidad de gestión de exudados y si óptimos para fijar otros apósitos secundarios en zonas de difícil adherencia, tiene muy poca capacidad de absorción y se saturan rápidamente;

se pueden encontrar en forma de film transparente o spray (Casado, et al 2020) (Fornes Pujalte, et al 2008).

- Apósitos con plata: Controlan y reducen la carga bacteriana, presentan amplia capacidad antimicrobiana con un amplio espectro de acción, por lo que resultan una alternativa a la utilización de antibióticos locales. La plata se activa por humedad del exudado, aplicación de hidrogeles o suero fisiológico. La forma de actuar es distinta según los apósitos, unos liberan la plata en el lecho de la herida y en contacto con esta, otros absorben el exudado en el apósito y ahí son liberados los iones plata (Fornes Pujalte, et al 2008).
- Aloinjertos: Hace referencia a la piel humana cadavérica y es utilizada como una medida temporal para cubrir heridas hasta que suceda el cierre con un injerto de piel permanente. Sin embargo tienen alta tasa de rechazo por reacción inmune del tejido receptor. La piel de cadáver puede ser tratada con un proceso químico para disminuir los componentes antigénicos, dejando una matriz celular immuno-dérmica. El incorporar material aloinjerto en una herida profunda proporciona alivio del dolor y una cubierta durante y después de la lesión.  
Cuando el aloinjerto se vasculariza, las células epiteliales altamente inmunógenas desencadenan la respuesta inmune del huésped. Cuando el aloinjerto es liofilizado, se destruye el componente celular, disminuyendo la reacción inmunológica, la parte cutánea del injerto se incorpora en la parte de la herida y sirve como una cama dérmica para más deposiciones del injerto de piel autóloga. Sin embargo, su uso se ve limitado a la disponibilidad de bancos de piel (Colorado, et al 2013).
- Autoinjertos: se separa una zona de piel de un tejido adecuado y se trasplanta en el mismo individuo a la zona receptora de la que debe recibir un nuevo suministro de sangre. Los materiales utilizados como autoinjertos se basan en cultivos criopreservados del paciente que son depositados sobre una matriz constituida por el material comercial (Colorado, et al 2013).
- Xenoinjerto: El injerto xenogénico implica la transferencia de tejido entre especies, pero al igual que el trasplante alogénico se presentan problemas ante la posibilidad de rechazo del injerto (Colorado, et al 2013).

## 1.6 Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos

La Medicina Regenerativa es un campo multidisciplinario de investigación donde se aplican diferentes herramientas con el objetivo de reparar, reemplazar y regenerar los órganos y tejidos humanos. Entre los principales abordajes de la Medicina Regenerativa están:

- Terapia Celular (Tratamiento con células).
- Terapia Génica.
- Ingeniería de Tejidos o Tisular.

(Chen, et al).

La Ingeniería de Tejidos es un campo de investigación interdisciplinario de la ciencia que combina conocimientos de numerosos campos científicos, como la biología, la bioquímica, la física, la química, la ingeniería aplicada y la medicina. (Sarvazyan, 2020). Uno de los objetivos más importantes de la Ingeniería de Tejidos es el diseño de los biomateriales que soporten células y las moléculas de señalización que permitan la regeneración del tejido dañado y que esto lleve a una alternativa de trasplante de órganos y a la posterior reconstrucción de tejidos. Un ingeniero de tejidos debe comprender la relación entre la estructura y la función de las células, tejidos y órganos, así como combinar conocimientos de biología, materiales, ingeniería y cirugía (Roldán, et al 2016).

El tejido nuevo, vivo y funcional se fabrica utilizando células vivas que generalmente están asociadas, con una matriz extracelular o andamiaje para guiar el crecimiento del tejido. Las células, los andamios y los factores de crecimiento son los tres materiales claves para la ingeniería de tejidos (fig.8).

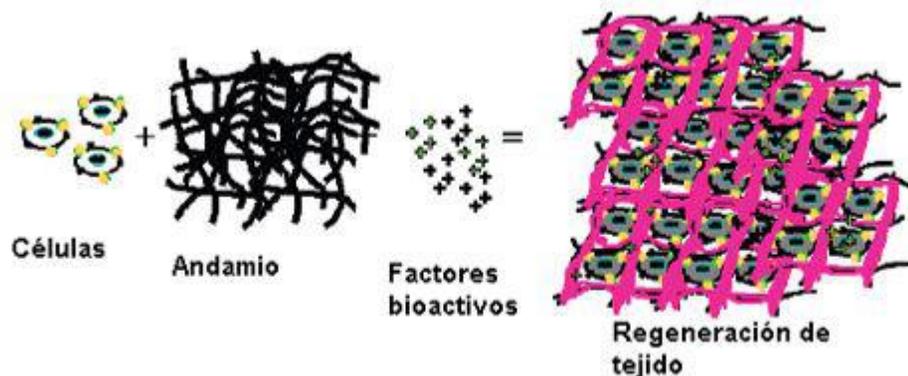


Fig. 8 Células, andamios y factores de crecimiento; los tres elementos básicos para la Ingeniería de tejidos. Foto tomada de (Roldán Vasco, et al 2016).

Las células son los componentes fundamentales del tejido, y los tejidos son la unidad básica de la función en el cuerpo. Generalmente, grupos de células forman y secretan sus propias estructuras de soporte, llamadas matriz extracelular. Esta matriz, o andamio, hace más que sólo servir como soporte para las células; también actúan como una estación repetidora para varias moléculas de señalización. Por consiguiente, las células reciben mensajes de muchas fuentes que se vuelven disponibles desde el entorno local. Cada señal puede iniciar una cascada de señalización que determina qué le sucede a la célula. Al entender cómo responden las células individuales a las señales, cómo interactúan con su entorno y cómo se organizan en los tejidos y organismo, los investigadores han podido manipular estos procesos para sanar los tejidos dañados o incluso crear nuevos (Ingeniería de tejidos y Medicina Regenerativa, 2013).

## 1.7 Biomateriales y Andamios en Ingeniería de Tejidos.

Los biomateriales se pueden considerar como materiales naturales o fabricados por el hombre, que pueden ser empleados directamente para funciones de sustitución o reemplazo de tejidos vivos. Desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, los biomateriales se definen como una sustancia o material de ingeniería que adopta una estructura, que sola o como parte de un sistema complejo, se emplea para dirigir el desarrollo de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico mediante el control de interacciones con componentes de sistemas vivos (Roldán Vasco, et al 2016).

Los biomateriales, para su implementación en aplicaciones biomédicas, exigen previo análisis y cumplimiento de normas técnicas que relacionen respuesta al contacto con los tejidos vivos del cuerpo, propiedades del material, características de fabricación de las piezas y los dispositivos a escala industrial, así como factores éticos y de regulación (Roldán Vasco, et al 2016).

Toxicología; normalmente un biomaterial debe ser inocuo y nunca debe ser tóxico para evitar la migración de sustancias a través de este.

Biocompatibilidad; en términos generales, se puede afirmar que la biocompatibilidad evalúa la interacción entre el biomaterial y los sistemas vivos; cuando la respuesta biológica es mínima, el material empleado es entonces considerado como biocompatible (Roldán Vasco, et al 2016). Debido a que los materiales implantados provocan en el tejido vivo una respuesta, podemos clasificar la biocompatibilidad implante-tejido como bioinerte, biodegradable o bioactiva.

Los materiales bioinertes son aceptados por el sistema, donde pueden permanecer durante largos periodos de tiempo bajo el ambiente corrosivo de los distintos fluidos corporales.

Los materiales biodegradables son diseñados para su gradual degradación con el tiempo y ser reemplazados por el tejido huésped.

Por último, los materiales bioactivos son aquellos diseñados para reaccionar químicamente con el tejido huésped, creando una fuerte interacción entre ellos (González Jiménez, et al 2014).

No sobra comentar que cada biomaterial y dispositivo tienen un requerimiento de desempeño físico y mecánico de acuerdo con la necesidad a desempeñar en la función fisiológica. Estos requerimientos pueden ser divididos en tres categorías: desempeño mecánico, durabilidad mecánica y propiedades físicas.

Un amplio rango de consideraciones éticas se debe tener en cuenta en el desarrollo y aplicación de biomateriales. Estas involucran desde experimentación en animales, su uso en humanos, su producción industrial, el campo de investigación, la calidad de vida de los pacientes y las agencias regulatorias de gobierno ya que en cada país debe existir un mecanismo de regulación de dispositivos médicos y biomateriales para uso en pacientes. (Roldán Vasco, et al 2016).

Los biomateriales juegan un papel crítico en la ingeniería de tejidos, desarrollando la función de matriz artificial extracelular y medio de soporte tridimensional de las células durante el proceso de regeneración del tejido.

La gama de materiales válidos para esta aplicación abarca desde polímeros, cerámicos, metales y materiales compuestos. Los polímeros son los biomateriales más populares en ingeniería de tejidos, debido a su versatilidad mecánica y a su similitud con las características estructurales del tejido, por lo que se han dedicado grandes esfuerzos en el desarrollo de biomateriales poliméricos que imitan tejidos naturales (González Jiménez, et al 2014).

Los polímeros se producen por la unión de cientos de miles de pequeñas moléculas denominadas monómeros, que forman enormes cadenas (macromoléculas) de diferentes formas. La mayor parte de los polímeros están formados por estructuras de carbón y, por lo tanto, se denominan compuestos orgánicos. Se pueden sintetizar polímeros de origen natural o sintético, ambos empleados en diferentes aplicaciones biomédicas.

La principal ventaja de los biomateriales poliméricos, comparados con los metales y cerámicos, es su facilidad de fabricación para producir diferentes formas y tamaños (películas, láminas, fibras, etc.), fácil procesamiento secundario, costos razonables y amplio

rango de propiedades mecánicas y físicas. En cuanto a requerimientos exigidos para biomateriales, los polímeros son biocompatibles (no son tóxicos, no producen cáncer, no generan respuesta alérgica), son esterilizables, presentan elasticidad, durabilidad y resistencia adaptables a los diferentes requerimientos de las aplicaciones. Otra característica importante de los polímeros es que permiten la modificación superficial para mejorar su biocompatibilidad e interacción celular (Roldán Vasco, et al 2016).

La biodegradabilidad controlada de algunos polímeros, sumado a su buena compatibilidad y fácil fabricación han hecho de estos materiales una opción excelente para la fabricación de andamios para sistemas de reparación en ingeniería de tejidos, así como en sistemas de liberación de fármacos. Varios tipos de polímeros pueden ser reabsorbibles y fabricados en formas de fibras para aplicaciones de suturas, mallas y diversos productos quirúrgicos (Roldán Vasco, et al 2016).

Los polímeros de origen natural son obtenidos del ser humano, los animales o las plantas, y por su procedencia se caracterizan por tener sitios de reconocimiento biomolecular.

La mayoría de los polímeros naturales son solubles en medios acuosos o hidrofílicos, debido a esto no son apropiados como andamios 3D, por lo cual deben ser convertidos en materiales insolubles en agua mediante reacciones físicas o químicas. Entre los polímeros naturales se encuentran las proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, seda fibroína y elastina); los polisacáridos (glicosaminoglicanos, ácido hialurónico- AH, quitina, quitosano y alginato) (Roldán Vasco, et al 2016).

Un andamio es una estructura donde las células son implantadas o cultivadas, es capaz de soportar la formación de tejido en tres dimensiones; proporciona un almacén y respaldo inicial que facilita el anclaje, la migración y diferenciación celular; sirve como soporte para las células, los factores de crecimiento y otras biomoléculas; permite la difusión de nutrientes celulares y productos expresados; forma la matriz extracelular la cual es la encargada de proveer la integridad estructural del tejido.

El proceso de creación de andamios comienza con la elección de los biomateriales adecuados, que luego sigue con la fabricación del andamio. Durante este proceso, el andamio se somete a modificaciones físicas y/o químicas para cumplir con los requisitos específicos y el tejido creado pueda volverse utilizable para fines de ingeniería de tejidos; después de crear un andamio con las propiedades necesarias, puede poblarse con células y cultivarse *in vitro* hasta que se desarrolle el tejido deseado, o se puede injertar al paciente sin la adición preliminar de células para que las células huésped puedan infiltrarse y crecer en el andamio (Sarvazyan, 2020)

Un andamio ideal debe cumplir con las siguientes características:

- Los biomateriales para fabricar el andamio deben ser compatibles con los componentes celulares de los tejidos diseñados y con las células endógenas en el tejido huésped.
- Proveer apoyo a las células exógenas o endógenas, para unir, crecer y diferenciarse, tanto durante el cultivo *in vitro* como al momento de la implantación *in vivo*.
- Materiales degradables tras la implantación, a una velocidad equivalente a la de la producción de la matriz extracelular por el nuevo tejido en desarrollo.
- Interactuar activamente con los componentes celulares de los tejidos diseñados, y así facilitar y regular su actividad. Los biomateriales pueden activar señales biológicas que pueden mejorar la adhesión celular o señales físicas, que pueden influir en la morfología y alineación celular.
- Debe proporcionar estabilidad mecánica y de forma para defectos que pueda tener el tejido.
- Resistir la manipulación durante el trasplante y deben ser soporte mecánico durante la regeneración tisular.
- Los biomateriales deben dar una estructura suficientemente porosa, que permita el transporte suficiente de nutrientes y metabolitos sin comprometer significativamente la estabilidad mecánica del andamio.
- No debe ser tóxico.

(Roldán Vasco, et al 2016).

Ahora bien, para el desarrollo de un andamio, la elección del biomaterial dependerá del servicio que prestará, ya que este reemplazará completa o parcialmente la función del tejido o de órganos al ser implantado en un sistema o cuerpo vivo.

Para este proyecto de investigación se emplearán como biomateriales polímeros naturales como fibrina, alginato y agarosa para la elaboración de un andamio dérmico con el cual se buscará la epitelización de heridas crónicas. Como ya vimos para este tipo de heridas crónicas es importante mantener un medio húmedo entre el lecho de la herida y la cobertura, favoreciendo y aumentando la velocidad de cicatrización. Winter, en 1962, demostró que, en medio húmedo, las enzimas como las colagenasas y las proteasas capacitan a las células para que emigren, a través de la herida, hacia las áreas húmedas donde hay fibrina. Como epitelización significa emigración celular, el medio húmedo favorece las condiciones fisiológicas para la cicatrización (Guimarães Barbosa, et al 2010).

### 1.7.1. Fibrina

La sangre es un líquido viscoso de color rojizo (a causa de la hemoglobina que contiene) formada por células en suspensión (leucocitos, hematíes y plaquetas) presentes en una solución acuosa (plasma).

Se considera que la sangre está compuesta por plasma/suero (50-55%) y células sanguíneas, que son los glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos).

El plasma es un líquido amarillento que forma parte de la sangre. Está formado por agua (90%), electrolitos, metabolitos, nutrientes, hormonas y una mezcla de proteínas que se dividen en tres grandes grupos: albúminas, globulinas y fibrinógeno. Las proteínas plasmáticas poseen una serie de propiedades funcionales dependiendo de su interacción con el agua; estas propiedades pueden ser aprovechadas con distintos fines. Su capacidad gelificante ha sido de interés en el campo biomédico. El plasma se obtiene cuando a la sangre recién obtenida se le añaden sustancias anticoagulantes, que impiden la formación de redes de fibrina y separación de las células durante los procesos de centrifugación. Una vez añadida la sustancia anticoagulante, se procede a someter a la sangre a un proceso de centrifugación pudiendo separar así el plasma de las células (Ibáñez Antuña, 2013).

El plasma humano puede constituir una alternativa para el desarrollo de geles que puedan aplicarse como soporte para el desarrollo de nuevas pieles con aplicación en tejidos dañados. La principal característica que lo hace interesante es la posibilidad de sintetizar el gel a partir del plasma del propio paciente, lo cual hace prácticamente imposible el riesgo de rechazo. Otros aspectos para tener en cuenta son la facilidad de síntesis de estos geles y la posibilidad del crecimiento de las células adecuadas para su buen funcionamiento (Ibáñez Antuña, 2013).

El fibrinógeno es un dímero formado por tres cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Esta proteína se forma en el hígado y es insoluble tanto en agua como en disoluciones salinas débiles. El fibrinógeno constituye la parte disuelta de la fibrina, sustancia presente en el proceso de coagulación de la sangre (Ibáñez Antuña, 2013); el fibrinógeno puede ser activado mediante una serie de reacciones enzimáticas llamada cascada de coagulación que lo transforman en fibrina, la cual es una red de fibrillas que conforman el coágulo. *In vitro* es posible activar la cascada de coagulación, mediante el empleo de trombina o cloruro de calcio, con el objetivo de generar esa red de fibrillas que podrían ser aprovechadas para el crecimiento celular (ver fig. 9) (Malagón Romero, 2014).

La fibrina es un polímero natural, producto de la hidrólisis del fibrinógeno por la acción enzimática de la trombina (Roldán Vasco, et al 2016); aunque no es un compuesto natural

de la dermis, es la base para la reparación de heridas, ya que actúa como hemostático, y en un primer momento es la matriz extracelular provisional necesaria para que las células inicien el proceso reparador (Reyes Martínez , 2011).

El plasma sanguíneo tiene muchas ventajas en el uso de ingeniería de tejidos ya que es barato, fácil de obtener por medio de los bancos de sangre, tiene propiedades gelificantes y presenta propiedades que pueden ayudar a la síntesis de piel a través de la estimulación de la angiogénesis o la proliferación de los fibroblastos (ver tabla 1) (Ibáñez Antuña, 2013). Además de que la gran experiencia clínica utilizando plasma humano, lo convierte en un material extremadamente seguro (Llames, et al 2006).

Tabla 1. Propiedades y aplicaciones de la fibrina

Propiedades	Aplicaciones
<p>Su estructura molecular espacial genera fibras ramificadas de diferentes dimensiones que le confieren un grado de porosidad, rigidez y elasticidad, propiedades que dependen de factores como temperatura, concentración de iones y otras sustancias plasmáticas.</p> <p>Dadas sus propiedades permite generar procesos de coagulación.</p>	<p>Curación de heridas conocido como sellante de fibrina o adhesivo quirúrgico, que promueve la angiogénesis, la unión celular y la proliferación.</p> <p>El gel de fibrina se puede infiltrar fácilmente por las células, activando la migración celular, proceso conocido como cascada fibrinolítica.</p> <p>Aceleramiento de cicatrización de heridas.</p>

(Roldán, et al 2016)



Fig. 9 Eritrocitos atrapados en una red de fibrina. Foto tomada de Infomedicos

### 1.7.2. Alginato

El alginato es un polisacárido lineal obtenido principalmente de las algas pardas (Roldán, et al 2016). Los alginatos son derivados de la sal del ácido algínico y constituyen largas cadenas de polisacáridos, lo que proporcionan flexibilidad y capacidad gelificante a su estructura (Rastogi, et al 2019). Funcionan principalmente como polímeros iónicos debido a la presencia de cationes divalentes de calcio. Los alginatos son ampliamente utilizados en la fabricación de hidrogeles, debido a la peculiar organización de las cadenas lineales que contienen ácido algínico ( $\beta$ -D-ácido manurónico (M) y  $\alpha$ -L-ácido gulurónico (G) bloques) que concurren al ensamblaje de redes estables tridimensionales reticuladas con alta capacidad de retención de agua, propiedades de hinchamiento adecuadas y liberación molecular. En particular, sólo los bloques G del alginato participan principalmente en el entrecruzamiento intermolecular con cationes divalentes por ejemplo  $Ca^{2+}$  para formar hidrogeles con diferentes propiedades. Sin embargo, las proporciones relativas de los grupos M y G presentes, el peso molecular y la longitud de los bloques, son otros factores que afectan las propiedades físicas del alginato y en última instancia sus propiedades biológicas resultantes en los hidrogeles (Guarino, et al 2018).

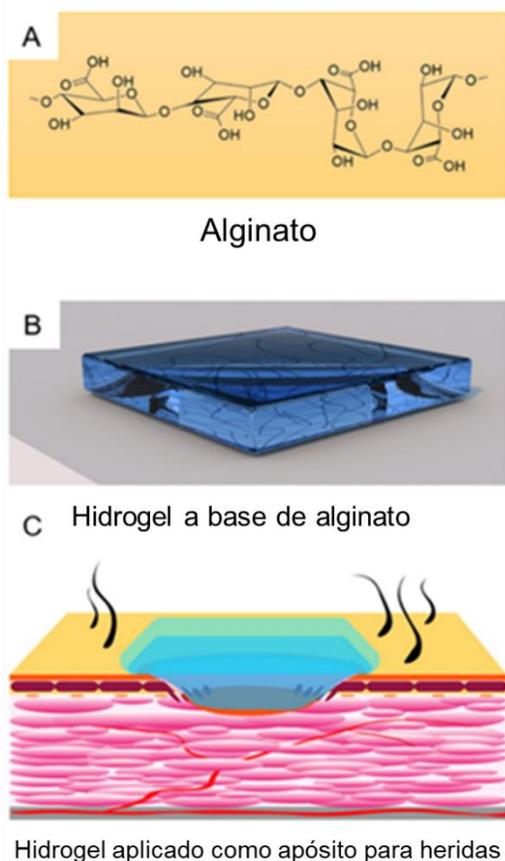


Fig. 10 A) Estructura química del alginato, B) Hidrogel de alginato y C) Hidrogel de alginato aplicado en una herida. Foto tomada de (Zhang & Zhao, 2020).

Sus peculiares propiedades químicas aseguran una compatibilidad total en el microambiente biológico, al minimizar las reacciones inflamatorias después de su administración en el cuerpo (ver tabla 2). Sin embargo, de manera similar a otros hidrogeles biológicamente reconocidos, los geles de alginato tienen una rigidez mecánica muy limitada (Guarino, et al 2018).

Cuando un apósito de alginato está en contacto con una herida, hay un intercambio iónico entre los iones de calcio en el apósito y los iones de sodio en la sangre o el exudado de la herida; cuando este intercambio alcanza un punto donde se han intercambiado suficientes iones de calcio, las fibras de alginato comienzan a hincharse y a disolverse parcialmente formando un gel (Clark, 2018).

Los apósitos avanzados para heridas, incluidos los apósitos de alginato, están diseñados para mantener un ambiente húmedo en el lecho de la herida. Además, los apósitos de alginato ayudan a absorber el exudado de la herida y detener el sangrado en el sitio de la herida (Clark, 2018). Los hidrogeles de alginato pueden absorber 20 veces su propio peso en el exudado de la herida haciéndolos ideales en el uso de heridas con moderada a alta exudación (Kyu Han, 2016).

Tabla 2. Propiedades y aplicaciones del alginato

Propiedades	Aplicaciones
<p>El alginato tiene propiedades hidrofílicas lo que permite crear un ambiente húmedo necesario en el lecho de la herida; es un material no tóxico, biocompatible, biodegradable y bioestable. También el alginato se puede entrecruzar con otros materiales orgánicos e inorgánicos para formar una estructura de red reticulada. Este biomaterial es ecológico y rentable para la elaboración de materiales para el cuidado de heridas ya que puede activar los macrófagos y estimular a los monocitos para producir interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF-<math>\alpha</math>) para acelerar la curación de heridas crónicas.</p>	<p>Los alginatos son ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas pueden ser usados en forma de películas, hidrogeles, nanofibras, gasas y espumas. Los hidrogeles a base de alginato se han utilizado en vendajes de heridas, ingeniería de tejidos, administración de fármacos y materiales de impresión dental o quirúrgicos.</p>

(Zhang & Zhao, 2020) (Varaprasad, et al 2020)

### 1.7.3. Agarosa

La agarosa es un polisacárido biocompatible extraído de las algas marinas rojas que contiene repeticiones de agarobiosa (disacárido de D-galactosa y 3,6- anhidro-L-galactopiranososa), y puede ser preparado como un gel termo reversible. La gelificación de la agarosa va de los 30-40°C y su punto de fusión va de 80-90°C, dependiendo del peso molecular, la concentración y el número de sus grupos laterales. El proceso de gelificación de agarosa ocurre en tres pasos: inducción, gelificación y pseudoequilibrio, donde el enlace de hidrógeno y la interacción electrostática dan como resultado la estructura helicoidal de la molécula de agarosa y luego la formación del gel (Zarrintaj, et al 2018).

La agarosa tiene propiedades autogelificantes, alto contenido de agua y una estructura poro elástica; estas propiedades proporcionan un microambiente adecuado para el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular (ver tabla 3). La mecánica de los hidrogeles de agarosa puede ser ajustada cambiando la concentración, resultando en características similares al tejido deseado (Patino Vargas, et al 2022).

Este polímero natural tiene una estructura similar a la matriz extracelular, permite la adhesión celular y proporciona un intercambio de oxígeno y nutrientes para el crecimiento celular. Además, la agarosa se ha combinado con otros biomateriales lo que permite la generación de andamios biológicos con gran versatilidad hacia tipos específicos de tejidos blandos. Entre otros, los biomateriales de agarosa se han combinado con fibrina para generar piel humana artificial, córnea y mucosa oral (Rastorza Lorenzo, et al 2021).

La agarosa tiene grupos ionizables en su estructura, conocidos como polielectrolitos. Esta característica otorga propiedades sensibles al pH a la agarosa. También presenta actividad de electro-respuesta que afecta la estabilidad de su estructura. Las propiedades termogelificantes de los hidrogeles de agarosa permite que se adapten cuando se mezclan con biomateriales sintéticos para formar redes interpenetrantes y copolímeros (Zarrintaj, et al 2018)

Tabla 3. Propiedades y aplicaciones de la agarosa

Propiedades	Aplicaciones
La agarosa es un polisacárido con buenas propiedades gelificantes, aunque tiene baja actividad biológica y una lenta tasa de degradación que limita su papel en la ingeniería biomédica por lo que es necesario mezclar la agarosa con otros materiales bioactivos. Los hidrogeles de agarosa muestran buena transparencia, fuerza de gel constante y conserva sus propiedades térmicas	La agarosa se ha utilizado en aplicaciones biomédicas para la creación de andamios en la regeneración de piel, cartílago, regeneración ósea y otros tejidos.

## 1.8 Hidrogeles

Los hidrogeles representan redes poliméricas 3D llenas de agua (hasta un 90-99% dependiendo de la concentración del polímero). Por lo tanto, son hidrofílicos y pueden incorporar de forma segura proteínas, células, factores de crecimiento, y otras entidades biológicas.

Por sus propiedades viscoelásticas pueden inyectarse o colocarse directamente en el sitio de la lesión del paciente. Los hidrogeles pueden estar hechos de biomateriales ya sean naturales o sintéticos. Además, se someten a un proceso de gelificación que puede llevarse a cabo por entrecruzamiento ya sea covalente o físico, el entrecruzamiento covalente crea enlaces adicionales entre las cadenas poliméricas (fig.11). El comportamiento de las células (su unión, proliferación y diferenciación) depende en gran medida de las diferentes características del hidrogel incluida la rigidez y elasticidad de este (Sarvazyan, 2020).

Los hidrogeles como soportes para ingeniería de tejidos, actúan como guía para el desarrollo de tejidos *in vitro* e *in vivo*, los polímeros utilizados para la fabricación de los soportes deben asemejar las matrices extracelulares presentes en los tejidos; es por esta razón que los hidrogeles han sido sumamente investigados para este tipo de aplicación, específicamente para reemplazo de tejido blando ya que los hidrogeles presentan la capacidad de retener agua en su estructura polimérica al igual que retienen proteínas bioactivas (Sánchez, et al 2007).

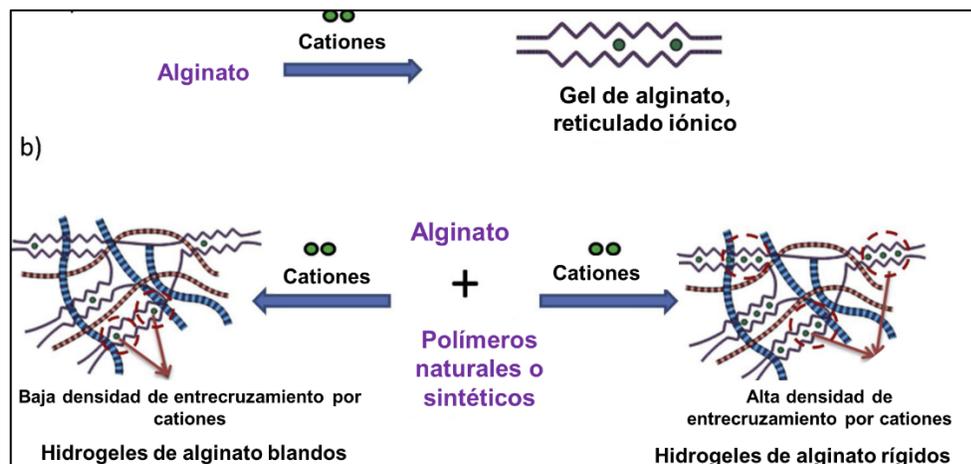


Fig. 11 Las propiedades de los hidrogeles dependen principalmente de su reticulación ya que esto puede cambiar su comportamiento al flujo. Reticulación iónica de: a) un hidrogel de alginato y b) hidrogeles blandos (densidad de reticulación baja, izquierda) a base de alginato e hidrogeles rígidos (densidad de reticulación alta, derecha); las propiedades físicas (blandas o rígidas) de los hidrogeles de alginato se pueden personalizar por medio de la reticulación iónica entre los componentes naturales o sintéticos (Varapasad, et al 2020).

Los hidrogeles usados en ingeniería de tejidos presentan poros, los cuales tienen la funcionalidad de permitir que las células vivas se acomoden adecuadamente o se diseñan para que se disuelvan o degraden, liberando factores de crecimiento y por ende creando poros en los cuales las células puedan penetrar y proliferar. Las ventajas que presentan los hidrogeles es su capacidad de brindar un ambiente favorable para las proteínas, la capacidad de moldearse en diferentes formas y su alta biocompatibilidad; sin embargo, presentan limitaciones como baja resistencia mecánica y dificultad para esterilizar (Sánchez, et al 2007).

Los hidrogeles sólo pueden absorber una cantidad mínima de líquido, pero donan humedad a las heridas secas. Los hidrogeles son permeables al gas y agua. La mayoría de los hidrogeles son casi no adhesivos, por lo que requieren un vendaje secundario.

Los hidrogeles están indicados para heridas de cualquier tipo de espesor con exudado mínimo o moderado, pueden disminuir el dolor y proporcionar almohadillas para disminuir las fuerzas de corte; también son efectivos para ablandamiento de escaras (Kyu Han, 2016).

Debido a la similitud estructural con la matriz extracelular, hoy en día, los hidrogeles se usan ampliamente para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Entre los diversos hidrogeles, el alginato se considera un biomaterial muy útil que ha encontrado numerosas aplicaciones en el campo biomédico debido a sus propiedades favorables, incluida la biocompatibilidad y la facilidad de gelificación (Sarker, et al 2018).

## Capítulo II. Antecedentes

---

En este capítulo se presentan los antecedentes de los diferentes estudios relacionados con el tema de este proyecto. Se analizaron 6 artículos de investigación donde se abordan la elaboración de andamios dérmicos y el uso de los biomateriales de interés; en este caso fibrina, alginato y agarosa.

El uso de fibrina ha demostrado ser un excelente biomaterial para la elaboración de andamios dérmicos ya que distintos estudios demuestran que su utilización promueve la adhesión, activación y proliferación tanto de fibroblastos dérmicos como de queratinocitos.

En un estudio en el que se evaluó el uso clínico de un modelo de piel cultivada en lesiones cutáneas de gran extensión superficial construyeron un equivalente tisular cutáneo compuesta por una capa dérmica conformada por un hidrogel de fibrina sembrado con fibroblastos dérmicos humanos y una capa epidérmica constituida por un cultivo de queratinocitos epidérmicos humanos, en donde se observó no solo una gran actividad proliferativa de los fibroblastos sino también una adhesión de la capa epidérmica la cual estratificó formando un epitelio plano estratificado cornificado (Llames S. y cols. 2006).

Por otra parte, Castell y Herrera evaluaron la velocidad de crecimiento de fibroblastos dérmicos sembrados sobre un hidrogel de fibrina en el que demostraron que en un lapso de 7 días de cultivo los fibroblastos no solo muestran una gran actividad proliferativa, sino que también recuperan su capacidad de síntesis de matriz extracelular (Castell Rodríguez, et al 2008)

Reyes Martínez en 2011 utilizó el mismo andamio de fibrina sembrado con fibroblastos humanos alogénicos como un apósito biológico para tratar úlceras dérmicas, en donde se demostró que el andamio de fibrina mejora la reparación de las heridas en comparación con otros apósitos comerciales ya que aumenta la hemostasia y tiene un efecto protector resultado en la disminución de infección bacteriana.

Estos estudios han permitido demostrar que los andamios dérmicos de fibrina tienen buenas propiedades biológicas para ser utilizados en la ingeniería tisular de piel, pero a pesar de ello, estos son muy friables, difíciles de manipular debido a sus débiles propiedades mecánicas y tienen una baja retención de agua por lo que se han investigado diferentes polímeros naturales que puedan ser implementados a los andamios de fibrina.

Uno de los biopolímeros más estudiados ha sido el alginato debido a sus propiedades como hidrofiliidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, es económico y es muy utilizado en aplicaciones biomédicas para formar hidrogeles y tratar heridas crónicas exudativas.

Otro de los polímeros que se estudia es la agarosa ya que este biopolímero tiene propiedades autogelificantes además de aportar resistencia y consistencia a los andamios y al igual que el alginato es ampliamente usado en aplicaciones biomédicas.

En este sentido (Fernández-González y cols 2016) desarrollaron un equivalente dérmico compuesto por fibrina y fibroblastos en presencia de una solución de agarosa, con lo que se incrementó la resistencia y manipulación, cuando este dispositivo fue aplicado en pacientes con distintos tipos de lesiones se observó una buena reparación tisular sin que se evidenciaran reacciones adversas del tipo irritación o alergia al aplicarse directamente por vía tópica.

Patino-Vargas y cols. (2022) evaluaron las propiedades viscoelásticas de hidrogeles plasma-agarosa (PA) con diferentes concentraciones de agarosa: 0%, 0.5%, 1%, 1.5% y 2% y su influencia en el número de células y la actividad metabólica de los fibroblastos dérmicos humanos sembrados en estos hidrogeles; se evaluó la estructura de los hidrogeles a través de microscopía electrónica de barrido y la retención de líquidos. En cuanto al comportamiento de los fibroblastos, la expresión de los filamentos de f-actina fue mayor en las concentraciones más bajas de agarosa. La morfología típica fusiforme de los fibroblastos predominaba en todas las regiones de los hidrogeles al 0% y 0.5% de concentración PA. Por otro lado, las propiedades viscoelásticas demuestran que la rigidez de los hidrogeles derivados del plasma se puede ajustar aumentando la concentración de agarosa. En cuanto al hinchamiento de los hidrogeles (retención de líquidos) se obtuvo que el hidrogel con 0% de PA tuvo menor índice de hinchamiento que el de 1%, 1.5% y 2%; la adición de agarosa condujo a un aumento de la relación de hinchamiento. El número de células se cuantificó con la técnica DAPI (núcleos celulares) y la cuantificación indicó que el número de células disminuía a medida que aumentaba la concentración de agarosa.

Por otra parte la utilización de alginato también ha sido evaluada como componente de andamios dérmicos, en este sentido Saikhim Panawes y cols. (2017) evaluó el uso de gasas impregnadas con soluciones de alginato de sodio a distintas concentraciones y evaluó la tasa de hinchamiento, el microambiente húmedo y las propiedades de coagulación de la sangre, también evaluó la actividad antimicrobiana del andamio suplementado con un extracto de *Garcinia mangostán*. En estos andamios evaluó la actividad antibacteriana y la biocompatibilidad *in vitro* de queratinocitos y fibroblastos dérmicos humanos. Demostraron que los fibroblastos y queratinocitos se mantienen en buenas condiciones, sin embargo, al aumentar la concentración de alginato, se reportó un incremento de la respuesta inflamatoria, un menor ambiente húmedo y resultados de coagulación sanguínea bajos.

En 2023, Mao y cols., elaboraron un hidrogel compuesto de alginato de sodio, arginina e iones de zinc (SA-Arg- $Zn^{2+}$ ); en donde evaluaron sus propiedades fisicoquímicas como son, la morfología del andamio por microscopía electrónica de barrido, su tasa de hinchamiento, ángulo de contacto del agua, además hicieron estudios antibacterianos a través del método de difusión en agar; también se evaluó la hemólisis y hemostasis y la proliferación celular y la citotoxicidad. Este hidrogel mostró una alta capacidad de hinchamiento lo cual es benéfico para absorber los exudados de las heridas; por otra parte, el hidrogel (SA-Arg- $Zn^{2+}$ ) presentó una mayor eficacia en la cicatrización de heridas ya que la tasa de cierre de

las heridas alcanzó el 100% en 14 días. El hidrogel reguló a la baja la expresión de factores inflamatorios (TNF- $\alpha$  e IL-6) y promovió los niveles del factor de crecimiento (VEGF y TGF- $\beta$ 1), además de que el hidrogel redujo la respuesta inflamatoria de la herida y aceleró la re-epitelización, angiogénesis y la cicatrización de la herida.

Tabla 4. Antecedentes

Autor y año	Artículo	¿Qué se hizo?	Conclusiones
<p><b>Llames S. y cols. 2006</b></p>	<p><i>Clinical Results of an autologous engineered skin</i></p>	<p>Modelo de piel completa artificial a base de fibrina que contenía epidermis y dermis; esta piel fue diseñada para tratar lesiones epiteliales graves. En este andamio dérmico se sembraron fibroblastos y queratinocitos.</p>	<p>El plasma sanguíneo es un producto barato obtenido de los bancos de sangre, el cual es aprobado y evita la transmisión de algún virus de la sangre lo que lo hace seguro y es un excelente andamio dérmico ya que hace crecer rápidamente a los fibroblastos y queratinocitos.</p>
<p><b>Reyes Martínez 2011</b></p>	<p><i>Estudio ciego aleatorizado y controlado de la eficacia de un apósito biológico dérmico en el tratamiento de úlceras venosas</i></p>	<p>En este estudio se comparó la eficacia de un apósito dérmico <i>in vitro</i> a partir de fibroblastos alogénicos en una matriz de fibrina contra un hidrocoloide en pacientes con úlceras venosas de miembros pélvicos. Se compararon los centímetros que disminuye el área de la herida tratada con el apósito de fibrina contra el área de la herida tratada con un hidrocoloide.</p>	<p>Ambos grupos demostraron reducción en la superficie de la úlcera al final del tratamiento; en el grupo de pacientes del apósito dérmico la reducción de área de la herida fue del 68% mientras que en el grupo de apósito hidrocoloide la reducción de la herida fue del 71.4%. Hubo un aumento en el tejido de granulación y de islas de epitelio, disminución de fibrina, menor dolor y exudado en los pacientes donde se aplicó el apósito dérmico.</p>
<p><b>Fernández González y cols. 2016</b></p>	<p><i>Estudio piloto de tolerabilidad cutánea de láminas de fibrina-agarosa en voluntarios sanos</i></p>	<p>Los apósitos de fibrina se caracterizan por promover la proliferación y la adhesión celular, sin embargo, la adaptación clínica de este tipo de sustitutos presenta limitaciones basadas en su escasa consistencia y resistencia que dificulta su manipulación. Es por ello que en este estudio se combinó la fibrina con la agarosa para crear un andamio más resistente; además se aplicó en 7 voluntarios sanos para evaluar su tolerabilidad cutánea.</p>	<p>El uso de láminas de fibrina-agarosa en voluntarios sanos no presenta reacciones adversas del tipo irritación o alergia al aplicarse directamente por vía tópica. Además de que la combinación de fibrina-agarosa se presenta como el biomaterial idóneo para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana.</p>

<p><b>Saikhim Panawes y cols. 2017</b></p>	<p><i>Antimicrobial mangosteen extract infused alginate-coated gauze Wound dressing</i></p>	<p>Se evaluaron la tasa de hinchamiento, el microambiente húmedo y las propiedades de coagulación de la sangre de una gasa impregnada con una solución de alginato a distintas concentraciones</p> <p>Por otro lado, a una gasa con 0.5% de alginato se le agregó el extracto de la cáscara de la fruta garcinia mangostán evaluando la actividad antibacteriana y se hicieron ensayos <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad con queratinocitos y fibroblastos dérmicos humanos.</p>	<p>Al aumentar la concentración de alginato, se reportó que la gasa mostró una mayor proporción de hinchazón, un menor ambiente húmedo y resultados de coagulación sanguínea bajos.</p> <p>Al agregar a la gasa el extracto MT, se demostró que mejora la eficacia antimicrobiana en comparación con el control.</p>
<p><b>Patino Vargas y cols. 2022</b></p>	<p><i>Viscoelastic properties of plasma-agarose hydrogels dictate favorable fibroblast responses for skin tissue engineering applications</i></p>	<p>Este estudio reporta la caracterización de las propiedades viscoelásticas de hidrogeles plasma-agarosa (PA) con diferentes concentraciones de agarosa: 0%, 0.5%, 1%, 1.5% y 2% y su influencia en el número de células y la actividad metabólica de los fibroblastos dérmicos humanos sembrados en estos hidrogeles; se evaluó la estructura de los hidrogeles a través de microscopía electrónica de barrido y la retención de líquidos.</p>	<p>En cuanto al comportamiento de los fibroblastos, la expresión de los filamentos de actina-f fue mayor en las concentraciones más bajas de agarosa. La morfología típica fusiforme de los fibroblastos predominaba en todas las regiones de los hidrogeles al 0% y 0.5% de concentración PA. Por otro lado, las propiedades viscoelásticas demuestran que la rigidez de los hidrogeles derivados del plasma se puede ajustar aumentando la concentración de agarosa. En cuanto al hinchamiento de los hidrogeles (retención de líquidos) se obtuvo que el hidrogel con 0% de PA tuvo menor índice de hinchamiento que el de 1%, 1.5% y 2%; la adición de</p>

			<p>agarosa condujo a un aumento de la relación de hinchamiento. El número de células se cuantificó con la técnica DAPI (núcleos celulares) y la cuantificación indicó que el número de células disminuía a medida que aumentaba la concentración de agarosa.</p>
<p><b>Ganzhe Mao y cols. 2023</b></p>	<p><i>Preparation and evaluation of a novel alginate-arginine-zinc ion hydrogel film for skin wound healing</i></p>	<p>En este estudio se elaboró un hidrogel mezclando alginato de sodio, iones de zinc y arginina (SA-Arg-Zn<sup>2+</sup>); se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas como son, la morfología del andamio por microscopía electrónica de barrido, su tasa de hinchamiento y ángulo de contacto del agua. También se hicieron estudios antibacterianos a través del método de difusión en agar, además de evaluar: la hemólisis y hemostasis, la proliferación celular y la citotoxicidad</p>	<p>Este hidrogel presenta una alta capacidad de hinchamiento lo cual es benéfico para absorber los exudados de las heridas, además el hidrogel (SA-Arg-Zn<sup>2+</sup>) muestra una mayor eficacia en la cicatrización de heridas ya que la tasa de cierre de las heridas alcanzó el 100% en 14 días. El hidrogel regula a la baja la expresión de factores inflamatorios (TNF-α e IL-6) y promueve los niveles del factor de crecimiento (VEGF y TGF-β1), además de que el hidrogel reduce la inflamación de la herida y acelera la re-epitelización, angiogénesis y la cicatrización de la herida</p>

## Capítulo III. Contexto general de la investigación

---

### 3.1 Planteamiento del problema

Debido a la alta incidencia de heridas crónicas en nuestro país, es necesaria la creación de un andamio dérmico que ayude a la cicatrización y sea accesible para los pacientes que tienen este tipo de lesiones.

Con los andamios de fibrina se tienen buenos resultados en términos de la adhesión y proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo*, también muestran una excelente respuesta en términos de reparación de lesiones cutáneas de distinta etiología, sin embargo sigue siendo necesario incrementar sus capacidades de retención de agua, resistencia a la fractura y manipulación, por lo que es necesario evaluar la combinación otros polímeros que se puedan combinar con la fibrina y que no modifican sus propiedades biológicas, como lo son el alginato y la agarosa

### 3.2 Hipótesis

Previamente se ha evaluado la gran capacidad de adhesión y proliferación de fibroblastos dérmicos humanos sembrados sobre un andamio de fibrina obtenida de plasma sanguíneo humano. También se ha demostrado que la adición de alginato y agarosa modifica las propiedades físico-mecánicas del andamio.

Debido a lo antes expuesto, si el andamio de fibrina es suplementado con alginato y agarosa, este será más manipulable y sus propiedades físico-mecánicas hablando macroscópicamente, incrementarán; además se mantendrán las propiedades biológicas en términos de la proliferación celular y actividad secretora de los fibroblastos dérmicos.

### 3.3 Objetivos

#### 3.3.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento (viabilidad, proliferación y síntesis de procolágena tipo I) de los fibroblastos dérmicos humanos sembrados en un andamio de fibrina suplementado con distintas concentraciones de alginato y agarosa.

#### 3.3.2 Objetivos específicos

- Construir un andamio dérmico de fibrina suplementado con diferentes concentraciones de alginato y agarosa.
- Examinar la morfología del andamio mediante Microscopia Electrónica de Barrido.

- Obtener fibroblastos dérmicos humanos a partir de una biopsia de piel de un donador sano.
- Analizar la supervivencia y proliferación de los fibroblastos humanos sembrados en el andamio de fibrina con concentraciones crecientes de alginato y agarosa a 1,2 y 4 semanas.
- Contrastar a través de los cortes histológicos la actividad celular y morfología de los fibroblastos a las 4 semanas mediante la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica dirigida contra Procolágena tipo I y las tinciones histológicas de H&E y Tricrómico de Masson.

### 3.4 Diseño experimental

Para comenzar con este proyecto de investigación, primero se hizo un ensayo prospectivo en el que se evaluaron distintas concentraciones de alginato y agarosa para suplementar al andamio de fibrina; en el que se determinó que las concentraciones experimentales de alginato y agarosa fueran de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%.

Posteriormente se realizaron cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos, para ello se tomó una biopsia de piel de un donador sano a la cual se retiró la lámina epidérmica y posteriormente se procesó el tejido dérmico mediante digestión enzimática para así obtener una suspensión celular.

Para los andamios de fibrina, alginato y agarosa con células, se construyeron cuatro diferentes hidrogeles con las cuatro concentraciones con las que se trabajó y cada hidrogel tuvo un volumen de aproximadamente 10 ml. Además, se hizo un control el cual sólo fue elaborado de fibrina con las células y este sólo fue evaluado hasta el final del experimento es decir, hasta las 4 semanas.

Se hicieron 3 cajas de 24 pozos una caja para cada periodo de tiempo que se trabajó (1,2 y 4 semanas) y cada caja tuvo 3 repeticiones de cada concentración, haciendo un total de 9 pozos por concentración.

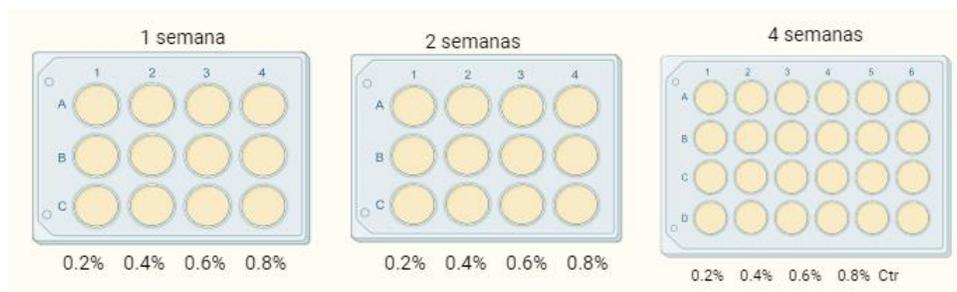


Fig. 12 Diseño experimental de las placas de cultivo con los hidrogeles a las diferentes concentraciones

Para el ensayo prospectivo utilizaremos la inmunohistoquímica DAPI (Santa Cruz, número de catálogo sc-3598) que es una tinción de ácido nucléico fluorescente azul que se une al ADN bicatenario de las células y parece asociarse al ADN rico en adenina y timina. DAPI se utiliza en citometría de flujo para medir el contenido de ADN nuclear o para clasificar cromosomas aislados y también es útil para la detección microscópica de núcleos y ADN nuclear en las células normales y apoptóticas.

Para la evaluación de la proliferación celular se va a utilizar el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD para células de mamíferos con el número de catálogo L3224, el kit vida y muerte es un ensayo de dos colores rápido y sencillo para determinar la viabilidad de las células en una población basada en la actividad de la esterasa y la integridad de la membrana plasmática. Este kit discrimina rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM verde fluorescente para indicar actividad de esterasa intracelular y homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática.

Para la evaluación de la actividad celular se hizo técnica histológica contra H&E y tricrómico de Masson esto para evidenciar los fibroblastos y poder observar la estructura de las células. También se hizo inmunohistoquímica contra procolágena tipo I usando el kit ab64409 de la marca abcam esto para marcar el propeptido amino terminal localizado intracelularmente en las células productoras de procolagena tipo I.

Morfológicamente el andamios se evaluó a través de Microscopía electrónica de barrido y se evaluó su porosidad.

El siguiente esquema muestra de manera general los experimentos que se llevarán a cabo

Esquema 1. Diseño experimental



## 3.5 Materiales y métodos

### 3.5.1. Toma de biopsia y cultivo de fibroblastos

Para el aislamiento de las células de interés, en este caso los fibroblastos dérmicos humanos se tomó una biopsia de piel de un donador sano que con un consentimiento informado accedió a que se realizara dicho procedimiento. Previa a la toma de la muestra, se realiza la técnica antiséptica sobre el área de donación de piel, posteriormente se limpia bien la zona con suero fisiológico para eliminar todo resto de antiséptico que podría dañar el cultivo de las células, se anestesia el área a través de una inyección subcutánea de lidocaína con epinefrina y con un punch de 5 mm de diámetro se toma un fragmento de piel que contenga epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo; la biopsia de piel se coloca en un tubo que contiene medio de transporte (15 ml de solución Hank's estéril suplementado con 150 microlitros de antibiótico) y se procede a suturar la herida del donador. Inmediatamente después de haber tomado la biopsia se lleva el tejido a la campana de flujo laminar para trabajar en condiciones estériles; se decanta el tejido eliminando el medio de transporte y por 10 segundos aproximadamente y agitando el tubo, se hacen 3 lavados con etanol al 70%, después se lava 2 veces el tejido con solución Hank's y de la misma forma se agita el tubo, con ayuda de unas pinzas estériles se pone el tejido en una caja petri; bajo el microscopio óptico, y con un bisturí se retira el tejido adiposo y se fragmenta la biopsia en 4 partes, cada uno de los fragmentos se colocan en un tubo y se agregan 10 ml de una solución de dispasa (1.2 unidades/ml o 1mg/ml en medio plano) esto para romper la membrana basal; se deja el tejido en refrigeración por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se pasan los fragmentos de tejido a una caja petri y se evalúa la actividad de la dispasa observando en el microscopio óptico; se detiene la actividad de la dispasa agregando medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino y antibiótico, con una aguja para insulina y con ayuda de un bisturí se separan ambas capas de la piel ( epidermis y dermis), teniendo ambas capas separadas colocamos la dermis (capa de interés) en una caja petri de plástico y le agregamos 10 ml de la enzima colagenasa (2mg/ml en medio plano) y se incuba a 37°C por 30 minutos, cada 10 minutos hacer pipeteo con mucho cuidado de no despegar las láminas dérmicas de la caja petri (repetir esto 3 veces), este sobrenadante se pasa a un tubo de 15 ml y se lleva a centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos decantar y al botón de células que quede se le agrega 1 ml de medio de cultivo para fibroblastos y se hace conteo celular, las láminas epidérmicas se pasan a una nueva caja petri de plástico y se adhieren bien a la caja, agregar el mililitro del botón de células anterior y complementar con más medio de cultivo, aproximadamente 8 ml; se incuba a 37°C, 5% de  $CO_2$  y cada 48 horas revisar el cultivo celular y hacer cambio de medio hasta que obtengamos una confluencia del 80% al 90% de los fibroblastos.

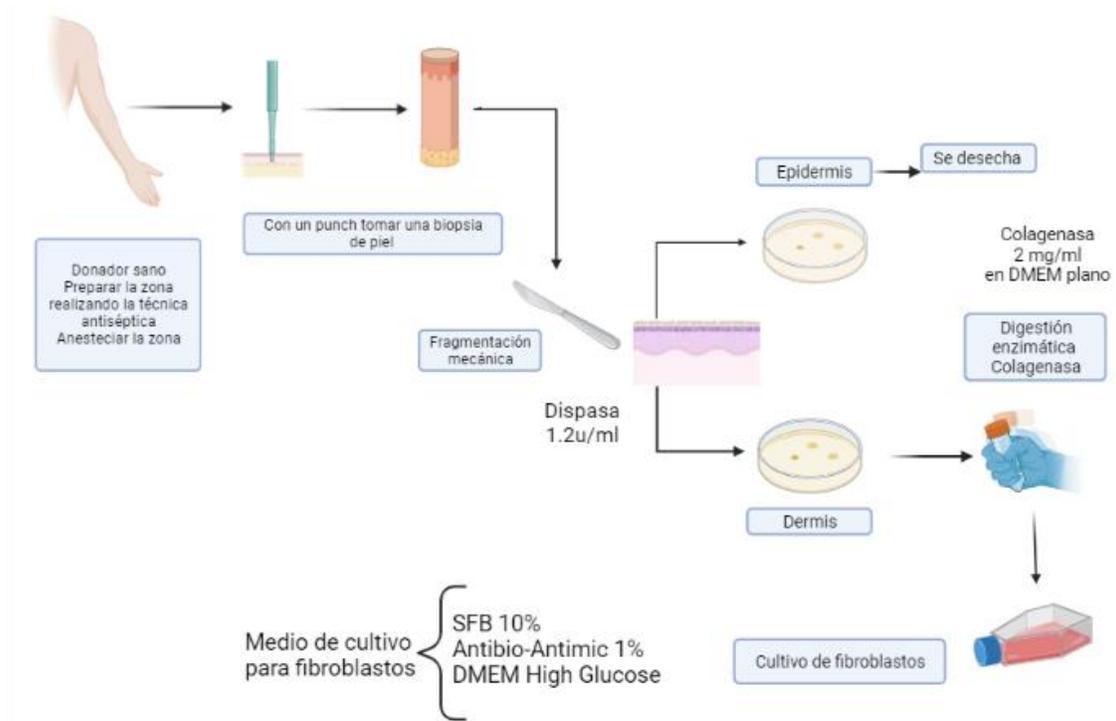


Fig. 13 Esquema representativo de la toma de biopsia de piel para el aislamiento y cultivo de fibroblastos

### 3.5.2. Suspensión celular

Ya que la población celular está a una confluencia del 80% al 90% se procede a sacar las células, primero se observan las células en el microscopio para asegurarnos de que el cultivo esté en óptimas condiciones y no haya contaminación, después retiramos el medio de cultivo y se hacen 2 lavados con solución Hank's (3ml c/u), después se colocan 2 ml de tripsina/EDTA y se incuba por 3 minutos, transcurrido el tiempo observar nuevamente las células en el microscopio y dar pequeños golpes a la caja para despegar las células y asegurar así que las células están en suspensión; se inactiva la tripsina agregando 3ml de DMEM suplementado, esta suspensión celular se lleva a centrifugar a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos, se decanta y se conserva el botón celular, resuspender el botón celular en 2 ml de medio y hacer conteo celular en la cámara de Neubauer.

### 3.5.3. Construcción del andamio dérmico

Para la construcción del andamio dérmico primero se pesó en una balanza analítica los gramos de alginato (Aldrich) y agarosa (Sigma) correspondientes a los porcentajes de las concentraciones con las cuales se va a trabajar, colocar estas mezclas en frascos y dentro de la campana de flujo laminar a condiciones estériles se agrega 1200 microlitros de una solución NaCl que está al 0.9% y 160 microlitros de ácido tranexámico, después los frascos se llevan al autoclave para esterilizar y pasado este tiempo, se lleva nuevamente el frasco a la campana para continuar con las condiciones estériles y colocarlos sobre la parrilla de agitación y calentamiento a baño maría para conservar la temperatura (30°C a 750 rpm); poco a poco se agrega el plasma el cual es donado por un banco de sangre de una clínica del ISSSTE ubicada en Iguala Guerrero hasta un total de 6.8 ml de plasma manteniendo la temperatura y agitación constante. En las cajas de 24 pozos se agregan 2 ml de la solución  $CaCl_2$  al 1% y ya que esta bien homogenizada y sin grumos la mezcla del plasma, alginato y agarosa agregar rápida y simultáneamente a cada pozo esta mezcla junto con la suspensión celular (10,000 células por pozo) y agitar para que todo se mezcle de manera uniforme. De cada concentración se tendrán 9 pozos y 3 cajas para los tres diferentes tiempos a los que se trabajarán (1,2 y 4 semanas).

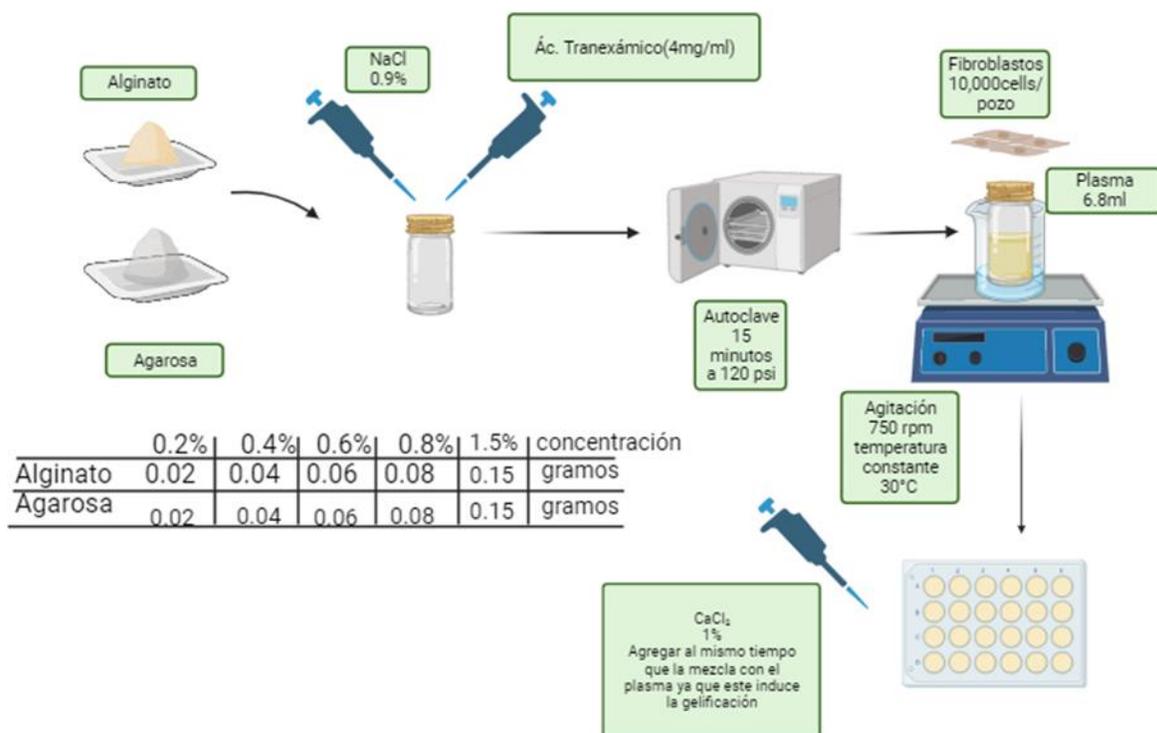


Fig. 14 Esquema representativo de la elaboración de los andamios de fibrina, alginato y agarosa con fibroblastos dérmicos.

#### 3.5.4. Procesamiento de las muestras para histología

Transcurridos los tiempos de cultivo de los andamios se procede a hacer técnica histológica para H&E y Tricrómico de Masson; se desmoldan los andamios de la caja de pozos y se fragmentan con ayuda de un bisturí en porciones pequeñas, después se lavan con agua y posteriormente con PBS (dos veces cada uno) esto para retirar el medio, luego los fragmentos se pasan a un frasco que contiene una solución de formol amortiguador y se dejan ahí durante 6 horas para fijarlos. Pasado el tiempo de fijación, se sacan los fragmentos y se colocan en los cassettes de inclusión dándoles una orientación correcta dependiendo de la región que se va a observar; teniendo listos los cassettes se comienza con el proceso de deshidratación pasando las muestras por el tren de alcoholes y xilol de la siguiente manera: alcohol al 70% por 15 min, alcohol al 80% por 15 min, alcohol al 90% por 15 min, alcohol absoluto 1 por 30 min, alcohol absoluto 2 por 30 min, xilol 1 por 30 min, xilol 2 por 30 min y después se hacen dos baños de parafina de una hora cada uno. Teniendo listos los bloques de parafina, se hacen los cortes de las muestras en el microtomo y se procesan para después ser teñidos con hematoxilina y eosina.

#### 3.5.5. Procesamiento de las muestras para citotoxicidad/viabilidad, vida/muerte.

Esta prueba fue realizada sólo para los andamios a las 4 semanas de cultivo y los andamios del ensayo prospectivo. Se sacan los andamios de la incubadora y se observan bajo el microscopio para cerciorarnos que están en buen estado; es decir, no hay contaminación; después se retira el medio de cultivo y se seccionan los andamios en fragmentos pequeños. Se prepara la solución de calceína y homodímero de etidio como se menciona a continuación: para 1 ml de solución Hank's, se agrega 0.5 µl de calceína y 2 µl de homodímero de etidio y a cada pozo donde se tienen las muestras se le agrega 100 µl; se incuba por 20 a 30 minutos y posteriormente se agrega de 500 a 600 µl de Hank's.

#### 3.5.6. Procesamiento de las muestras para DAPI

Esta prueba de inmunohistoquímica sólo fue realizada en los cortes de los ensayos prospectivos es decir los andamios que tenían una concentración de 1.5%. Se comienza a desparafinar las muestras, para ello los cortes que están en los portaobjetos se meten en la estufa (30 a 40 min.), posteriormente se llevan estas laminillas al proceso de desparafinación y rehidratación pasando las muestras por el tren de xiloles, alcoholes y agua destilada; después las muestras se llevan a una cámara húmeda esto para que no se vaya a secar el anticuerpo y se mantenga. Se hace una solución de PBS+ tritón al 0.1% de concentración; el PBS va a hidratar la muestra y el tritón ayuda a abrir las membranas celulares, posteriormente se cubren las muestras con la solución PBS+ tritón y se deja actuar por 10 minutos. Para preparar DAPI, se coloca 999.84µL de PBS+0.16µL de DAPI. Regresando a las muestras, se retira la solución de tritón y se hacen tres lavados con PBS (3 minutos c/u); secamos el exceso de PBS cuidando de no tocar los tejidos, poner el

anticuerpo DAPI que se había preparado anteriormente e incubar por 30 minutos a 37°C; transcurrido este tiempo se lavan las laminillas con PBS (3 lavados de 3 min c/u). Para hacer el montaje y poder poner el cubreobjetos a las laminillas, se hace una mezcla de glicina+PBS (1:9) y se pone una gota de esta mezcla para poder adherir el cubreobjetos y así poder observar las muestras en el microscopio.

### 3.5.7. Procesamiento de las muestras para procolágena 1.

Esta inmunohistoquímica fue realizada para los grupos experimentales a las 2 y 4 semanas de cultivo. Comenzar con el proceso de desparafinación de las muestras, para ello los cortes que están en los portaobjetos se meten en la estufa (30 a 40 min.), posteriormente se llevan estas laminillas por el tren de xiloles, alcoholes y agua destilada, después se pasan a un buffer de citratos esto se hace para recuperar los antígenos; en seguida, las muestras se llevan a la olla de presión y esperar que la temperatura llegue a los 120°C y tomar 3 minutos, pasado este tiempo las laminillas se enfrían en baño de agua fría por 10 minutos y luego se lava cada laminilla con agua destilada. Posteriormente se pone sobre cada laminilla una solución de peróxido de hidrógeno+PBS a una concentración del 3% y se deja actuar por 10 minutos y pasado este tiempo se lavan las muestras 2 veces con PBS, dejar reposar las laminillas con PBS durante 3 minutos (repetirlo 3 veces); realizado esto, se escurren muy bien las laminillas y se le agrega a cada laminilla una mezcla de PBS+ albúmina 0.1%+ tween 20 al 0.05% de concentración (0.02g de albúmina mp biomedical para 20 mL de PBS más 10µL de tween 20) y esto se deja reposar por 10 minutos. Lo siguiente es preparar el anticuerpo procolágena 1 en una concentración 1:200; se preparan 250 µL en total en una solución de PBS+albúmina.

Se ordenan y etiquetan las laminillas dependiendo de los grupos experimentales y se marcan las regiones que serán positivas (P) y negativas (N): positivas serán aquellas que llevarán el anticuerpo y las negativas sólo llevarán PBS+albúmina. Una vez hecho lo anterior, incubar las muestras a 4°C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo, hacer 3 lavados con PBS de 3 minutos c/u, luego se le pone a cada muestra una solución PBS+albúmina y se deja actuar por 10 minutos; mientras transcurre este tiempo se procede a preparar el anticuerpo secundario Anti-rat 1:100 en PBS+albúmina. Regresando a las muestras, se retira el PBS+albúmina y escurrir muy bien las laminillas, después poner el anticuerpo secundario en las laminillas 25 µL en c/u y se deja reposar de 30 minutos a 1 hora a 37°C.

Lo siguiente es preparar un vector HRP (estrepto abidina peroxidasa) 1:1200 diluido en PBS, se pone el vector HRP sobre las muestras y se incuba a 37°C por 30 minutos y después se va a retirar con PBS más 3 lavados de 3 minutos cada uno y hecho esto se deben escurrir muy bien las laminillas.

Lo siguiente es hacer el proceso de revelado con Diaminobencidina (Biocare Medical, código BDB2004L). Para preparar este cromógeno se hace una solución en Buffer (500µL buffer+ 15µL Diaminobencidina) colocar sobre las muestras 25µL de la solución de diaminobencidina y dejar actuar durante 5 minutos, transcurrido este tiempo enjuagar las laminillas con agua destilada y después las laminillas se van a teñir con hematoxilina.

Posteriormente llevar las muestras al proceso de deshidratación; pasando por el tren de deshidratación de alcoholes y xiloles.

Como último paso se montan las muestras para poder ser observadas en el microscopio.

### 3.5.8. Procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica de Barrido

Para llevar las muestras a microscopía electrónica de barrido, es necesario darles cierto tratamiento y se debe preparar una solución de cacodilatos más glutaraldehído que está al 25%, en total se preparan 10ml de cacodilatos.

Transcurrido los tiempos de cultivo de los andamios, se sacan las muestras y se fragmentan en porciones pequeñas, se lavan con agua y PBS (dos veces) para retirarles el medio de cultivo, después se lavan los fragmentos con la solución de cacodilatos y posteriormente se pasan las muestras a un frasco que contiene la solución de cacodilatos más glutaraldehído para fijarlos por 3 horas. Pasado este tiempo, se sacan los fragmentos y se dejan en un frasco con cacodilatos solamente y se conservan en refrigeración.

## 3.6 Universo

Se van a elaborar cuatro hidrogeles suplementados con alginato y agarosa a las diferentes concentraciones (0.2%, 0.4%, 0.6% y 0.8%), en cada andamio se van a sembrar un total de 10,200 fibroblastos humanos.

## 3.7 Variables

Variables Independientes: Concentración de alginato y agarosa, para este experimento se utilizaron cuatro concentraciones 0.2%, 0.4%, 0.6% y 0.8%

Variables Dependientes: La actividad celular (viabilidad, proliferación y síntesis de matriz) se verá afectada en los andamios en una relación inversamente proporcional con la concentración de alginato y agarosa.

### 3.8 Análisis estadístico

De los resultados obtenidos a partir de las pruebas histológicas con la tinción H&E se va a hacer un conteo celular a través de los diferentes campos captados en las fotomicrografías a los 1, 2 y 4 semanas de cultivo celular; teniendo estos datos se procede a hacer un tratamiento cuantitativo y su análisis estadístico a través de una prueba de varianza ANOVA de dos vías y una prueba Tukey de múltiple comparación. Los resultados fueron procesados y graficados en el software GraphPad Prism 7.

Para calcular la porosidad y tamaño de poro de los andamios se utilizó el software ImageJ esto para darle un tratamiento digital a las fotografías tomadas en SEM y así poder calcular el área porosa y el tamaño de los poros. Posteriormente y teniendo los datos arrojados por ImageJ, en GraphPad Prism 7 se hacen el análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía y una prueba de Tukey de múltiple comparación con una  $P < 0.05$ .

## Capítulo IV Resultados

### Cultivo de Fibroblastos Dérmicos Humanos.

A partir de voluntarios sanos mediante donación se obtuvieron diversas biopsias de piel delgada de la región interna del antebrazo, utilizando un punch de 5 mm de diámetro. Las biopsias fueron procesadas en condiciones estériles en campana de flujo laminar, donde fueron troceadas e incubadas en una solución de Dispasa para separar enzimáticamente la lámina epidérmica de la dermis y posterior digestión enzimática de la MEC con una solución de colagenasa, finalmente fueron mantenidas en cultivo hasta alcanzar confluencia y expandidas hasta alcanzar la densidad celular necesaria, en la figura 15 se muestran imágenes representativas del procesamiento y obtención del cultivo de fibroblastos.

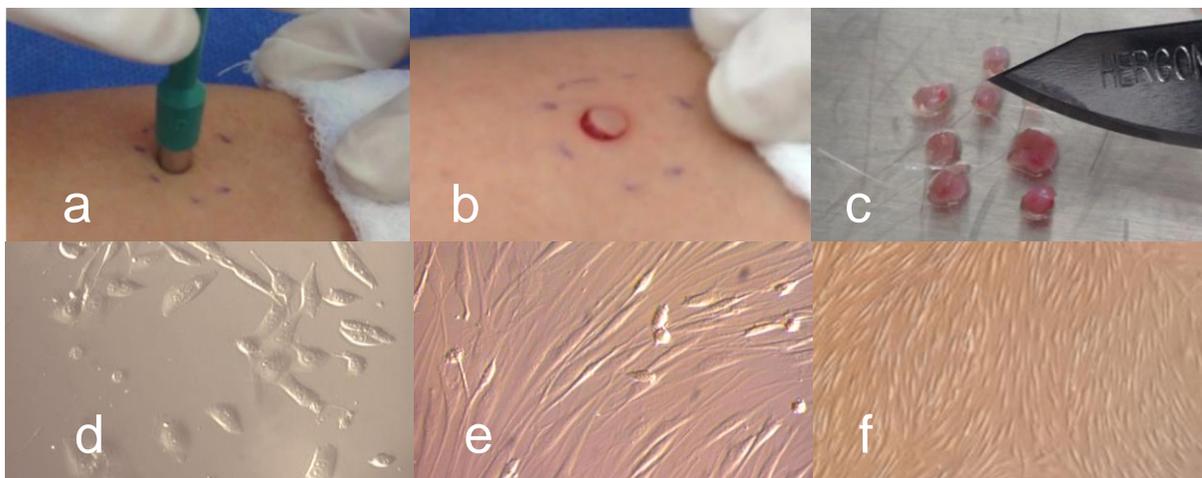


Fig. 15 Cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos, a-b) Toma de muestra en condiciones asépticas. c) Fragmentación de biopsia en condiciones de esterilidad. d-f Cultivo primario de fibroblastos humanos en distintos tiempos. Nótese el cambio morfológico de las células y el incremento en el número celular. Microscopía de Contraste de Fases Inter Diferencial.

### Construcción del andamio Fibrina/Alginato/Agarosa

Para determinar el rango de concentración de alginato y agarosa para la construcción de los andamios de los grupos experimentales y evidenciar si pudiera tener un efecto citotóxico, se realizó un estudio prospectivo en el que evaluamos una alta concentración 1.5% de alginato y agarosa.

En este estudio se encontró que a la concentración de 1.5% de alginato y agarosa, macroscópicamente se forma un hidrogel sólido que al ser desmoldado retiene los líquidos, no pierde la forma del contenedor y es altamente manipulable (fig. 16 a y b)

Sin embargo cuando se analiza esta concentración de alginato y agarosa, en cortes histológicos, se observa que el andamio muestra un predominio de zonas en donde el material conformado por alginato y agarosa se dispone formando grandes agregados mientras que la fibrina se encuentra formando pequeños y delgados fascículos de fibras dispersos entre el material de alginato y agarosa, por otra parte se puede evidenciar la presencia de espacios o burbujas, las cuales se forman durante el proceso de mezclado y que posiblemente debido a la alta viscosidad del compuesto quedaron enclaustradas durante la gelificación (fig. 16 c).

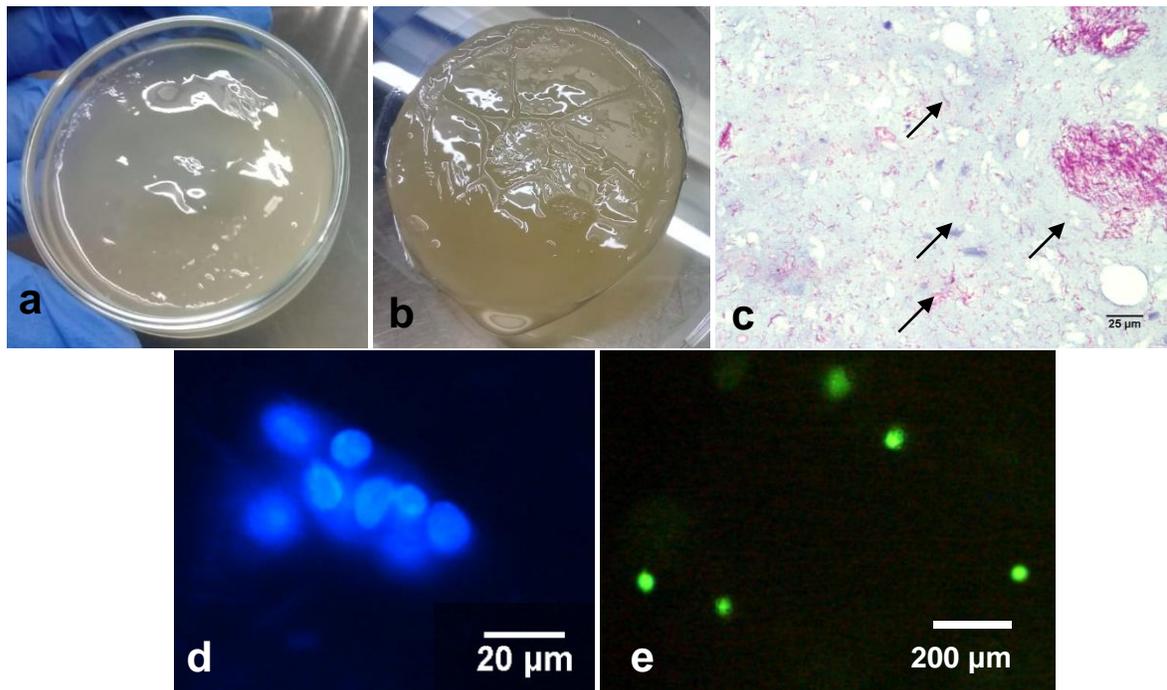


Fig. 16 Andamios de Fibrina alginato y agarosa 1.5% de concentración. (a-b) Imágenes macroscópicas de los hidrogeles en donde se puede observar la retención de agua y la alta consistencia del andamio. c) Corte histológico teñido con H-E en el que se observan las fibras de fibrina formando pequeños y dispersos fascículos irregulares. d) Fibroblastos teñidos con tinción nuclear DAPI, se observan un cúmulo de fibroblastos cuyos núcleos celulares se aprecian íntegros. e) Cultivo de fibroblastos teñidos con calceína /homodímero de etidio, se aprecian células vivas con tinción fluorescente en verde lo que significa vitalidad, sin embargo, tienen una morfología esferoide debido a que no muestran proyecciones citoplásmicas.

Para evaluar la viabilidad celular de los fibroblastos sembrados en dichos andamios se realizaron cultivos a cuatro semanas y posteriormente fueron procesados con la tinción nuclear DAPI y el kit de citotoxicidad vida y muerte.

En estos cultivos se observó que con esta alta concentración (1.5%) de alginato y agarosa, los fibroblastos se mantuvieron vivos como se puede apreciar en las fotomicrografías de fluorescencia (fig. 16 d y e), sin embargo no adquirieron una morfología fusiforme y tampoco proliferaron, lo cual fue atribuido a que al tener un mayor porcentaje de alginato y agarosa que de fibrina posiblemente los ligandos de unión ofrecidos por la fibrina al estar dispersos en la abundante matriz de alginato y agarosa no permite una adecuada adhesión intercelular que favorezca la adhesión y proliferación celular.

Con la finalidad de encontrar un rango de concentración en el que hubiera un adecuado comportamiento de los fibroblastos se realizó otra curva de concentración utilizando 0.2%, 0.4%, 0.6 % y 0.8% de alginato y agarosa. En esta curva se observó que la solidez y retención de agua disminuyó directamente proporcional con la concentración de alginato y agarosa, es decir que conforme menos alginato y agarosa menor es la retención de agua y menor el mantenimiento de la forma macroscópica (ver fig.17). En todos los grupos de este rango de concentración se observaron de manera dispersa grupos de fibroblastos con aspecto fusiforme (fig.17 e).

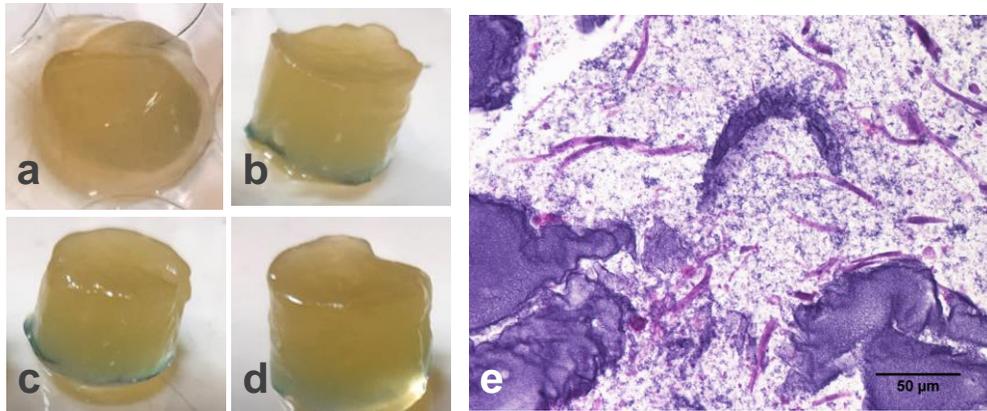


Fig. 17 Andamios de fibrina, suplementados con alginato y agarosa a) 0.2%; b) 0.4%; c) 0.6% y d) 0.8% Note como los andamios de menor concentración de agarosa alginato pierden mayor cantidad de agua y no mantienen la forma macroscópica. e) Corte histológico teñido con H-E en donde se aprecian fibroblastos con aspecto fusiforme.

## Morfología del Andamio

Con la finalidad de evaluar el efecto de la adición de alginato y agarosa al andamio de fibrina se tomaron muestras que fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido y de ellas se analizó tanto el porcentaje de porosidad como el tamaño de poros encontrados en las distintas concentraciones.

En las micrografías (ver fig. 18) se puede apreciar que, en el andamio construido exclusivamente con fibrina, las fibras protéicas se polimerizan formando una red laxa en donde los espacios que quedan entre las fibras, conocidos como poros, se comunican en todas direcciones. Esta disposición reticular, permite no solamente un gran flujo de líquidos a través del andamio sino también que las células puedan anclarse y emitir proyecciones citoplásmicas sobre este reticulado, lo que favorece la adhesión, proliferación, migración y activación celular; como se ha demostrado previamente.

En todos los andamios que fueron suplementados con alginato y agarosa se observó que en los espacios existentes entre la red de fibrina se depositó una mezcla de alginato y agarosa dando un aspecto de estructura laminar. Conforme se incrementó la concentración de alginato y agarosa mayor fue la proporción de zonas con estructuras laminares.

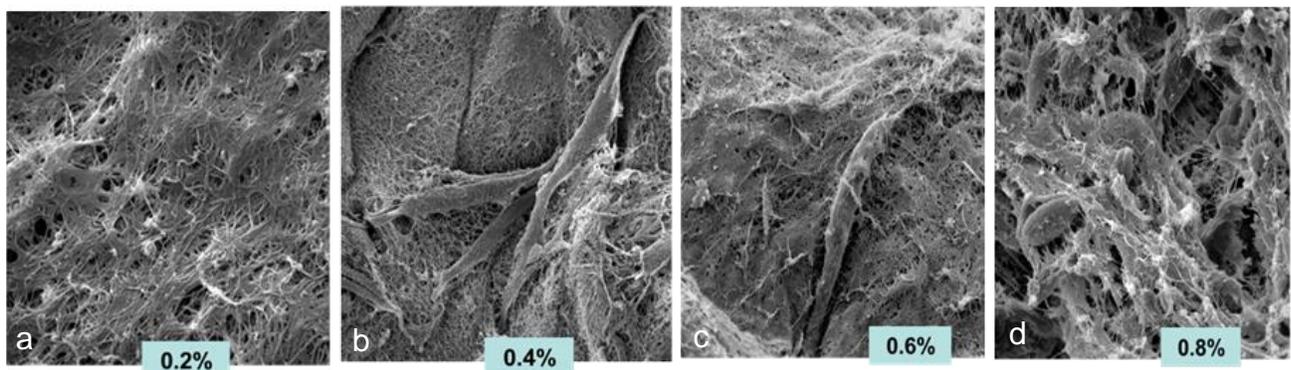


Fig. 18 Micrografías de MEB de andamios de fibrina suplementados con distintas concentraciones de alginato y agarosa. Note el aspecto reticular laxo del andamio construido exclusivamente con fibrina. En los andamios suplementados con alginato y agarosa se observa una conformación laminar, misma que ocupa mayor cantidad de espacios conforme se incrementa la concentración de alginato y agarosa.

Mediante el uso del software de análisis morfométrico Image Pro-plus, se evaluó tanto el tamaño de poro (espacio interfibrilar) como el porcentaje de porosidad del andamio, es decir se cuantificó el área ocupada por fibras y el área ocupada por espacios interfibrilares (poros).

El análisis morfométrico reveló que el tamaño de poro guarda una relación inversamente proporcional con la concentración de alginato y agarosa utilizado en la construcción del andamio. En las concentraciones de 0.2% y 0.4% se encontró en promedio tamaños de poro de 4.3  $\mu\text{m}$  y 4.1  $\mu\text{m}$  de diámetros, en estas concentraciones no se demostró una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, en las concentraciones de 0.6% y 0.8% en promedio evidenciaron un tamaño de poro de 2.2  $\mu\text{m}$  y 2.1  $\mu\text{m}$  respectivamente y en estas concentraciones si se demostró diferencias significativas con las concentraciones de 0.2% y 0.4% ( $p < 0.005$ ).

De igual manera, cuando analizamos el porcentaje de porosidad de los andamios, se encontró un comportamiento similar. En promedio los valores del porcentaje de área de porosidad fueron de 0.13%, 0.22%, 0.05% y 0.09% para los grupos experimentales de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8% respectivamente. El análisis estadístico reveló que la disminución de porosidad fue estadísticamente significativa en las concentraciones de 0.6% y 0.8% (ver fig.19) ( $p < 0.05$ ).

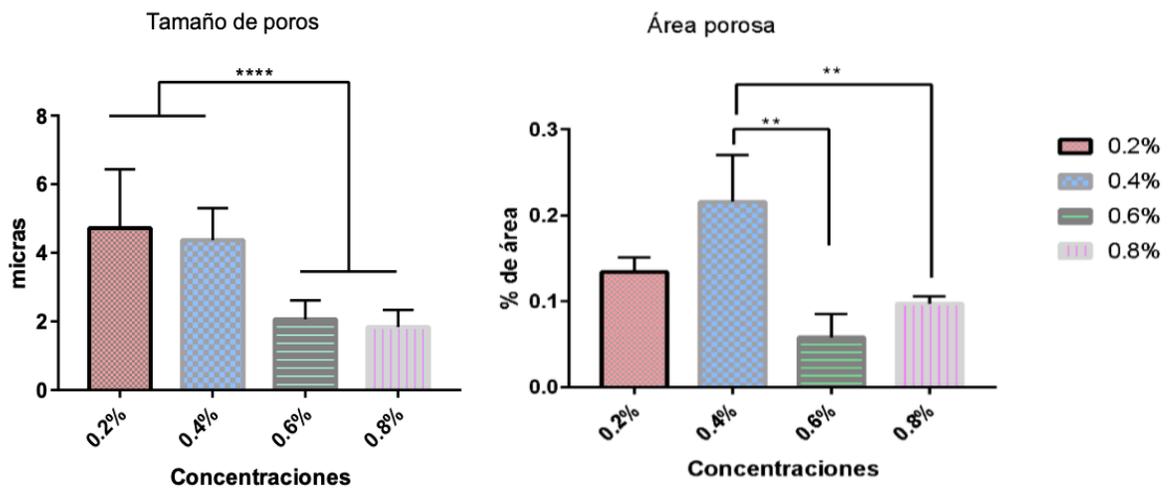


Fig. 19 Análisis morfométrico de porosidad del andamio fibrina, alginato y agarosa. En el análisis estadístico encontramos que el incremento de concentración de alginato y agarosa disminuye tanto en tamaño de poro, como el área de porosidad. En las concentraciones de 0.6 y 0.8 % se demostró una mayor disminución cuya diferencia fue estadísticamente significativa con respecto a las concertaciones de 0.2 y 0.4%.

## Evaluación de citotoxicidad en fibroblastos dérmicos.

Con la finalidad de demostrar que el andamio de fibrina, alginato y agarosa no tiene un efecto citotóxico sobre la población celular se sembraron fibroblastos humanos dérmicos sobre los andamios de las distintas concentraciones experimentales y se mantuvieron en cultivo durante un período 4 semanas y al transcurso del tiempo se realizó un ensayo de citotoxicidad con el análisis de vida y muerte (calceína/homodímero de etidio).

Como se puede observar en las fotomicrografías, en todos los grupos experimentales se encontraron numerosos campos con fibroblastos teñidos con calceína, lo que nos indica que la combinación de los biomateriales empleados en la construcción del andamio, no ejercen un efecto citotóxico sobre la población de fibroblastos dérmicos. También se pueden apreciar escasas y dispersas células teñidas en rojo con el homodímero de etidio, representando células muertas o en proceso de muerte.

En los ensayos de citotoxicidad, siempre encontramos numerosas células de aspecto fusiforme formando cúmulos o colonias (ver fig. 20), lo que nos permite inferir, hasta este momento, que las células no solo se están anclando adecuadamente al andamio sino que están recuperando su actividad proliferativa y posiblemente capacidad de síntesis.

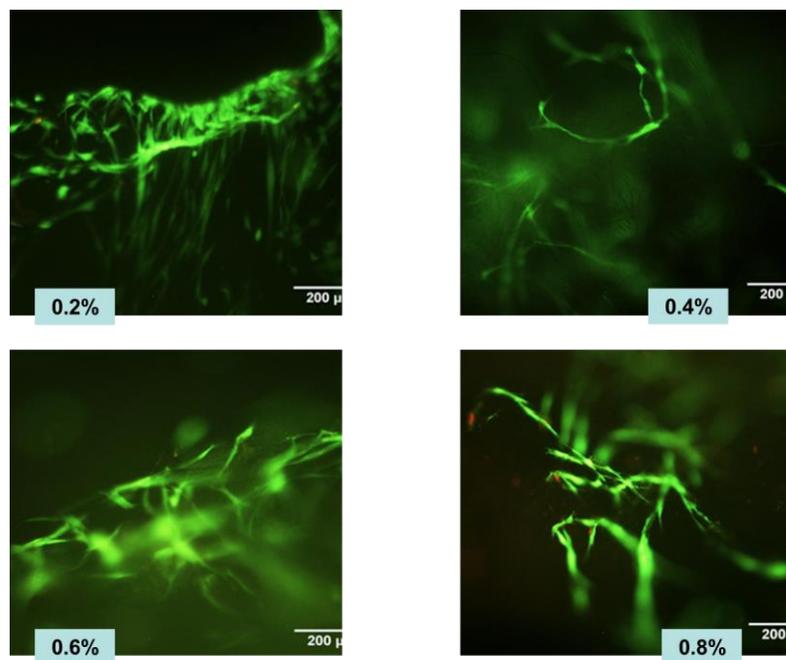


Fig. 20 Evaluación de citotoxicidad de fibroblastos dérmicos sembrados sobre el andamio de fibrina, alginato y agarosa. Cultivos de fibroblastos sembrados sobre el andamio fibrina/alginato/agarosa después 4 semanas, note como los fibroblastos muestran un aspecto fusiforme con largas y delgadas proyecciones citoplásmicas, las células muestran una disposición irregular y en diferentes planos del andamio, note también que las células forman cúmulos o colonias de distinto tamaño. (Microscopía de fluorescencia (verde= células vivas [Calceína] rojo= células muertas [etidio])).

## Proliferación de fibroblastos dérmicos en los andamios de fibrina alginato y agarosa.

Con la finalidad de demostrar que los fibroblastos dérmicos son capaces de proliferar en el andamio fibrina/alginato/agarosa se realizaron cultivos de fibroblastos durante 1, 2 y 4 semanas en las distintas concentraciones experimentales, y posteriormente fueron procesados mediante técnica histológica en parafina y teñidos con H-E (ver fig.21).

En todas las concentraciones se observó un comportamiento similar, en el que con el paso del tiempo la densidad celular fue incrementándose.

Al realizar un análisis estadístico se encontró que en las concentraciones de 0.2 y 0.4% existe una diferencia significativa en el número de células entre la primer y cuarta semanas, mientras que en las concentraciones de 0.6 y 0.8% aunque no existe significancia se puede observar la misma tendencia lo largo del tiempo evaluado (ver gráfica de fig.21).

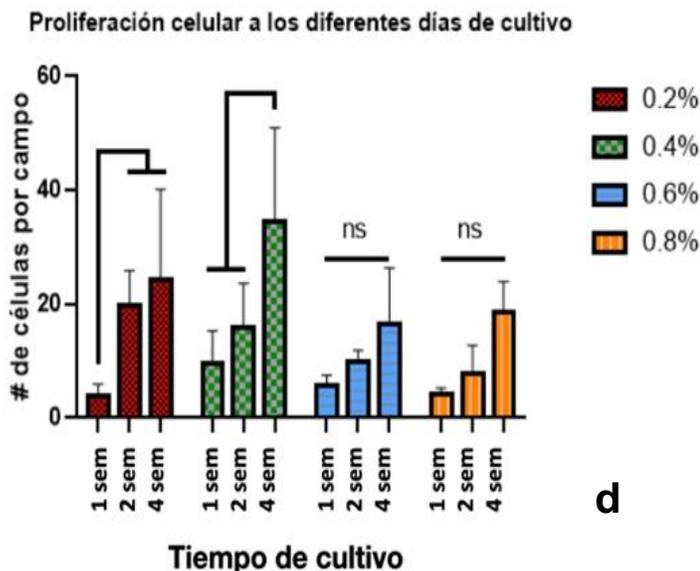
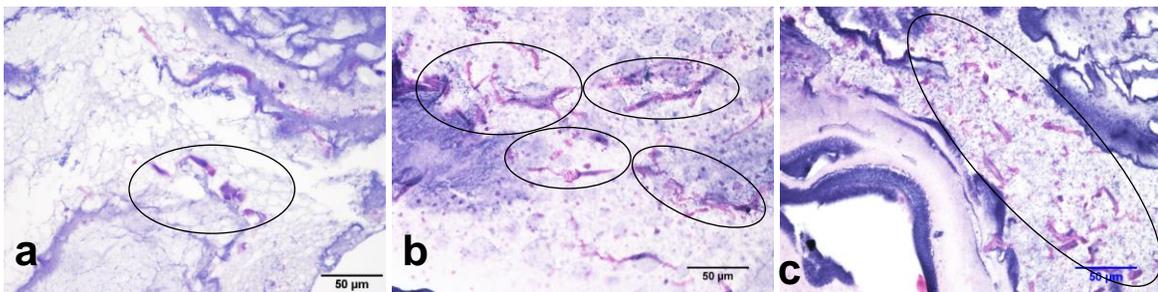


Fig. 21. Evaluación de la proliferación de fibroblastos sembrados sobre el andamio de fib/alg/aga.

Imágenes representativas de los cortes histológicos obtenidos de cultivos de fibroblastos sobre el andamio. H-E a) 1 semana, b) 2 semanas c) 4 semanas; Note el incremento de las células delimitadas por las elipses. d) Análisis de la densidad celular para cada concentración en los diferentes tiempos de cultivo. Note que en todos los grupos experimentales la densidad celular muestra el mismo patrón de comportamiento ascendente.

Con la finalidad de evidenciar en qué concentración ocurre la mayor proliferación de fibroblastos en el periodo evaluado, se realizó un análisis en el que se compararon la densidad celular en cada punto de la curva de tiempo (1 semana, 2 semanas y 4 semanas) entre las distintas concentraciones (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%).

Como se puede apreciar en las fotomicrografías, en las concentraciones de 0.2 y 0.4% existe una mayor densidad celular en comparación con las concentraciones de 0.6 y 0.8%, este patrón de comportamiento se observó en los tres puntos de tiempo establecidos siendo mayor la diferencia a la cuarta semana de cultivo (ver fig. 22).

Este patrón de comportamiento de los fibroblastos puede relacionarse con los hallazgos encontrados en la microscopía electrónica de barrido, donde evidenciamos que con el incremento en la concentración de alginato y agarosa la morfología del andamio se modifica, cambiando el arreglo reticular por uno laminar, por lo que al ser más compacto el andamio en las concentraciones de 0.6 y 0.8 posiblemente exhiba menos sitios de unión para las integrinas de los fibroblastos disminuyendo su adhesión y proliferación.

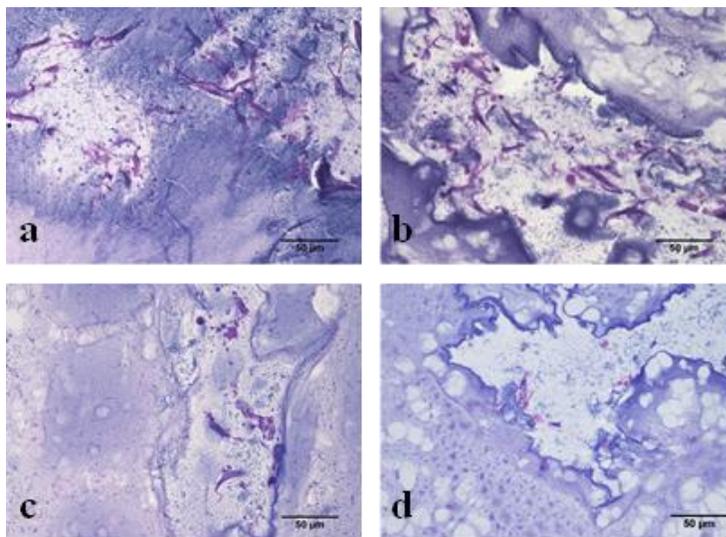
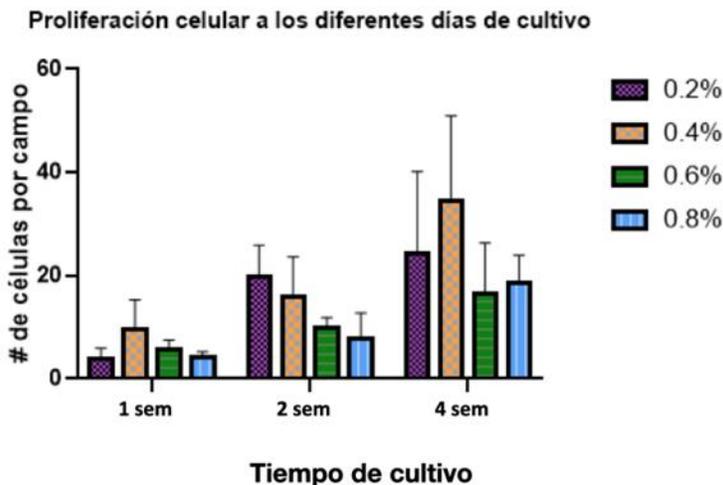


Fig. 22 Comparación de la densidad de fibroblastos en las distintas concentraciones a través del periodo de tiempo establecido. Imágenes representativas de los cortes histológicos obtenidos de cultivos de fibroblastos sobre el andamio. H-E a) 0.2%, b) 0.4%, c) 0.6% y d) 0.8%. Note que en los campos histológicos de las concentraciones 0.2 y 0.4% se aprecia un mayor número de células en comparación con las concentraciones 0.6 y 0.8%. e) análisis estadístico de la densidad celular para cada tiempo de cultivo comparando entre las distintas concentraciones experimentales. Note que en todos los puntos de la curva temporal la mayor densidad celular siempre se observó en las concentraciones de 0.2 y 0.4%, siendo considerablemente mayor la densidad celular observada a los 28 días en la concentración de 0.4%.



## Síntesis y secreción de colágena I.

Con la finalidad de demostrar que los fibroblastos recuperan su capacidad de síntesis al ser sembrados sobre el andamio, se evaluó la expresión de procolágena I mediante inmunohistoquímica y también el depósito de colágena en la matriz, mediante la tinción Tricrómico de Masson.

Después de 4 semanas de cultivo en todas las concentraciones experimentales se evidenció la expresión de procolágena tipo I, mostrando un marcaje en el citoplasma de los fibroblastos, (tinción café por Diaminobenzidina, ver fig. 23 a). Cuando se analizó el depósito de colágena tipo I en la matriz extracelular mediante la tinción "Tricrómica de Masson" se evidenció la presencia de fibras de colágena (fibras en tinción azul, ver fig. 23 b) formando fascículos de distinto grosor dispuestas irregularmente entre la matriz del andamio alrededor de los cúmulos de fibroblastos.

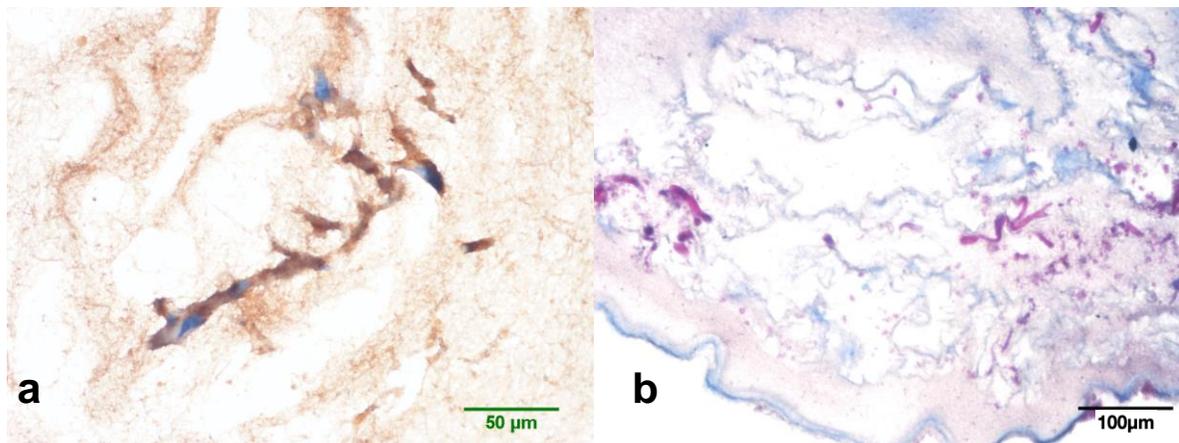


Fig. 23. Evaluación de la síntesis y secreción de colágena. En las siguientes fotomicrografías podemos observar en un corte procesado por inmunohistoquímica (a) la marca café teñida con diaminobenzidina demostrando la expresión de la proteína procolágena tipo I en el citoplasma de los fibroblastos. En (b) podemos apreciar un corte a menor magnificación teñido con Tricrómico de Masson en donde las fibras de colágena se tiñen selectivamente de azul. Note que se forman fascículos de distan grosor y disposición.

## Capítulo V Discusión y Conclusiones

---

### **Propiedades del andamio de fibrina morfología y retención de agua**

En el plasma sanguíneo anticoagulado, al ser incubado a 37°C en presencia de una solución de cloruro de calcio, se reactiva la cascada de coagulación, en donde el fibrinógeno plasmático es transformado en fibrina, la cual tiene una gran capacidad de polimerización formando redes tridimensionales, en donde se pueden depositar células y proteínas (Ibáñez Antuña, 2013), por lo que el uso de plasma sanguíneo en ingeniería de tejidos es ampliamente aceptado para la construcción de andamios tridimensionales tipo hidrogel (Llames, et al 2006). Los hidrogeles de fibrina muestran una estructura en microscopía electrónica de barrido similar a un retículo tridimensional, en donde dependiendo de la concentración de fibrina presente en el plasma sanguíneo, puede variar el tiempo de gelificación, el grado de reticulación y por tal la rigidez del andamio (Ibáñez Antuña, 2013).

Cuando se utilizan distintos polímeros para construir andamios compuestos, como en este caso fibrina, alginato y agarosa, el tipo y magnitud de interacciones (hidrofóbicas, estequiométricas y covalentes) entre las moléculas de los distintos materiales, pueden ser decisivas para determinar el tipo de estructura formada y sus propiedades físicas, las cuales pueden ir desde cambios en la hidrofiliidad y el arreglo tridimensional del polímero (Zhang & Zhao, 2020).

Los andamios a base de fibrina plasmática muestran una estructura reticular cuyas fibras tienen un diámetro de 100nm en promedio y se encuentran con disposición irregular en distintas direcciones, formando numerosos poros (espacios interfibrilares) llegando a tener porosidades alrededor del 20% (Patino Vargas, et al 2022) (Castell Rodríguez, et al, 2008). Cuando la fibrina plasmática se polimeriza en combinación con agarosa, el porcentaje de porosidad y tamaño de poros disminuyen en relación directamente proporcional con la concentración de agarosa empleada (Patino Vargas, et al 2022). En este proyecto se encontró un comportamiento similar en cuanto al patrón morfológico del andamio, donde conforme se incrementa la concentración disminuye no solo el tamaño de los poros, sino también el porcentaje de porosidad; sin embargo el andamio elaborado en este proyecto al contar no sólo con agarosa, sino también con alginato, y al considerar que el alginato al ser un polisacárido formado por bloques lineales aniónicos y que al agregar cationes divalentes como el calcio, conduce a una interacción de alta afinidad con sus monómeros, creando una estructura como de carcasa (Ganzhe, et al 2022). El andamio compuesto de Fib/Alg/Aga elaborado en este proyecto mostró no solo una disminución en el tamaño de poro y la porosidad, sino que además se perdió la estructura fibrilar mostrando un arreglo de zonas laminares, lo cual puede deberse por una parte a la combinación en el proceso de polimerización de ambos materiales resultando en láminas de alginato/agarosa que se encuentran encapsulando a las fibras de fibrina, la estabilidad y tipo de estas interacciones podrían revelarse mediante otros estudios como la espectroscopia de Fourier de Infrarrojo

(FTIR) en donde se podría demostrar la presencia de interacciones covalentes o no, entre las distintas moléculas del andamio.

Por otra parte al suplementar al andamio de fibrina con los polisacáridos alginato y agarosa, se está adicionando a la estructura una gran cantidad de sitios posibles para que se formen enlaces covalentes entre ellos dos y así formar estructuras de mayor estabilidad, además de numerosos sitios para formar puentes de hidrógeno lo que resulta en una estructura con mucho mayor hidrofiliidad y por tanto retención de agua o líquidos en el hidrogel, lo anterior es compatible con los resultados de este proyecto en donde se observa este comportamiento, a mayor concentración, mayor retención de agua y rigidez, además de la estructura observada en microscopía electrónica de barrido.

### **Comportamiento celular**

Tomando como punto de referencia el estudio de Patino Vargas, et al (2022) donde evaluaron el comportamiento de fibroblastos sembrados dentro de un andamio de plasma agarosa, demostraron que la suplementación del andamio con agarosa no tiene actividad citotóxica ya que no se observaron células muertas o en proceso de muerte, y las células presentes en el andamio retuvieron su actividad metabólica, incluso en algunas concentraciones la actividad fue mayor, sin embargo ellos también demostraron que el incremento en la concentración de agarosa indujo una menor densidad celular en los distintos tiempos de cultivo, una menor expresión de actina-f y un predominio de células de morfología esferoide, lo que indirectamente indica que en altas concentraciones de agarosa los fibroblastos aunque se mantienen vivos y metabólicamente activos, no tienen una morfología y actividad de células proliferativas y secretoras de matriz, lo cual puede ser consecuencia de la falta o disminución de ligandos para sus integrinas.

Los resultados obtenidos son compatibles con lo mencionado anteriormente. En términos de citotoxicidad demostramos que el andamio en todas las concentraciones experimentales no indujo un incremento en el número de células muertas como lo demostraron los ensayos de Vida-Muerte y DAPI, donde la mayoría de las células fueron calceína positivas, HD-etidio negativas, DAPI positivas.

En cuanto a la morfología también se demostró que a altas concentraciones de alginato y agarosa (1.5%) los fibroblastos al ser sembrados dentro del andamio, no son capaces de recuperar la morfología ahusada, incluso después de largos periodos de cultivo (4 semanas), lo que indirectamente puede estar evidenciando una pérdida o disminución en la remodelación del citoesqueleto de actina, ya que los fibroblastos al no tener una señal de adhesión membranal suficiente, no se desencadenan las cascadas de señalización intracelular relacionadas con la síntesis y polimerización de actina-F. y las correspondientes proyecciones citoplásmicas. En concentraciones menores (0.2 y 0.4%) fue en donde se observaron una mayor cantidad de células fusiformes, lo cual puede deberse a que al haber

mayor proporción de fibrina que de alginato y agarosa a estas concentraciones el número de ligandos para los receptores de membrana de los fibroblastos sea mayor desencadenando una síntesis y reorganización de los filamentos de actina.

En términos de proliferación, los resultados de densidad celular a lo largo del tiempo indican que conforme se incrementa la concentración de alginato y agarosa, el número fibroblastos presentes dentro del andamio es menor, lo cual como ya se mencionó no se debe a muerte celular, sino a una menor tasa de proliferación con respecto a lo observado en andamios contruidos únicamente con fibrina, lo cual puede estar relacionado nuevamente con las interacciones entre las células y el andamio, donde las altas concentraciones de alginato y agarosa no ofrezcan tantos ligandos para las proteínas membranales de los fibroblastos.

Finalmente, en términos de síntesis y depósito de colágena los resultados son compatibles con la literatura en el sentido de que no solamente son células metabólicamente activas, sino que después de 4 semanas de cultivo en el andamio, los fibroblastos recuperan su actividad sintética como lo pudimos demostrar en los ensayos de inmunohistoquímica contra procolágena 1, y también recuperan su capacidad de secreción y depósito de colágena 1 sobre el andamio, como se puede evidenciar con la tinción Tricrómico de Masson.

## **CONCLUSIONES.**

De este trabajo experimental se puede concluir que el hidrogel de fibrina tiene las condiciones idóneas para hacer crecer fibroblastos dérmicos humanos y ser empleado en el tratamiento de heridas crónicas; además de que la fibrina es un material fácil de obtener, es barato y estudios posteriores indican que es seguro ya que no transmite enfermedades; sin embargo, al formar un hidrogel con débiles propiedades mecánicas, se ha optado por suplementarlo con polímeros que le den una mayor resistencia y pueda ser manipulado de mejor manera por los profesionales de la salud pero que al mismo tiempo se mantengan las propiedades biológicas de las células.

De los experimentos realizados se puede concluir que la adición de alginato y agarosa a un hidrogel de fibrina sí modifica las propiedades mecánicas del andamio, y aunque no se hicieron pruebas mecánicas como tal, se pudo observar macroscópicamente un hidrogel de consistencia sólida y fácil de manipular por lo que se recomienda que en estudios posteriores se puedan determinar y estandarizar las propiedades mecánicas de estos hidrogeles con la finalidad de evaluar su uso como diversos dispositivos médicos, distintos a los equivalentes cutáneos.

El alginato y la agarosa al ser polímeros naturales con propiedades físico-químicas semejantes a la matriz extracelular permiten no sólo dar una mejor consistencia a este

dispositivo, sino que también permiten el crecimiento y proliferación de los fibroblastos dérmicos humanos sembrados en él es por ello que son biopolímeros idóneos para ser utilizados en ingeniería de tejidos.

La suplementación con alginato y agarosa a grandes concentraciones disminuye la actividad proliferativa y secretora de los fibroblastos, por lo que para el uso de este andamio como un apósito biológico para el tratamiento de heridas crónicas cutáneas la mejor concentración es la de 0.4%, ya que dando prioridad a las propiedades biológicas, este fue el hidrogel que tuvo una mayor proliferación celular en el tiempo y mejoró notablemente la manipulación del dispositivo, haciéndolo más sólido y fácil de implantar.

## Bibliografía

---

- Acosta , A. G. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica* , 26-33.
- Borges, E. (2005). Tratamiento tópico de úlceras venosas: proposta de uma diretriz baseada em evidências. .
- Brüel, A., Christensen, E., Qvortrup, K., Geneser, F., & Trantum-Jensen, J. (2012). *Geneser. Histología*. Médica Panamericana.
- Caplan, A. (2000). *Diseños de ingeniería de tejidos para el futuro: nuevas lógicas, viejas moléculas*.
- Casado, F., García , H., Hernandez Patiño , I., Rossani , G., & Guevara Mendoza , D. (2020). Análisis del potencial de innovación en apósitos para tratar heridas crónicas en la ciudad de Lima Perú. *Facultad de Medicina Humana URP*, 657-661.
- Castell Rodríguez, A. E., & Herrera Enríquez, M. Á. (2008). Construcción de un equivalente tisular cutáneo . *XXII Congreso Nacional de Anatomía, Sociedad Mexicana de Anatomía*.
- Chen, Q., Liang, S., & Thouas, G. (s.f.). *Science Direct*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967001200069X>
- Clark, M. (2018). Alginatos en apósitos y manejo de heridas. En B. Rehm , & M. Moradali , *Alginatos y sus aplicaciones biomédicas*. Singapur: Serie Springer en Ciencia e Ingeniería de Biomateriales.
- Colorado, A. C., Agudelo, C. A., & Moncada , M. E. (2013). Análisis de Biomateriales para uso de ingeniería de tejidos de piel: revisión. *Revista de Ingeniería Biomédica*, 11-23.
- Cuenca Pardo, J., & Álvarez Díaz, C. d. (1999). Tratamiento de quemaduras masivas con autoinjertos mallados y aloinjertos de epidermis humana cultivada in vitro. Reporte de un caso. *cirugía plástica*.
- Dąbrowska, A., Spano, F., Derler, S., Adlhart, C., Spencer, N., & Rossi, R. (2017). The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technology*.
- Fernández González, A., Lizana Moreno, A. M., Fernández Porcel, N., Guerrero Calvo, J., Ruiz Gracia, A., Espinosa Ibañez, O., & Sierra Sánchez, Á. (2016). Estudio piloto de tolerabilidad cutánea de láminas de fibrina-agarosa en voluntarios sanos . *Actualidad médica*.

- Fornes Pujalte, B., Palomar Llatas, F., Díez Fornes, P., Muñoz Mañez, V., & Lucha Fernandez, V. (2008). Apósitos en el tratamiento de úlceras y heridas. *Unidad de Enfermería Dermatológica, úlceras y heridas*.
- Frykberg, R. G., & Banks, J. (3 de agosto de 2015). *Mary Ann Liebert, Inc publishers*. Obtenido de Desafíos en el tratamiento de heridas crónicas: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/wound.2015.0635>
- Ganzhe, M., Shuya, T., Yanxia, S., Jiahui, Y., Haiying, L., Hongbo, T., & Wenzhi, Y. (2022). Preparation and evaluation of a novel alginate-arginine-zinc ion hydrogel film for skin wound healing. *Carbohydrate polymers*.
- González Jiménez, A., Alonso Malmierca, M., Posadas Bernal, P., Marcos Fernández, Á., Rodríguez Díaz, A., & López Valentín, J. (2014). Biomateriales elastoméricos en ingeniería tisular.
- Guarino, V., Altobelli, R., della Sala, F., Borzacchiello, A., & Ambrosio, L. (2018). Alginate processing routes to fabricate bioinspired platforms for tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials Science and Engineering*.
- Guimarães Barbosa, J., & Nogueira Campos, L. (2010). DIRECTRICES PARA EL TRATAMIENTO DE ÚLCERA VENOSA. *Revista electrónica cuatrimestral de enfermería*.
- Ibáñez Antuña, A. (2013). Síntesis y caracterización de geles plasmáticos con aplicaciones en Bio-Medicina dermatológica.
- Ingeniería de tejidos y Medicina Regenerativa. (julio de 2013). *Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas*. Obtenido de [www.nibib.nih.gov](http://www.nibib.nih.gov)
- Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpa, R., & Car, J. (2016). *Springer Link*. Obtenido de Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13643-016-0329-y>
- Kyu Han, S. (2016). *Inovations and Advances in Wound Healing*. Korea: Springer.
- Lanza, R., Langer, R., & Vacanti, J. (2007). *Principios de Ingeniería de Tejidos*.
- Llames, S., García, E., García, V., del Río, M., Larcher, F., Jorcano, J. L., . . . Holguín, P. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*.
- Malagón Romero, D. H. (2014). *Obtención de un equivalente dérmico mediante la proliferación en biorreactor de fibroblastos sobre microportadores fabricados con geles de plasma sanguíneo humano y alginato de sodio*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia .

- Míguez Burgos, A. (13 de junio de 2012). *Revista Electronica de PortalesMedicos.com*. Obtenido de Revista Electronica de PortalesMedicos.com:  
<https://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/4425/2/recuerdo-anatomico-de-la-piel..>
- Moctezuma-Paz, L. E., Páez-Franco, I., Jiménez-González, S., Miguel-Jaimes, K., Foncerrada-Ortega, G., Sánchez-Flores, A., . . . Nuñez-Luna, V. (2015). Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Esp Med Quir* .
- Organización Mundial de la Salud*. (6 de Marzo de 2018). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>
- Patino Vargas, M. I., Martínez García, F. D., Offens, F., Becerra, N., Restrepo, L., Van der mei, H., . . . Sharma, P. (2022). Viscoelastic properties of plasma-agarose hydrogels dictate favorable fibroblast responses for skin tissue engineering applications. *Biomaterials Advances* .
- Rastogi , P., & Kandasubramanian, B. (10 de septiembre de 2019). *Biblioteca Nacional de Medicina*. Obtenido de PubMed.gov: [https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/31315105/?from\\_term=alginate&from\\_pos=1](https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/31315105/?from_term=alginate&from_pos=1)
- Rastorza Lorenzo, A., Sánchez Porras, D., Ortiz Arrabal, O., de Frutos, M. J., Esteban, E., Fernandez, J., . . . Campos, F. (2021). Evaluación de biomateriales de agarosa marina para aplicaciones de ingeniería de tejidos. *Ciencia de los materiales* .
- Reinke , J., & Sorg, H. (2012). Wound repair and Regeneration. *European Surgical Research*.
- Reyes Martínez , G. (2011). Estudio ciego aleatorizado y controlado de la eficacia de un apósito biológico dérmico en el tratamiento de úlceras venosas. *Tesis digitales UNAM*.
- Rincón, Y., Gil, V., Pacheco, J., Benítez, I., & Sánchez, M. (2012). Evaluación y tratamiento del pie Diabético. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*.
- Roldán , S., Vargas, C., Mejía, M. L., Zapata, J., & Moncada, M. E. (2016). *Ingeniería de Tejidos y Aplicaciones*. Medellín: Fondo editorial ITM.
- Roldán Vasco , S., Vargas Isaza, C. A., Mejía, M. L., Zapata Giraldo, J., & Moncada Acevedo, M. E. (2016). *Ingeniería de Tejidos y Aplicaciones*. Medellín: Fondo Editorial ITM.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2012). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana.

- Rossani, G., Hernández, I., Alcolea, J., Castro-Sierra, R., Pérez-Soto, W., & Trelles, M. (2014). *Tratamiento de quemaduras mediante plasma rico en plaquetas (PRP)*. Obtenido de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0376-78922014000200015](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0376-78922014000200015)
- Saavedra Torres, J. S., Zuñiga Cerón, L. F., Mosquera Sánchez, L. P., Ceballos Mendoza, Á. J., & Freyre Bernal, S. I. (2018). Microfotografía: generalidades en la matriz extracelular, colágeno y piel.
- Sacho Tello, V. M., & Mata, R. M. (2015). Fibroblastos y matriz conjuntiva de la dermis: utilización en ingeniería tisular de la piel. *Revista de la sociedad Española de heridas*.
- Sánchez, A., Sibaja, M., Vega-Baudrit, J., & Rojas, M. (2007). Utilización de soportes de hidrogel de quitosano obtenidos a partir de desechos del camarón langostino para el crecimiento in vitro de fibroblastos humanos. *Revista Iberoamericana de polímeros*.
- Sarker, B., & Boccaccini, A. (2018). Utilización de alginato en ingeniería de tejidos y terapia celular. En B. Rehm, & M. Moradali, *Alginatos y sus aplicaciones biomédicas*. Singapur: Serie Springer en Ciencia e Ingeniería de Biomateriales.
- Sarvazyan, N. (2020). *Tissue Engineering. Principles, protocols and practical exercises*. Washington, DC : Springer.
- Sell Lluveras, J. L., & Domínguez, I. M. (2001). Guía práctica para el diagnóstico y el tratamiento del síndrome del pie diabético. *SciELO*.
- Seung-Kyu, H. (2016). *Innovations and Advances in Wound Healing*. Republic of Korea: Springer.
- Ueda, M. (2011). *Applied Tissue Engineering*.
- Valencia Gómez, Martel Estrada, Vargas Requena, Rodríguez Gonzalez, & Olivas Armendariz. (2016). Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 235-249.
- Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Kanikireddy, V., Toro, C., & Rotimi Sadiku, E. (2020). Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. *Carbohydrate Polymers*.
- Vela Anaya, G., Stegensek Mejía, E. M., & Leija Hernández, C. (2018). Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Enfermería del IMSS*, 105-114.

- Zarrintaj, P., Manouchehri, S., Ahmadib, Z., Reza Saeb, M., Urbanska, A., Kaplan, D., & Mozafari, M. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*.
- Zhang, M., & Zhao, X. (2020). Alginate hydrogel dressings for advances wound management. *International Journal of Biological Macromolecules*.