



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE**

*Efecto de la colágena-polivinilpirrolidona sobre la expresión  
de integrinas en cultivos tridimensionales de fibroblastos*

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA**

*Biol. Rosario Pacheco Marín*

Director: Dr. Edgar Krötzsch

**Facultad de Medicina**



MÉXICO, D.F.

ENERO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE**

*Efecto de la colágena-polivinilpirrolidona sobre la expresión  
de integrinas en cultivos tridimensionales de fibroblastos*

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA**

*Biol. Rosario Pacheco Marín*

Director: Dr. Edgar Krötzsch

**Facultad de Medicina**



MÉXICO, D.F.

ENERO, 2010


**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **PACHECO MARIN ROSARIO** con número de cuenta **98536515** con la tesis titulada **"EFECTO DE LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE INTEGRINAS EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE FIBROBLASTOS."**, realizada bajo la dirección del (la) : **DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GOMEZ**

Presidente: DR. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA  
Vocal: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA  
Secretario: DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GOMEZ  
Suplente: DRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA DE LEON MENDEZ  
Suplente: DR. DAVID GARCADIIEGO CAZARES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de Noviembre de 2009

  
Dr. Juan Nunez Farfan  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

# **AGRADECIMIENTOS**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.**

Por brindar todo lo necesario para que se realicen estudios de posgrado de alta calidad. A todo el personal que participa en ello; el coordinador Dr. Juan Núñez Farfán, secretaria técnica Lilia Judith Espinosa Sánchez, personal de Becas Lilia Solís, Administración Escolar Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes, Procesamiento de Datos M. en C. Oscar Ignacio Márquez Contreras, Apoyos Económicos María de Jesús Márquez Salazar. A Erika Rodríguez del posgrado de la facultad de medicina por su dedicación, disponibilidad, amabilidad y tolerancia con los estudiantes.

## **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT )**

Por el apoyo durante mis estudios de posgrado, por cumplir con su compromiso de apoyar a la investigación. Gracias, por la confianza que depositó en mi, siendo una de las beneficiadas Becarias.

## **COMITÉ TUTORAL**

Presidente: Dr. Moisés Selman Lama  
Vocal: Dr. Carlos Rosales Ledezma  
Secretario: Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez  
Suplente: Dra. María del Carmen Méndez García de León  
Suplente: Dr. David Garcíadiago Cazares

Por sus acertadas observaciones al presente trabajo, que ayudaron a mejorar la calidad de éste y a su vez a mí como estudiante. Por compartir, parte de su experiencia, tiempo y conocimientos conmigo.

## **INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION (INR) E INSTITUTO NACIONAL DEL SEGURO SOCIAL 20 DE NOVIEMBRE (ISSSTE)**

Por abrir sus puertas y apoyar a los estudiantes, creando vínculos entre las instituciones del sector salud y la UNAM.

A todas las personas que de una u otra forma han participado en mi formación

# *Dedicatoria*

**A MI FAMILIA HERMOSA  
MI FUERZA DE CADA DÍA  
ARTUR GRACIAS POR FORMAR PARTE DE ELLA**





VIII. Resultados	47
IX. Discusión	58
X. Conclusiones	67
XI. Anexos	68
Anexo A. Interacción receptor-ligando	68
Anexo B. Otros receptores de unión a colágenas	70
XII. Lista de abreviaturas	74
XIII. Referencias	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la piel. **(a)** Las tres capas de la piel; epidermis, dermis e hipodermis. **(b)** Estratos de la epidermis; capa basal, capa espinosa, capa granular y estrato córneo. Imagen modificada de LumiDerm S.L 2007. 11
- Figura 2.** Fases de la reparación de una herida cutánea **I)** inflamación (temprana y tardía), **II)** reepitelización y formación de tejido de granulación y **III)** remodelación de la matriz. Modificado de Clark Richard A.F 1996 14
- Figura 3.** Asociación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que forman a las integrinas. El mayor grupo incluye a la cadena  $\beta_1$ . Imagen tomada de Barczyk M. *et. al.*, 2010 30
- Figura 4.** Diagrama de estructura del receptor integrina. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas por enlaces no covalentes. El dominio extracelular del amino N-terminal forma una cabeza en forma de hongo que se une al ligando. Modificado de Clark Richard A.F 1996 31
- Figura 5.** Foto documentador Gel-Doc de BIO-RAD®. **A.** Las imágenes de los geles se obtuvo fotografiando los cultivos en 3D a diferentes tiempos de incubación. **B.** Con el software Axiovisión se delimitó el perímetro de gel y con ello se calculó el área. 43
- Figura 6.** Contracción de los geles de colágena por fibroblastos de piel humana. Los cultivos en 3D fueron preparados en placas de 24 pozos de 201 mm<sup>2</sup> de área y fotografiados a diferentes tiempos de incubación. De izquierda a derecha; 9, 24 y 39 hrs 48
- Figura 7.** Contracción de los cultivos de colágena en 3D. Las áreas de los geles fueron medidas y expresadas como la media de triplicados por ensayo, las barras verticales representan la desviación estándar. Sólo se muestra la gráfica de un ensayo representativo. La contracción en el control (sin colágena-PVP) con respecto a los diferentes tratamientos con colágena-PVP (0.5, 1.0 y 3.0%) no mostraron cambios 49
- Figura 8.** Retardo o inhibición de la contracción de la matriz de colágena tipo I por fibroblastos de piel humana. El área de la matriz de colágena en los cultivos tratados con el anticuerpo fue mayor que en el control en cada tiempo de monitoreo ( $p < 0.05$ ). La adición del anticuerpo antes y después de que polimerizara la colágena mostró el mismo comportamiento. 50
- Figura 9.** Fotomicrografía de la matriz de colágena en los cultivos (3D). Los núcleos de los fibroblastos se aprecian alargados en oscuro, mientras que las fibras de colágena tipo I se observan en un color rosa. Tinción de hematoxilina y eosina 51
- Figura 10.** Fotomicrografía a 20X. Inmunofluorescencia indirecta de los sistemas en 3D. En azul (DAPI) se observan los núcleos de los fibroblastos. **A.** Blanco, sólo se observan los núcleos en azul (DAPI) y no hay marca para fluoresceína (FICT). **B.** Expresión de  $\alpha_2$  integrina en verde (FICT) **C.** Expresión de la enzima prolilhidroxilasa en verde (FICT). La evaluación cuantitativa de ambas proteínas, se realizó considerando los núcleos presentes en tres campos por laminilla. Solo se muestra una imagen representativa. 53

**Figura 11.** Cociente de densitometría/área expresada por la subunidad  $\alpha_2$  integrina. Dicha proteína presentó un pico máximo de expresión a las 24hrs tanto en el control como con colágena-PVP al 0-5%. Sin embargo, en presencia de colágena-PVP al 3.0 % la expresión de  $\alpha_2$  fue disminuyendo como avanzaba la contracción, un comportamiento similar a este último se observó en presencia de colágena-PVP al 1.0 %. **ND** representa muestras donde no hubo tejido ( $p < 0.05$  análisis estadístico de Mann Whitney y  $t$ -student) 54

**Figura 12.** Expresión de la enzima prolilhidroxilasa. En los sistemas 3D la síntesis de colágena fue disminuyendo conforme avanzaba la contracción tanto en el control como con colágena-PVP al 0.5%, sin embargo, en presencia de colágena-PVP al 3.0% la síntesis de colágena se mantuvo constante. ( $p < 0.05$  análisis estadístico de Mann Whitney y  $t$ -student) 56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales diferencias entre miofibroblastos y fibroblastos	21
<b>Tabla 2.</b> Integrinas y asociaciones con algunos de sus ligandos. Modificado de Heino J 2007	32
<b>Tabla 3.</b> Los 29 tipos de colágenas agrupadas en ocho familias.	33
<b>Tabla 4.</b> Las ocho familias de colágenas y sus respectivos receptores integrinas. Modificado de Heino J 2007	34

## **I. Resumen**

La colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP), es un biofármaco con capacidad fibrolítica, antifibrótica, hemostática e inductora de la cicatrización. Su mecanismo de acción es a través de la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas. No obstante, la identificación parcial de su mecanismo, se desconoce la vía de reconocimiento del biofármaco por las células. Por lo que, en el presente estudio, se evaluó si colágena-PVP actúa a través de integrinas. Para ello, se utilizaron los cultivos tridimensionales (3D) de colágena con fibroblastos cutáneos humanos, midiendo el colapso gradual de la matriz (contracción). Cada cultivo fue tratado con diferentes concentraciones de colágena-PVP (0.5, 1.0 y 3.0%), anticuerpo anti-subunidad  $\beta_1$  integrina o con medio de cultivo (control). La contracción fue evaluada por mediciones seriadas del área del gel. Además, se evaluó la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina y enzima prolilhidroxilasa, así como la histomorfología de los cultivos. Observando, que la contracción en presencia de colágena-PVP se comportó similar al control. Por su parte, los cultivos tratados con anticuerpo anti-subunidad  $\beta_1$  integrina contrajeron en menor proporción que el control evidenciando la participación de estos receptores en la contracción. La presencia de colágena-PVP modificó la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina y la enzima prolilhidroxilasa. En los cultivos 3D las fibras de colágenas se alinean de forma perpendicular y los fibroblastos se orientan en la misma dirección, colágena-PVP no afectó esta orientación. Estos resultados sugieren que la actividad moduladora del metabolismo celular de colágena-PVP aparentemente no reside en su capacidad de interactuar con receptores integrinas, ya que no inhibió, ni siquiera de manera parcial, la

contracción. Finalmente, colágena-PVP puede modificar la actividad celular, lo que se asocia con las actividades farmacológicas del biofármaco en los procesos de remodelación tisular.

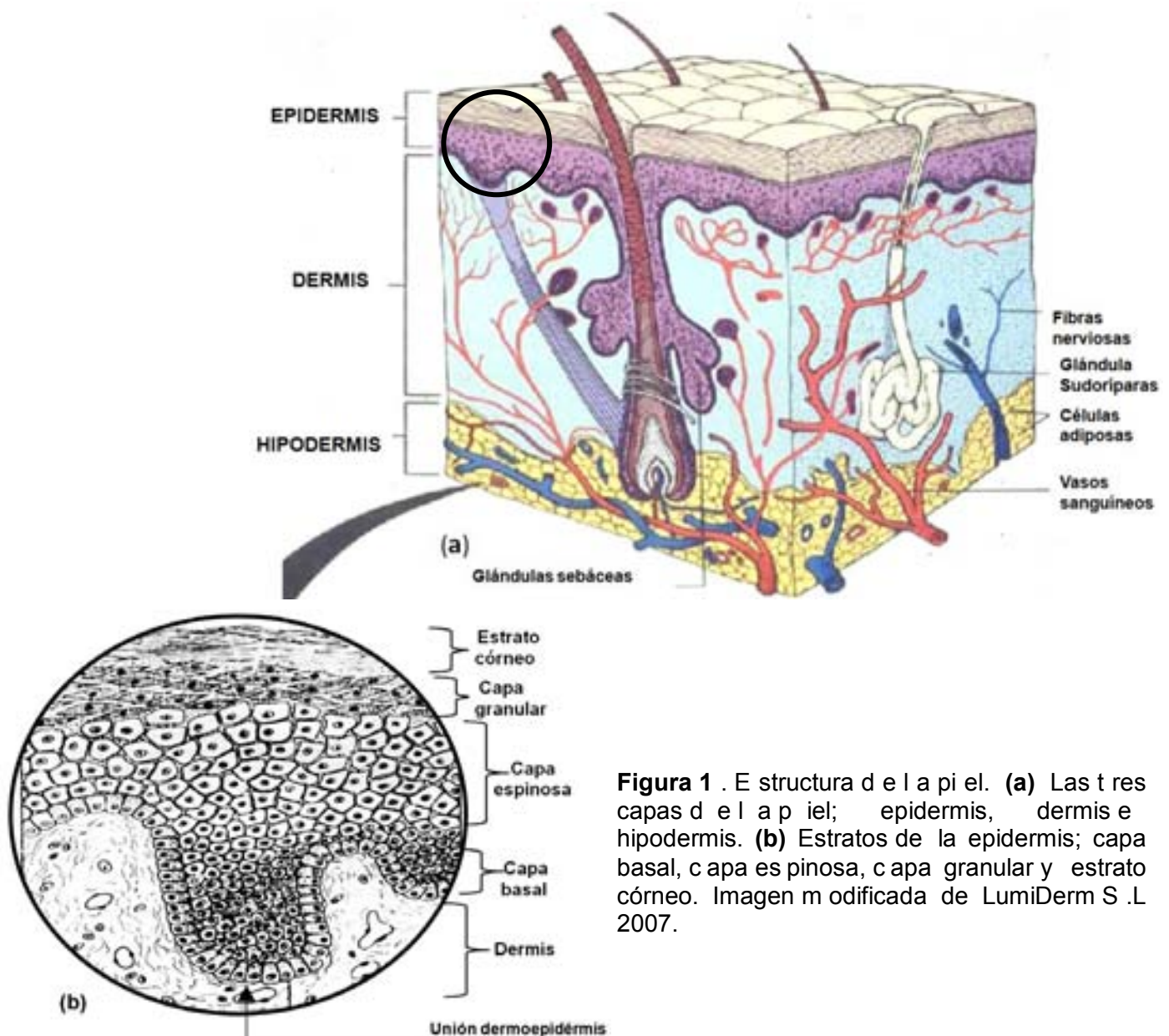
## **I. Abstract**

Collagen-polyvinylpyrrolidone (collagen-PVP) is a biodrug that has shown fibrolytic and antifibrotic capacity, homeostatic and healing inducing. Its mechanism of action is through decreased expression of proinflammatory and fibrogenic cytokines. However, this partial identification of its mechanism is unknown pathway of the biodrug recognition by cells. So, in this study, we evaluate whether collagen-PVP acts through integrins. To do this, we used three-dimensional (3D) collagen culture with human skin fibroblasts, measured in them the gradual collapse of the collagen matrix (contraction). Each culture was treated with different concentrations of collagen-PVP (0.5, 1.0 and 3.0%), mouse anti-human integrin  $\beta_1$  antibody or with culture medium (control). The contraction was measured by serial area measurements. In addition, we evaluated the expression of  $\alpha_2$  subunit of the integrin and the prolylhydroxylase enzyme and the histomorphology of cultures. Noting, that the contraction in the presence of collagen-PVP behaved similar to the control. For its part, the cultures treated with anti-integrin  $\beta_1$  made contracted by less than the control demonstrating the involvement of these receptors in the contraction. The presence of collagen-PVP modifies the expression of  $\alpha_2$  subunit of the integrin and the enzyme prolylhydroxylase. In cultures (3D) the collagen fibers are aligned perpendicular and fibroblasts are oriented in the same direction, collagen-PVP did not affect this guidance. The data suggest that modulating the activity of cellular metabolism of collagen-PVP apparently

lies in its ability to interact with integrin receptors, if not inhibited, even partially, the contraction in the cultures. Finally, collagen-PVP can modify cell activity, which is associated with pharmacological activities of the biodrug in tissue remodeling processes.

## II. Introducción

La piel es un órgano complejo, dinámico, con varios tipos celulares y estructuras especializadas que tienen múltiples acciones cruciales para la salud y supervivencia de los organismos. Estructuralmente la piel esta formada por tres capas: a) la epidermis o epitelio escamoso estratificado queratinizado, b) la dermis y c) la hipodermis o tejido adiposo subcutáneo (**Figura 1a**) (Kanitakis J. 2002).



**Figura 1** . Estructura de la piel. (a) Las tres capas de la piel; epidermis, dermis e hipodermis. (b) Estratos de la epidermis; capa basal, capa espinosa, capa granular y estrato córneo. Imagen modificada de LumiDerm S.L 2007.

## **A. Estructura de la piel**

### a) Epidermis

La epidermis es la capa superficial de la piel, formada por un epitelio estratificado que se renueva constantemente. La conforman células epiteliales como los queratinocitos, que constituyen del 90 al 95% y el 5% restante son células de Langerhans, células de Merkel y los melanocitos. Las células se diferencian en cuatro estratos; de abajo hacia arriba se ubica; la capa basal, la capa de malpighiana o capa espinosa o estrato espinoso, la capa granular y la capa córnea o estrato córneo (**Figura 1b**). Estos cuatro estratos a su vez forman dos zonas principales en la epidermis; la región externa que comprende al estrato córneo y la interna esta conformada por los tres estratos restantes. La capa basal separa a la dermis de la epidermis (Kanitakis J. 2002).

### b) Dermis

Esta capa se encuentra entre la epidermis e hipodermis. La dermis es un tejido resistente, con propiedades viscoelásticas, dadas por la matriz de tejido laxo compuesta de proteínas fibrosas. La colágena tipo I constituye entre el 80 y 90%, mientras que la colágena tipo III del 8 al 22% y menos del 5% lo constituye la colágena tipo V. La alta concentración de la colágena tipo I contribuye a la gran fuerza de tensión de la dermis y su resistencia a la deformación (Hunt Tomas K 1983). Además, una gran variedad de glicoproteínas y proteoglicanos llenan los espacios entre las fibras y células dérmicas. La matriz fibrosa sirve como un andamiaje para que se entremezclen vasos sanguíneos y las fibras nerviosas. La dermis contiene



glándulas sudoríparas y sebáceas. Los fibroblastos, los mastocitos y las células dendríticas son las principales células contenidas en la dermis (Kanitakis J. 2002).

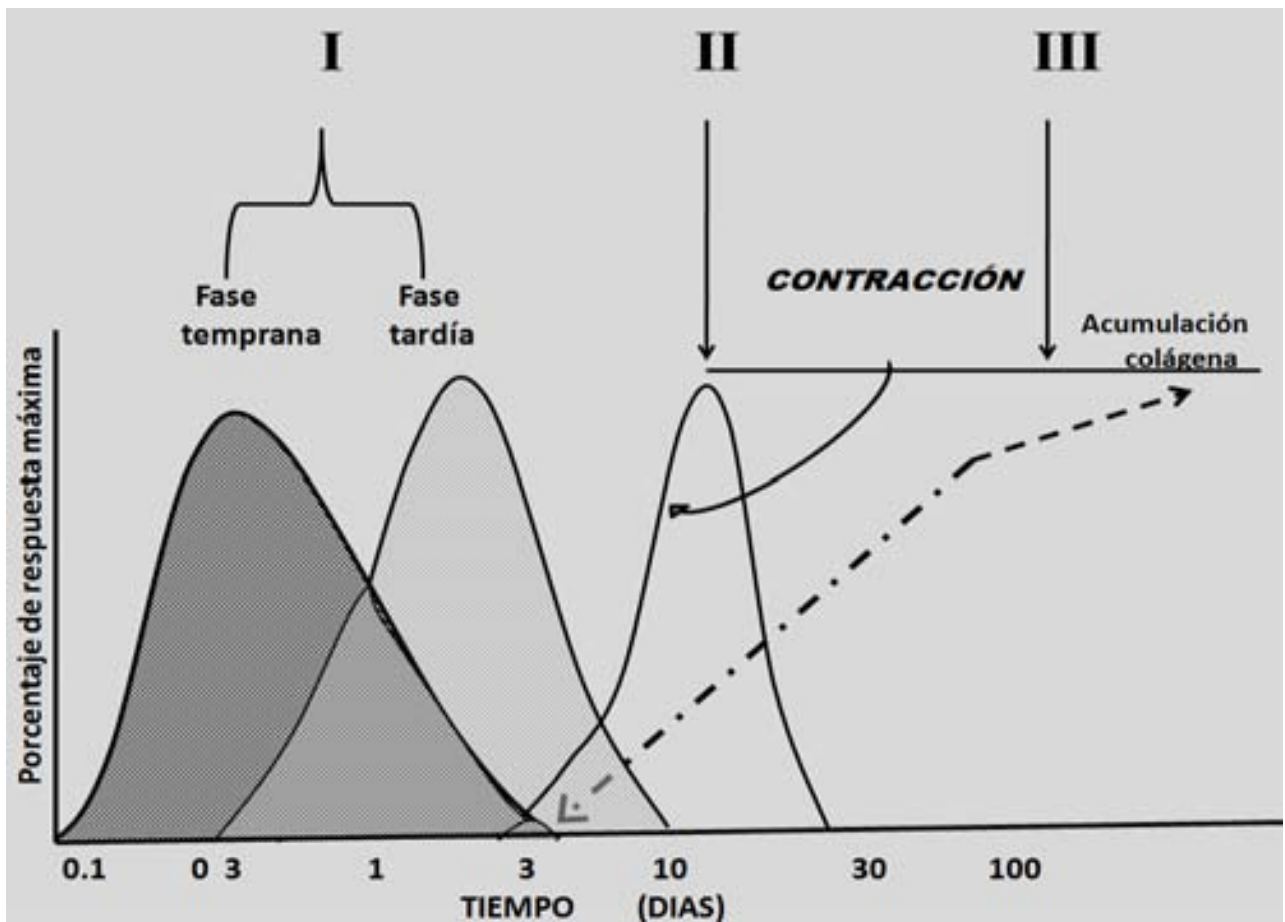
c) Hipodermis o tejido adiposo subcutáneo

La hipodermis es la capa más profunda de la piel y desempeña un papel importante en la termorregulación, aislamiento, suministro de energía (nutrición) y protección contra daños mecánicos. Las principales células de la hipodermis son los adipocitos quienes presentan en su citoplasma grandes cantidades de lípidos. En esta capa se ubica la parte más profunda de las glándulas sudoríparas, así como vasos y fibras nerviosas que contribuyen a la formación de los correspondientes plexos cutáneos (Kanitakis J. 2002).

**B. Cicatrización de la herida.**

Una de las principales funciones de la piel es la de actuar como una barrera protectora, sin embargo, al estar en constante contacto con el medio ambiente se vuelve vulnerable a cualquier agresión externa. Cuando se produce una lesión sobre la piel, se desencadenan una serie de mecanismos para reparar el daño, culminando con la cicatrización (Arosemena S. A y Arosemena S. R, 2007). El proceso de cicatrización en los mamíferos presenta variaciones de acuerdo al estadio cronológico de la vida, es decir, en la fase prenatal la reparación de la herida es mas rápida y eficiente que en la fase adulta. Además, en los adultos el proceso de cicatrización se considera como restaurativo, lo que implica una cicatriz fibrosa rica en colágena, mientras que la reparación en la etapa fetal es un proceso de regeneración y se caracteriza por la ausencia de cicatriz (Adzick NS y Lorenz HP, 1994). En los últimos años, se han logrado una gran cantidad de avances en la comprensión de las

interacciones celulares y bioquímicas dirigidas a reparar el daño. La cicatrización, consiste de una serie de eventos, los cuales se han clasificado cronológicamente en tres fases: (I) inflamación (fase temprana y tardía); (II) reepitelización y formación del tejido de granulación y (III) remodelación de la matriz extracelular (**Figura 2**). Estas etapas no se excluyen mutuamente sino que se superponen en el tiempo (Clark Richard A.F 1996).



**Figura 2.** Fases de la reparación de una herida cutánea **I**) inflamación (temprana y tardía), **II**) reepitelización y formación de tejido de granulación y **III**) remodelación de la matriz. Modificado de Clark Richard A.F 1996

La inflamación consiste en la activación de diversas reacciones que sirven para reparar y preparar el tejido dañado para su cicatrización. Durante la inflamación se activa la cascada de coagulación y la respuesta por parte de las células encargadas de la limpieza de la herida. La reepitelización es la formación de nueva epidermis, en donde las células epiteliales se desplazan desde los bordes de la herida hacia el centro, formando una barrera entre la herida y el medio ambiente. El tejido de granulación es el nuevo tejido conjuntivo que consta de una matriz fibrosa junto con la formación de nuevos vasos sanguíneos. Finalmente, la matriz extracelular necesita reorganizarse para satisfacer las necesidades fisiológicas de los tejidos, esto se logra con una constante degradación y síntesis de sus componentes por parte de la célula, lo que llamamos remodelación de la matriz extracelular (Clark Richard A.F 1996).

### **FASE I. INFLAMACIÓN**

Cuando una lesión sobre la piel causa ruptura de los vasos sanguíneos concomitantemente se deriva la extravasación de la sangre, como consecuencia de ello se activa la cascada de coagulación. Esta última, se caracteriza por la agregación de plaquetas que generan un tapón rico en fibrina en el sitio de la herida favoreciéndose así la homeostasis. A su vez, este tapón o coágulo proporciona una matriz provisional para la migración celular. Las plaquetas además de intervenir en la homeostasis, también secretan múltiples mediadores, incluyendo citocinas como factores de crecimiento (GF), interleucinas (IL), etc., que favorecen la quimiotaxis de diferentes tipos de células hacia la zona de la herida. El proceso de coagulación termina cuando los estímulos activadores para la formación del coágulo desaparecen. Proteínas como la prostaciclina y la antitrombina III inhiben la agregación plaquetaria,

así como la proteína C reactiva una enzima que degrada algunos factores de coagulación como el I, V y VIII. Una vez terminado el proceso de coagulación aparecen en la herida los diferentes tipos de leucocitos, en una secuencia ordenada. Primero, el infiltrado de neutrófilos tiene como finalidad limpiar la zona de partículas extrañas y bacterias (etapa temprana de la inflamación). Posteriormente, los monocitos entran a la herida y rápidamente se transforman en macrófagos, estos últimos al igual que las plaquetas liberan factores de crecimiento e inician la formación del tejido de granulación (etapa tardía de la inflamación). Los macrófagos tienen la habilidad de sintetizar y secretar constantemente factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL e interferón gamma IFN- $\gamma$  (Clark Richard A.F 1996 y Krötzsch Gómez F.E, 1999).

## **FASE I I. Reepitelización y formación del tejido de granulación**

### **I I. 1 Reepitelización**

La reepitelización de la herida comienza horas después de la lesión. Las células epiteliales tales como los queratinocitos se desplazan desde los bordes de la herida hacia el centro. Los queratinocitos de la capa estratificada de la epidermis se mueven uno sobre otro hasta formar una capa epitelial (neoepidermis) que sirve como un sello entre la herida subyacente y el medio ambiente. La adquisición de la movilidad de las células epiteliales hacia el sitio de la herida se debe en parte a cambios en el fenotipo celular. Entre estos cambios se encuentran la disolución de desmosomas (estructuras celulares que mantienen unidas a las células epiteliales entre sí y además proveen la fuerza de tensión del epitelio) y la pérdida de unión entre la epidermis y dermis por la disolución de hemidesmosomas (estructuras que unen la epidermis con la membrana

basal). A su vez, la migración de los queratinocitos durante la reepitelización puede llevarse a cabo por la liberación local de citocinas, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), así como la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estos factores pueden proceder de los macrófagos o células del parénquima dérmico y actuar de manera paracrina sobre los queratinocitos. Sin embargo, los queratinocitos tienen la capacidad de producir TGF- $\beta$  así como TGF- $\alpha$ , por ello se piensa que dichos factores participan tanto de forma autocrina como paracrina en la migración celular (Clark Richard A.F 1996 y Krötzsch Gómez F.E, 1999). Estos factores actúan induciendo la síntesis de receptores de membrana. Por ejemplo, TGF- $\beta_1$  tiene la capacidad de inducir la síntesis de integrinas, éstas permiten la locomoción de los queratinocitos sobre la matriz extracelular (Krötzsch Gómez F.E, 1999).

La epidermis en reparación es diferente a la epidermis normal ya que la primera no presenta una maduración total, debido a que los queratinocitos necesitan dividirse y migrar para volver a generar una barrera en el sitio de la herida y después, equilibrar el balance proteico-hidro-lipídico necesario para generar la homeostasis del área (Clark Richard A.F 1996 y Krötzsch Gómez F.E, 1999).

## **I I. 2. Formación del tejido de granulación**

El tejido de granulación también llamado nuevo estroma, se forma aproximadamente cuatro días después de la lesión. El nombre deriva de su apariencia granular, dada por la gran cantidad de vasos capilares en neoformación y la población celular constituida principalmente por macrófagos y fibroblastos embebidos en un tejido

conjuntivo laxo. Durante la formación del tejido de granulación, se lleva a cabo la fibroplasia (formación de nuevo tejido conjuntivo laxo) y la neovascularización (formación de nuevos vasos sanguíneos) (Clark Richard A.F 1996).

## **II. 2. A. Fibroplasia**

La fibroplasia consiste en la formación de nuevo tejido conjuntivo laxo. Este tejido está compuesto principalmente por colágenos tipo I, III y IV. Así como de elastina, laminina, fibrilina, fibronectina, entre otras proteínas. Además, en los espacios que se encuentran entre las fibras y células dérmicas se depositan una gran variedad de glicoproteínas y proteoglicanos. Los fibroblastos son las principales células encargadas de sintetizar y remodelar la matriz fibrosa a través de un gran número de señalizaciones inducidas por las interacciones célula-célula y célula-matriz. Estas interacciones son mediadas por receptores integrinas principalmente (Clark Richard A.F 1996 y Green JA y Yamada KM 2007). En la fibroplasia participan algunas citocinas producidas por los fibroblastos que actúan en forma autocrina, como por ejemplo; el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el TGF- $\alpha$  y el EGF y otras citocinas son liberadas por las plaquetas y macrófagos. Los fibroblastos primero migran a través del coágulo que se formó al inicio de la cicatrización y que está formado principalmente de proteínas como fibrina, fibronectina y vitronectina. Los fibroblastos se unen a estas proteínas a través de integrinas. Los factores PDGF y el TGF- $\beta$  estimulan la migración de los fibroblastos al sitio de la herida mediante la regulación de receptores integrinas. PDGF y el TGF- $\beta$ , pueden ser parcialmente responsables de inducir a los fibroblastos a un fenotipo migratorio (Clark Richard A.F 1996). A su vez, los fibroblastos migran en respuesta a una variedad de

quimiotrayentes como pueden ser péptidos derivados de la degradación de proteínas como colágena tipo I, II y III, elastina o fragmentos de fibronectina (Postlethwaite AE y Kang AH 1976). Mecánicamente los fibroblastos avanzan hacia un gradiente quimiotáctico (migración de la célula en respuesta a un gradiente químico en fase fluida) ampliando sus lamelipodias (prolongaciones transitorias de la membrana celular producidas por microfilamentos de actina) hacia el estímulo. Este tipo de migración celular es similar al movimiento que presentan los fibroblastos pero cuando están unidos en una superficie y se mueven hacia un gradiente de sitios de adhesión celular, a este tipo de movimiento se le llama haptotaxis. Inclusive, en ausencia de un gradiente de adhesión, las fibrillas de la matriz influyen fuertemente en la dirección y migración de los fibroblastos, ya que se ha visto que las células tienden a alinearse y migrar a lo largo de las discontinuidades del sustrato donde se encuentran unidas, a este proceso se le llama orientación de contacto. Un ejemplo de orientación de contacto, se observa cuando los fibroblastos son cultivados en una plataforma de fibrillas de fibronectina y ellos en vez de cruzar las fibras migran a lo largo de ellas. Por lo que, la quimiotaxis, la haptotaxis y la orientación de contacto pueden en conjunto influir para la migración de los fibroblastos dentro de la matriz provisional que llena el espacio de la herida. Una vez que los fibroblastos han migrado dentro de la herida cambian gradualmente su fenotipo migratorio por el fenotipo profibrótico (síntesis de proteínas) como una de sus funciones principales. Inicialmente, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se vuelven más dispersos por todo el citoplasma del fibroblasto y se inicia la pérdida de matriz extracelular compuesta de fibronectina por la acción de algunas metaloproteasas (MMP) y finalmente el aparato de Golgi y

retículo endoplásmico del fibroblasto se llena de una nueva proteína, la colágena (Clark Richard A.F 1996). Estudios *in vivo* han demostrado que implantes de esponjas con dichas proteínas en el sitio de la herida favorecen la formación de tejido de granulación. Bazin y Delaunay 1946 (Citado en Clark Richard A.F 1996) observaron por primera vez que durante la formación del tejido de granulación la colágena sintetizada era distinta a la colágena que presentaba la dermis normal en adultos, ya que la primera se asemejaba más a la de piel embrionaria y mas tarde fue reconocida como colágena tipo III, este tipo de colágena es producida en pequeñas cantidades en la dermis normal y se incrementa en gran medida cuando se esta formando el tejido de granulación. Por otro lado, se sabe que algunas citocinas como el TGF- $\beta$  y la IL-4 actúan de forma autocrina en los fibroblastos induciendo la producción de colágenas tipo I y tipo III (Clark Richard A.F 1996).

Una vez que es depositada la matriz de colágena en el sitio de la herida los fibroblastos dejan de producir dicha proteína, a pesar de la continua expresión de algunas citocinas como por ejemplo, TGF- $\beta$ . Sin embargo, las señales responsables en la regulación de la proliferación y síntesis de proteínas en los fibroblastos no son del todo claras hasta el momento. Una vez el fibroblasto pasó del fenotipo migratorio al profibrótico, durante la segunda y tercera semana de la reparación de la herida, asumen un fenotipo de miofibroblasto (Clark Richard A.F 1996).



Varias características distinguen a los miofibroblastos de los fibroblastos (**Tabla 1**).

Los miofibroblastos, se caracterizan por un citoesqueleto de actina de musculo liso tipo  $\alpha$  (SMA- $\alpha$ ) a diferencia de los fibroblastos quienes contienen SMA pero del tipo  $\beta$  con la que establecen la interacción célula-matriz. La presencia de los miofibroblastos en la reparación de la herida, corresponde con el inicio de la compactación del tejido conjuntivo y contracción de la herida (Clark Richard A.F 1996 y Dallon JC y Ehrlich HP, 2008).

**Tabla 1.** Principales diferencias entre miofibroblastos y fibroblastos.

Características	Fibroblasto	Miofibroblasto
Actina de musculo liso (SMA)	SMA- $\beta$	SMA- $\alpha$
Receptores caderinas	N-caderina	OB-caderina
Receptores Integrinas	Alta expresión de $\alpha_2\beta_1$	Poca expresión de $\alpha_2\beta_1$

## II. 2. A. 1 Contracción de la herida.

La contracción de la herida consiste en la aproximación de los bordes de la herida producida por la compactación del tejido de granulación. Con la consecuente disminución de la extensión de la herida, serán menores las necesidades de síntesis de tejido y otros eventos celulares. La contracción se ha podido estudiar *in vitro* gracias a los cultivos en tres dimensiones (3D) (Grinnell F, 2003).

### II. 2. A. 1. A Cultivos celulares en tres dimensiones (3D)

Desde 1956, Ehrmann y Gey propusieron el cultivo de las células sobre un sustrato natural que podría ser un componente de la matriz extracelular, en lugar de sólo cultivarlas sobre una superficie plana de cristal. Mas tarde, en los 70's Elsdale T y Bard J cultivaron fibroblastos sobre una matriz de colágena encontrando que las células presentaban una activa movilidad dentro de la red de colágena, lo que

causaba un colapso gradual de la red, hasta la formación de un cuerpo denso y opaco. Además, encontraron que la fisiología y morfología de estos fibroblastos era diferente a la que presentaban los fibroblastos cultivados en monocapa. Estos hallazgos se relacionaron con la compactación del tejido de granulación y contracción de la herida *in vivo* y (Klein CE *et. al.*, 1991, Grinnell F, 2003 y Dallon JC y Ehrlich HP, 2008).

## **II. 2. A. 1. B Mecanismos y células que intervienen en la contracción de la herida**

La contracción de la herida puede ser provocada por la migración de los fibroblastos sobre la matriz extracelular que esta formada principalmente por fibras de colágena. La migración celular se da por la extensión y retracción de las pseudopodia en los fibroblastos, lo que genera una fuerza de tensión que es transmitida a través de la matriz y propagada por toda la herida. La trasmisión de esta fuerza de tensión depende de las uniones célula-célula, célula-matriz extracelular y matriz-matriz, estas uniones proporcionan una red de vínculos a través de la herida (Clark Richard A.F 1996). La interacción célula- matriz se da entre las fibras del citoesqueleto de actina y la matriz extracelular a través de integrinas. Funcionalmente, esto proporciona un sistema de mecano-traduccion de modo que la fuerza de tensión que se genera sobre las fibras se puede transmitir alrededor de la matriz. Además, las señales mecánicas extracelulares pueden ser traducidas en señales intracelulares a través de este sistema. Sin embargo, muy poco se conoce de la secuencia que lleva acabo desde que el ligando se une al receptor hasta la generación de una respuesta celular (Sethi KK, *et al.*, 2002 y Tomasek JJ *et al.*, 2002).

En los miofibroblastos la expresión de la proteína actina de musculo liso- $\alpha$  (SMA- $\alpha$ ) y colágena tipo I es regulada por algunos factores como el TGF- $\beta$ 1. Estas observaciones indican que los miofibroblastos también participan en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular así, como en la generación de fuerzas de tensión, lo que da lugar a la reorganización de la matriz y finalmente a la contracción de la herida. Morfológicamente los miofibroblastos se caracterizan por la presencia de un aparato contráctil que contiene haces de microfilamentos de actina asociadas a proteínas contráctiles como la miosina, las fibras de actina son análogas a las fibras de tensión que se han sido descrito en los fibroblastos. Estos paquetes de actina que terminan en la superficie de los miofibroblastos en el fibronexos (un complejo de adhesión especializada) utilizan también a los receptores integrinas para vincular al citoesqueleto de actina con los componentes de la matriz como colágena, fibronectina, etc. Cabe destacar, que los fibroblastos en el tejido conjuntivo *in vivo* carecen de un aparato microfilamentoso contráctil como el de los miofibroblastos, debido a que en los primeros los microfilamentos de actina son organizados predominantemente dentro de mallas corticales (debajo de la membrana). Mientras que en los miofibroblastos los filamentos de actina cruzan el citoplasma de lado a lado. Del mismo modo, la alta organización del complejo de adhesión (fibronexos) está ausente en la superficie de los fibroblastos, así ambos tipos celulares son morfológica y funcionalmente diferentes en el tejido conjuntivo *in vivo*. Otra característica en los miofibroblastos, es su semejanza con las células del musculo liso, ya que se conectan directamente a través de uniones de comunicación estrechas (GAP JUNCTIONS). Estas uniones se han identificado en los miofibroblastos presentes en heridas

cutáneas, así como en miofibroblastos derivados de fibroblastos de córnea indicando, que los miofibroblastos podrían formar una unidad contráctil multicelular durante la contracción del tejido de granulación. Las uniones de comunicación estrechas forman varios hemicanales en la membrana plasmática de la célula, estas uniones se sobreponen con los hemicanales de la membrana celular opuesta. Los hemicanales, contienen proteínas diferentes pero funcionalmente relacionadas llamadas conexinas (familia de proteínas estructurales transmembranales que se unen para formar canales de comunicación) (Tomasek JJ *et al.*, 2002).

Aunque los miofibroblastos están claramente presentes en tejido de granulación durante el cierre de la herida, varias preguntas han surgido en cuanto a si son esenciales para la contracción del tejido de granulación. Debido a que también las fuerzas de tensión generados por los fibroblastos cuando migran sobre un sustrato, pueden reorganizar la matriz de colágena. En estudios de cultivos de colágena en tres dimensiones, se ha observado que el resultado de la reducción en el diámetro de la matriz se debe totalmente a las fuerzas de tensión de los fibroblastos. Por lo que, se ha propuesto, que las fuerzas de tensión que son generadas por la migración de los fibroblastos en el tejido de granulación sería suficiente para dar lugar al inicio al cierre de la herida, lo que hace a una célula especializada contráctil innecesaria, como en el caso de los miofibroblastos. Sin embargo, aunque la fuerza de tensión que es generada por los fibroblastos puede ser suficiente para iniciar el cierre de la herida, la posterior aparición de resistencia en el tejido circundante induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y sólo entonces la contracción puede dar inicio. Varias evidencias soportan la hipótesis que el incremento de la expresión de la proteína

SMA- $\alpha$  es suficiente para que los miofibroblastos aumenten la fuerza generada en la matriz tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los miofibroblastos que contienen SMA- $\alpha$  ejercen una fuerte atracción sobre sustratos rígidos de silicona en comparación con geles de colágena en donde éstos solo expresan SMA tipo  $\beta$  (Clark Richard A.F 1996).

Por otro lado, la presencia de centros de adhesiones focales es fundamental para la transmisión de la fuerza de tensión. Los centros de adhesión focal maduros presentan un tamaño de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de longitud, mientras que los inmaduros 1  $\mu\text{m}$ , los primeros se disponen principalmente en la periferia de la célula y contienen SMA ( $\beta$  y  $\gamma$ ) aunque frecuentemente también SMA- $\alpha$ ,  $\alpha_5\beta_1$  integrina, vinculina, paxilina, talina, FAK (proteínas de tirosina cinasa fosforiladas). EL factor TGF- $\beta_1$  aumenta el número de centros maduros de adhesión focal induciéndolos a supermaduros, éstos últimos miden de 6 a 30  $\mu\text{m}$  y son típicos de los miofibroblastos y siempre contienen SMA- $\alpha$  y tensina. Las distintas relaciones entre los componentes de madurez y supermaduros de los centros de adhesión focal podrían dar lugar a diferentes propiedades estructurales y de señalización. Aun, no se ha estudiado si los centros supermaduros de adhesión focal pudiesen contener un subconjunto de integrinas especializado u otros componentes. Esto es concebible, ya que el factor TGF- $\beta_1$  es el principal promotor de la diferenciación de miofibroblastos y maduración de los centros de adhesión focal, influyendo también en el patrón de expresión de integrinas en fibroblastos humanos (Tomasek JJ et al., 2002).

Por otro lado, estudios *in vitro* (cultivos en 3D) demuestran que las integrinas son fundamentales para la contracción de la matriz de colágena, por ejemplo, la adición

de anticuerpos dirigidos contra la cadena o subunidad  $\beta_1$  integrina retarda la contracción de la matriz. La presencia de esta familia de receptores juega un papel importante en la interacción célula-matriz extracelular y por lo tanto en la transmisión de la fuerza de tracción por toda la matriz (Langholz O y Cols. 1995).

Es evidente que los miofibroblastos pueden generar y mantener la fuerza contráctil durante la reducción del tejido durante la cicatrización de las heridas, sin embargo, no se puede atribuir el fenómeno de contracción a un solo estirpe celular (Clark Richard A.F 1996 y Tomasek JJ et al., 2002).

## **II. 2. B. Neovascularización**

Conforme avanza la formación del tejido de granulación, la fibroplasia no se detiene aun cuando de inicio la neovascularización, por el contrario, acompaña a este proceso. La neovascularización se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso también llamado angiogénesis, el cual comienza dos días después de que ocurrió el daño. La neovascularización es un proceso complejo que depende de una matriz extracelular en el sitio de la herida, así como de la alteración fenotípica, estimulación de la migración y actividades mitogénicas de las células endoteliales. El fenotipo de estas células es modificado durante la angiogénesis, pero el fenotipo angiogénico no es tan delimitado como en el caso de los fibroblastos (fenotipos migratorios, profibrotico y miofibroblasto). La actividad angiogénica es retomada por los macrófagos y células locales, así como del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TGF- $\alpha$  - TGF- $\beta$ , factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), angionenina, angiotropina e IL-8. A su vez, la baja tensión de oxígeno y el incremento

de ácido láctico pueden ser estímulos para la producción de mediadores (Clark Richard A.F 1996 y Krötzsch Gómez F.E 1999). La fase temprana de la angiogénesis implica la migración celular más que la división. Las células endoteliales provenientes de vasos sanguíneos no dañados desarrollan pseudopodia y se desplazan a través de la matriz extracelular hacia la zona de la herida generando nuevos vasos sanguíneos. Además, los factores angiogénicos como FGF, fibronectina, heparina, factores liberados a partir de mastocitos y otras células endoteliales quimioatrayentes favorecen la migración celular. Mientras se produce la invasión celular en la herida, también empieza la proliferación de las células endotelial. La presencia de algunos factores como FGF, estimula a las células endoteliales a liberar el factor activador de plasminógeno (PA) y procolagenasa. El PA convierte al plasminógeno en plasmina y a procolagenasa en colagenasa, estas dos proteasas digieren la membrana basal. Esta fragmentación de la membrana facilita la migración de las células endoteliales al sitio de la herida rico en fibrina y fibronectina, formando tubos capilares, estas células expresan integrinas como  $\alpha_v\beta_3$  que facilitan la adhesión y migración. Por último, las células endoteliales empiezan a depositar una matriz provisional rica en fibronectina y proteoglicanos formándose así la verdadera membrana basal, donde el FGF y otros factores mitogénicos como VEGF estimulan la proliferación de las células endoteliales lo que da por resultado un suministro continuo de células para extender los tubos capilares. Finalmente, días después se eliminan los estímulos angiogénicos y el flujo sanguíneo comenzará a circular (Clark Richard A.F 1996 y Krötzsch Gómez F.E 1999).

### **FASE III. Remodelación del tejido**

Por último, la remodelación de la matriz extracelular, la maduración y apoptosis celular comprenden la tercera fase de la cicatrización. Esta última fase de la cicatrización intercala con la formación del tejido de granulación, la maduración de la neoepidermis y neovascularización. La remodelación del tejido comprende la síntesis y degradación de los diferentes componentes de la matriz extracelular, entre estos componentes encontramos además de las fibras de colágenas, glicoproteínas tales como fibronectina, laminina, entactina, así como glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos. La matriz extracelular promueve la señalización, proporciona un soporte estructural a las células y promueve la formación del tejido de granulación. También sirve como un reservorio para citocinas, enzimas y otras moléculas difusibles. La síntesis y degradación de la matriz extracelular debe ser regulada durante la cicatrización, creando un equilibrio y generando una fibrosis suficiente y necesaria que permita la funcionalidad del tejido. Esto se logra con la actividad de enzimas y de sus activadores e inhibidores que delimitan la zona reparada, principalmente las enzimas metaloproteasas como las estromelisin y gelatinasas las cuales degradan a cierto tipo de colágenas. Es de suma importancia que exista un control adecuado de síntesis y degradación de las proteínas que forman la matriz extracelular dado la falta de regulación se generarían diversas patologías, como por ejemplo, una cicatriz hipertrófica o queloide, cuya característica principal es la de presentar un exceso de colágena a lo largo de la herida, junto con otras alteraciones en la estructura dérmica. Ambos tipos de cicatrices, causan prurito, dolor y desfiguramiento, pero cada una a su vez con características particulares lo que las

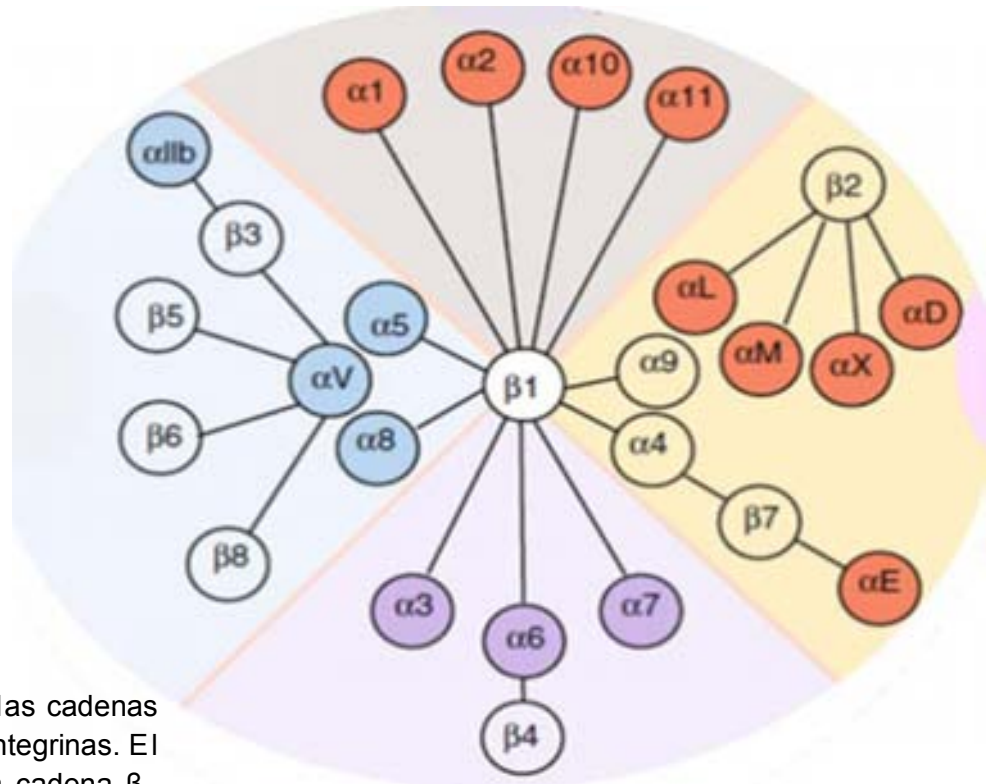


hace distintas entre sí, ya que la cicatriz hipertrófica no crece mas haya del sitio de la herida, en cambio la cicatriz que loide sobrepasa el límite de la herida invadiendo otros tejidos dérmicos sanos ( Ladin DA *et. al.*,1995)

Una vez que la herida es llenada por el tejido de granulación, cubierta con neopídermis, los fibroblastos y miofibroblastos han contraído la herida y las células epidérmicas diferenciadas han restablecido una barrera permeable, las células endoteliales son las primeras en sufrir apoptosis, seguidas de los miofibroblastos, llevando a una gradual cicatriz con actividad celular mínima. Durante los meses siguientes la formación del tejido de granulación y la matriz extracelular cambian continuamente, aunque muy lentamente.

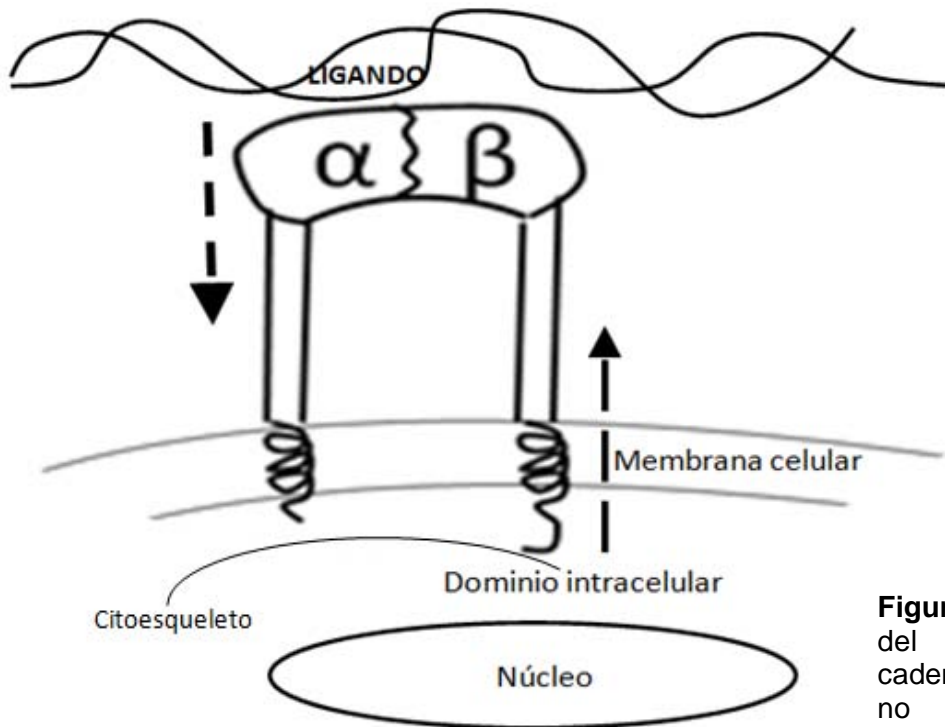
### **C. Integrinas**

Las integrinas son una gran familia de proteínas heterodiméricas transmembranales, compuestas por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas por enlaces no covalentes (Heino J 2007 y Clark Richard A.F 1996). En los vertebrados, existen 18 cadenas  $\alpha$  y ocho cadenas  $\beta$  que al unirse, forman por lo menos 24 receptores diferentes (**Figura 3**) (Barczyk M. *et. al.*, 2010). Las integrinas son receptores de adhesión de una amplia variedad de células. Estos receptores favorecen las interacciones célula-matriz extracelular y en algunos casos las interacciones célula-célula. Tales interacciones, son un componente básico de la migración y reconocimiento celular y subyace a muchos procesos biológicos, tales la reparación tisular, la embriogénesis y respuesta inflamatoria, entre otros eventos (Barczyk M. *et. al.*, 2010).



**Figura. 3** Asociación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que forman a las integrinas. El mayor grupo incluye a la cadena  $\beta_1$ . Imagen tomada de Barczyk M. *et. al.*, 2010

La cadena  $\alpha$  tiene un tamaño que oscila entre 120 y 200 KD, mientras que la cadena  $\beta$  varía entre 90 y 1100 KD. Los extremos aminoterminales de cada cadena forman una cabeza globular que contribuye a la unión entre cadenas y a la unión de la integrina a su ligando (**Figura 4**). Por su parte, el extremo carboxilo terminal de cada cadena presenta una región transmembranal hidrofóbica y una región intracitoplásmica, que habitualmente tienen menos de 50 aminoácidos de longitud. Estas regiones interactúan con numerosas moléculas de señalización del citoplasma y con el citoesqueleto. Por lo tanto, la señalización celular se lleva a cabo de forma bidireccional (**Figura 4**) (Clark Richard A.F 1996).



**Figura 4.** Diagrama de estructura del receptor integrina. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas por enlaces no covalentes. La región extracelular del amino N-terminal forma una cabeza en forma de hongo que se une al ligando. Modificado de Clark Richard A.F 1996

Las integrinas se unen a diversos ligandos, tales como colágenas, fibronectina, vitronectina y otras glicoproteínas de la matriz extracelular (**Tabla 2**). Las integrinas tienen una afinidad variable por su ligando; no obstante en algunos casos varias integrinas reconocen a una sola proteína, pero nunca con la misma afinidad de unión. Por ejemplo, la  $\alpha_1\beta_1$  y la  $\alpha_2\beta_1$  integrinas se unen a la colágena y a su vez cada integrina se une a otras proteínas (**Tabla 2**). La interacción entre el ligando y el receptor se da gracias a regiones específicas que se encuentran tanto en el receptor como en el ligando (ver anexo A).

**Tabla 2.** Integrinas y asociaciones con algunos de sus ligandos. Modificado de Heino J 2007

$\beta_1$		$\beta_2$		$\beta_3$		Otras asociaciones	
Receptor	Ligando	Receptor	Ligando	Receptor	Ligando	Receptor	Ligando
$\alpha_1\beta_1$	Ln, Col	$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	$\alpha_{Ib}\beta_3$	Fg, Fn, vWF, Vn, Tsp	$\alpha_6\beta_4$	Ln
$\alpha_2\beta_1$	Col (Ln)	$\alpha_M\beta_2$	iC3b, Fg, Factor X, ICAM-1	$\alpha_V\beta_3$	Vn, Fg, Fn, vWF, Tsp	$\alpha_V\beta_5$	Vn, Ln
$\alpha_3^*\beta_1$	Ln, Col, Fn, En, Epi	$\alpha_X\beta_2$	iC3b, Fg			$\alpha_V\beta_6$	Fn
$\alpha_4\beta_1$	Fn, VCAM1					$\alpha_4\beta_7$	VCAM-1, Fn, IIIc5, MAdCAM-1
$\alpha_6^*\beta_1$	Ln					$\alpha_E\beta_7$	+
$\alpha_7^*\beta_1$	Ln					$\alpha_V\beta_8$	Vn
$\alpha_8\beta_1$	Vn, Fn						
$\alpha_9\beta_1$	Tenascina						
$\alpha_V\beta_1$	Vn, Fn						

Ln, laminina; Col, colágena; Fn, fibronectina, En, Entactina; Epi, Epiligrina; Fg, Fibrinogeno; vWF, Factor de von Willebrand; Vn, Vitronectina; Tsp, Trombospondina; ICAM; Molécula de adhesión intercelular.  
 \* Algunas subunidades pudieron surgir de empalme alternativo de un mRNA precursor.  
 + se desconoce su ligando

#### D. Colágena

La colágena es una glicoproteína constituida por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ) que al unirse forman un monómero con estructura helicoidal. Cada cadena polipeptídica  $\alpha$  en la colágena tiene 3 aminoácidos por vuelta y cada tercer aminoácido de cada cadena específica en una triple hélice de colágena hace contacto estrecho con las otras cadenas  $\alpha$  a lo largo del eje central de la triple hélice. Las hélices de colágena contienen un modo característico de aminoácidos de glicina (G) en cada tercera posición. Debido a que sólo las cadenas laterales de este aminoácido se pueden ajustar en estas posiciones. La particularidad de la colágena es la secuencia de aminoácidos de repetición G-X-Y, donde G es glicina y X-Y puede ser

cualquier aminoácido pero frecuentemente X es prolina y Y es hidroxiprolina (Horton Robert H, *et al.*, 1995). Durante la biosíntesis de la proteína, existen modificaciones post-traduccionales, como son la hidroxilación y glucosilación. La hidroxilación se da en los aminoácidos prolina y lisina mediante enzimas hidroxilasas. Por ejemplo, la enzima prolilhidroxilasa cataliza la incorporación de grupos -OH al aminoácido prolina en la procolágena (cadena polipeptídicas que darán origen a la colágena) y la glucosilación se lleva a cabo en el residuo de lisina después de que fue hidroxilada (Hunt Tomas K 1983 y Luque José 2008).

Las colágenas son las proteínas más abundantes de la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos, excepto del sistema nervioso. Hoy en día, se han identificado 29 tipos de colágenas, que de acuerdo a su estructura y función se han clasificado en ocho familias (**Tabla 3**) (Van Der Rest M y Garrone Robert 1991, Heino J 2007 y Söderhäll Cilla *et al.*, 2007)

**Tabla 3.** Los 29 tipos de colágenas agrupadas en ocho familias.

Familias de colágenas	Tipos de colágenas
Colágenas fibrilares	I, II, III, V, XI, XXIV y XXVII
Colágenas que no forman fibrillas (Forman laminas basales)	IV
Colágenas asociadas a fibrillas con triple hélice interrumpidas (FACIT por sus siglas en inglés)	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII y XXVI
Colágenas de triple hélice que tienen un dominio transmembranal.	XIII, XVII, XXIII y XXV.
Colágenas que forman redes hexagonales.	VIII y X
Colágenas que forman fibrillas de anclaje.	VI
Colágenas que forma microfibrillas con glóbulos en cuenta de rosario.	VI, XXVIII y XXIX
Colágenas llamadas multiplex (Múltiples dominios en la triple hélice interrumpidos)	XV y XVIII

Se sabe que cada tipo de colágena es reconocida por uno o más receptores tipo integrinas (**Tabla 4**). Si bien, las integrinas son de los principales receptores que interactúan con la colágena se han identificado a otros receptores que pueden interaccionar con esta proteína, llevando a cabo varias funciones celulares, en algunos casos de forma independiente a las integrinas (Ver anexo B).

**Tabla 4.** Las ocho familias de colágenas y sus respectivos receptores integrinas. Modificado de Heino J 2007

Familia de colágenas	Tipos de colágenas	Receptor integrina
Fibrilares	Monómeros de colágena I, II, III, V Colágena I fibrilar Colágena I desnaturalizada C-propeptidos en colágena I C-propeptidos en colágena II Monómeros de colágena XI	$\alpha_2 \beta_1$ ( $\alpha_1 \beta_1$ , $\alpha_{10} \beta_1$ , $\alpha_{11} \beta_1$ ) $\alpha_2 \beta_1$ , $\alpha_{11} \beta_1$ $\alpha_5 \beta_1$ , $\alpha_V \beta$ $\alpha_2 \beta_1$ $\alpha_2 \beta_1$ $\alpha_2 \beta_1$
No forman fibrillas	Colágena IV	$\alpha_1 \beta_1$ , $\alpha_{10} \beta_1$ ( $\alpha_2 \beta_1$ , $\alpha_{11} \beta_1$ )
FACIT	Colágena IX Colágena XVI	$\alpha_1 \beta_1$ , $\alpha_2 \beta_1$ , $\alpha_{10} \beta_1$ y $\alpha_{11} \beta_1$ , $\alpha_1 \beta_1$ , $\alpha_2 \beta_1$
Forman redes Hexagonales	Colágena X Colágena VIII	$\alpha_2 \beta_1$ $\alpha_1 \beta_1$ , $\alpha_2 \beta_1$
Microfibrillas con glóbulos en cuenta de rosario	Colágena VI	$\alpha_1 \beta_1$ , $\alpha_{10} \beta_1$ ( $\alpha_2 \beta_1$ , $\alpha_{11} \beta_1$ )
Fibrillas de anclaje	Colágena VII Región NC1	$\alpha_2 \beta_1$
Con dominio transmembranaral	Colágena XIII Colágena XVII Colágena desnaturalizada XV	$\alpha_1 \beta_1$ $\alpha_5 \beta_1$ , $\alpha_V \beta$
Multiplex	Colágena XVIII región NC1	$\alpha_5 \beta_1$ , $\alpha_V \beta_3$ , $\alpha_V \beta_5$

La colágena intersticial más abundante, y que se ha estudiado más extensamente es la colágena tipo I. Esta proteína está constituida por dos cadenas  $\alpha 1(I)$  y una cadena  $\alpha 2(I)$ . Estas cadenas difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. La colágena tipo I es sintetizada por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos y se encuentra principalmente en la dermis, hueso, el tendón, la dentina y la córnea. En la dermis la colágena tipo I constituye entre el 80 y 90% de las proteínas. La alta concentración de la colágena tipo I contribuye a la gran fuerza de tensión de la dermis y su resistencia a la deformación (Hunt Tomas K 1983).

Por otra parte, la colágena tipo I tiene una variedad de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Por ejemplo, se utiliza para cubrir quemaduras o heridas o como un sustrato para la ingeniería de tejidos. La proteína, presenta una antigenicidad muy baja, así como una baja respuesta inflamatoria y citotóxica, buenas propiedades hemostáticas, promueve el crecimiento celular y muestra un interesante comportamiento biológico cuando está en contacto con las células o tejidos. Dadas sus propiedades, la colágena tipo I se ha utilizado para formar un biofármaco llamado colágena-polivinilpirrolidona (López T *et. al.*, 2009).

### **E. Colágena-polivinilpirrolidona (colágena-PVP)**

La colágena-PVP, es un biofármaco que consiste en la mezcla de colágena tipo I obtenida de la piel porcina y el polímero polivinilpirrolidona (PVP). Estas dos moléculas son irradiadas por rayos gamma, para su unión y esterilización. La polivinilpirrolidona es un polímero inerte, al cual no se le han comprobado efectos tóxicos o carcinogénicos. Este polímero ha sido utilizado desde los años 30 como un expansor del plasma sanguíneo y actualmente se emplea como vehículo de productos

farmacéuticos. La finalidad de mezclar la colágena tipo I con el polímero polivinilpirrolidona, fue que el polímero favoreciera las interacciones entre la colágena implantada y la matriz presente del tejido donde fuera colocada (Krötzsch Gómez F.E 1995).

Una de las propiedades de la colágena-PVP es que no forma un gel cuando se diluye en un medio de cultivo a 37°C a pH neutro, a diferencia de la colágena (Furuzawa Carballada J *et. al.*, 2002). La utilización de rayos gamma para la esterilización de colágena-PVP podría cambiar la conformación de la colágena tipo I. Estudios como los de Chimal-Monroy y Cols. 1997 demuestran que el patrón electroforético de la colágena, colágena más PVP (sin irradiar) y colágena-PVP son ligeramente diferentes en las movilidades relativas de los componentes colagénicos de dicho biofármaco, ya que las cadenas  $\alpha_1(I)$  y  $\alpha_2(I)$  de la colágena-PVP migraron ligeramente más arriba que las mismas cadenas de la colágena tipo I. Por otro lado, las proporciones de las bandas de colágena-PVP que se apreciaron en el electroferograma fueron distintas a la que se resolvió con solo la colágena. Asimismo, al mezclarse la colágena y la PVP sin ningún tratamiento con radiación gamma, no mostraron cambios en las movilidades relativas ni en la cantidad de proteína resuelta por electroforesis en comparación con la colágena por sí sola. Por otro lado, la colágena y la colágena-PVP presentaron diferentes estructuras en la matriz que se formó después de ser liofilizados, donde la colágena mostró una geometría más regular que la colágena-PVP (Chimal-Monroy *et. al.*, 1997 y Rodríguez Fuentes Nayelí Datos no publicados).



La colágena-PVP se ha utilizado para el tratamiento de cicatrices hipertróficas en donde actúa como un fibrolítico, al disminuir los niveles elevados de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas tales como IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , TGF-  $\beta$ 1 y PDGF. A su vez, la regulación de factores proinflamatorios (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ), trae como consecuencia una disminución en la expresión de dos moléculas de adhesión que participan de manera importante durante la inflamación; la E-selectina (ELAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) (Kröttsch Gómez F *et al.*, 1998).

La colágena-PVP también ha demostrado tener participación directa en los procesos reparativos de la piel. Observándose, que una herida quirúrgica tratada con colágena PVP en ratas, induce a una remodelación mayor en el sitio de la lesión y conlleva a una mejor disposición de las fibras de la colágena muy similar a la arquitectura de la piel normal (Kröttsch Gómez F.E 1995).

Por otro lado, el tratamiento de fracturas con colágena-PVP en ratas acelera el proceso de reparación, al promover el reemplazamiento del callo fibroso, por callo cartilaginoso y este último por callo óseo en menor tiempo que los controles (Sin tratamiento con colágena-PVP). Asimismo, este fenómeno se ve asociado a un incremento en la producción de la osteopontina y la osteonectina, moléculas de la matriz ósea relacionadas con la formación y mineralización del hueso. Por lo tanto, colágena-PVP tuvo un efecto osteoconductor, esto es, que permitió el establecimiento de todas las condiciones ambientales para la regeneración ósea, tales como la presencia de una matriz extracelular adecuada que favoreció la invasión y migración de células osteoprogenitoras (Chimal-Monroy *et. al.*, 1997).

Por su parte Krötzsch Gómez F.E 1995 encontró que la síntesis de colágena se incrementó, mientras que la actividad colagenolítica disminuyó en cultivos celulares de fibroblastos de piel de rata tratados con colágena-PVP, estas actividades fueron diferentes a la que presentaron sus componentes por separado colágena y PVP, en donde la síntesis de colágena en presencia de PVP no presentó cambios significativos con respecto al control. Por su parte, la colágena adicionada a los cultivos presentó una ligera disminución de síntesis de esta proteína. Con respecto a la actividad colagenolítica, ésta se incrementó en presencia de colágena, mientras que con PVP se presentó una disminución, sin embargo, ésta no supero al valor mostrado cuando se trato con colágena-PVP. Lo que sugiere que colágena-PVP se comporta como una entidad diferente a nivel fisicoquímico y bioquímico. A su vez, este estudio revela que colágena-PVP modifica el metabolismo de la colágena.

El mecanismo de acción de colágena-PVP, es a través de la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas, permitiendo que posteriormente se alcance la homeostasis del tejido. No obstante, que se ha identificado parcialmente el mecanismo de acción, aun se desconoce la vía de reconocimiento de colágena-PVP por las células.

Por todo lo anterior, en el presente estudio se valoró si colágena-PVP actuaría a través de receptores tipo integrinas, como lo hacen las colágenas intersticiales. Para ello se utilizaron los cultivos de fibroblastos en una matriz de colágena (cultivos 3D). Dado que en este tipo de cultivos se manifiestan las interacciones célula-matriz evidenciado por la contracción de la matriz de colágena.

### **III. Justificación**

Se sabe que el proceso inflamatorio crónico asociado a fibrosis cutánea se ve interrumpido por la acción de la colágena-PVP disminuyendo la producción parcial de factores fibrogénicos, por lo que se alcanza la recuperación de la homeostasis del tejido. No obstante, se desconoce la vía de reconocimiento del biofármaco por las células y dado que diferentes grupos celulares interactúan con la matriz extracelular por medio de las integrinas. Es posible, que la colágena-PVP se reconozca a través de este tipo de receptores, lo cual puede evidenciarse por medio de ensayos donde se manifieste la interacción célula-matriz extracelular.

### **IV. Hipótesis**

La colágena-PVP actúa sobre fibroblastos humanos a través de receptores tipo integrina disminuyendo la contracción de la matriz.

### **V. Objetivo general**

Evaluar si colágena-PVP interacciona con receptores tipo integrinas, en un modelo tridimensional de fibroblastos cutáneos humanos.

### **VI. Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto de la colágena-PVP en el fenómeno de contracción en cultivos tridimensional de fibroblastos.
- Valorar el efecto de la colágena-PVP sobre la expresión de las integrinas para colágenas intersticiales, a través de la técnica de inmunofluorescencia aplicada a los cultivos en 3D.

## **VII. Material y método**

### **Cultivo celular de fibroblastos dérmicos humanos**

Los cultivos de fibroblastos se aislaron de las biopsias de piel de párpado de pacientes de sexo femenino, con edades entre los 45 y 56 años. Las biopsias fueron obtenidas durante las resecciones cutáneas cosméticas de pacientes que asistieron al servicio de cirugía plástica del hospital 20 de noviembre (ISSSTE) y que no comprometían el resultado del procedimiento, ya que era tejido de desecho, aún así se solicitó el consentimiento a cada uno de los pacientes.

### **Técnica de derivación celular**

1. A las biopsias de piel se les eliminó primero el exceso de grasa, sangre y tejido necrótico.
2. Después, se realizaron lavados con medio de cultivo D-MEM suplementado con antibióticos (100U/mL de penicilina y 5 µg/mL de estreptomicina).
3. El tejido se cortó en fragmentos muy finos de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> transfiriendo éstos a una solución de colagenasa bacteriana tipo IV (SIGMA) al 0.25% en solución de Hanks.
4. La mezcla se colocó en un tubo cónico de 15 mL y se incubó aproximadamente 2 horas a 37°C en baño maría, agitando periódicamente con el homogenizador orbital.
5. Pasado el tiempo, se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se eliminó la colagenasa por decantación y al disgregado se le adicionaron 5mL de medio de cultivo D-MEM suplementado con antibióticos, glutamina 2mM y suero fetal bovino al 10%.

6. Se colocaron 2.5 mL de la suspensión celular en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Costar® NY, USA) y se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.
7. A las 24 horas de incubación, se eliminó el medio de cultivo y fragmentos de tejido flotantes. Se adicionó medio D-MEM suplementado y el cultivo celular se mantuvo incubando por 3 días más, eliminando el medio y restituyendo con medio nuevo. Así, sucesivamente hasta que el cultivo llegó a su confluencia, aproximadamente a los 10 días.
8. A partir del cultivo primario se generaron subcultivos seriados. Para ello, una vez que el cultivo llegó a su confluencia se despegaron las células de la botella, adicionando una solución quelante (EDTA, ácido etilendiamino disódico) por 3 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminó la solución quelante y se agregó tripsina al 0.25% en EDTA incubando a 37°C por 3 o 4 minutos. Una vez que las células se observaron con morfología esférica, con la ayuda de un homogenizador se agitó cuidadosamente la superficie de la botella para ayudar a que las células se desprendieran. La tripsina se neutralizó con D-MEM suplementado y la suspensión celular se colocó en botellas de cultivo de mayor tamaño (75 cm<sup>2</sup>) obteniéndose así el primer pase de cultivo.
9. Se trató de la misma manera en los siguientes pases, hasta llegar a los pases sexto, séptimo y octavo, que fueron utilizados para realizar los cultivos en tres dimensiones.

### Cultivos en tres dimensiones (3D)

Para los cultivos tridimensionales se utilizó como sustrato colágena tipo I extraída de la piel porcina. La colágena se dializó con ácido acético 5 mM y se esterilizó por filtración a través de una membrana con poros de 0.45  $\mu\text{m}$ . Mediante la cuantificación de hidroxiprolina se determinó la cantidad de colágena. La colágena se diluyó en ácido acético 5mM hasta una concentración de 5mg/mL (esta concentración fue la óptima para preparar los cultivos en 3D por ensayos previos). Los cultivos fueron preparados en cajas de 24 pozos marca (*Nunc*<sup>™</sup>, NY, USA), siguiendo la metodología propuesta por Cornelia Mauch *et. al.*, 1988 y 1993, así como de Delvoye P *et. al.*, 1983 con algunas modificaciones.

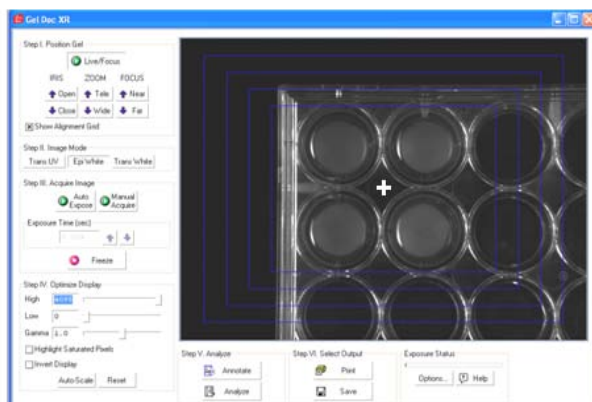
- a) Se mezcló 1.15 mL de medio D-MEM 1.5X (D-MEM concentrado una y media veces con glucosa y suplementado con glutamina 2mM, antibióticos 100U/mL de penicilina y 5  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina y suero fetal bovino al 10%) con 0.4 mL de colágena (5 mg/mL) y 0.25 mL de una suspensión celular de fibroblastos ( $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ ). Los fibroblastos utilizados se obtuvieron de una biopsia de piel de parpado de un paciente femenino de 48 años de edad en los pases sexto, séptimo y octavo. Cabe aclarar que los fibroblastos obtenidos de las demás muestras de piel fueron utilizados para estandarizar la técnica.
- b) Finalmente, cada cultivo fue tratado con colágena-PVP, anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta_1$  integrina humana (mAb 1987) para estudios de inhibición o con medio de cultivo como control. Adicionando, durante la preparación de los cultivos 0.2mL de colágena-PVP a diferentes

concentraciones 0.5, 1.0 y 3.0% y 0.2mL de medio de cultivo al control. El anticuerpo anti-subunidad  $\beta_1$  integrina (1/500) se adicionó durante la preparación de los cultivos y en otro ensayo una vez que polimerizó la colágena, una hora después de que los cultivos se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

- c) Una vez que polimerizó la colágena, con la ayuda de una aguja estéril se despegaron los geles de las paredes del pozo, evitando dañarlos o romperlos, con la finalidad de contar con geles de flotación libre.

### Evaluación de la contracción de la matriz de colágena en los cultivos 3D

La contracción de la matriz de colágena, se evaluó midiendo el área del gel a diferentes tiempos de incubación. Considerando, que de inicio la matriz ocupaba el área total del pozo (201 mm<sup>2</sup>). Los cultivos se monitorearon a las 12, 15, 18, 21, 24, 36 y 39 hrs horas de incubación. Tomando, imágenes con ayuda del foto documentador Gel-Doc de BIO- RAD<sup>®</sup> (**Figura 5a**). Las imágenes tomadas se analizaron con el software Axiovision del microscopio Zeiss (Carl Zeiss, AB, Alemania), con el cual se delimitó el perímetro del gel y con ello se calculó el área (**Figura 5b**).



(a)



(b)

**Figura 5.** Foto documentador Gel-Doc de BIO-RAD<sup>®</sup>. **A.** Las imágenes de los geles se obtuvo fotografiando los cultivos en 3D a diferentes tiempos de incubación. **B.** Con el software Axiovisión se delimitó el perímetro de gel y con ello se calculó el área.

Para realizar las diferentes técnicas histológicas, en paralelo, se realizó un ensayo bajo las mismas condiciones previamente descritas en los cultivos 3D de fibroblastos en octavo pase. Donde los geles fueron liberados del pozo por medio de una pipeta de 500µl a las 12, 24, 36 y 48hrs de incubación conservándose de acuerdo a lo especificado en cada técnica histológica.

### **Histomorfología de los cultivos tridimensional 3D**

Los geles de colágena tratados con colágena-PVP y control (previamente descritos) de 48 horas de incubación, fueron fijados e incluidos en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes seriados de 5µm montándose en laminillas de vidrio y fijándose con acetona fría por tres minutos. Después se lavó con agua destilada y se tiñó con hematoxilina de Harris por cinco minutos seguido de un lavado con solución saturada de carbonato de litio y agua destilada. Finalmente, se tiñó con eosina al 1% por dos minutos y se enjuagó con agua destilada. Las laminillas se observaron en el microscopio marca Zeiss (Carl Zeiss, AB, Alemania) a un aumento de 20X.

### **Inmunofluorescencia indirecta**

Los geles obtenidos de los cultivos 3D tratados con las diferentes concentraciones de colágena-PVP (0.5, 1.0 y 3.0%), anticuerpo anti-subunidad  $\beta_1$  integrina o con medio de cultivo (control) previamente descritos. Se conservaron en un medio de inclusión para congelación sumergiéndose en nitrógeno líquido por 15 segundos y almacenándose a  $-70^{\circ}$ . Se realizaron cortes seriados de 5 µm con ayuda de un criostato. Dichos cortes se montaron sobre laminillas de vidrio previamente tratadas con silano. Posterior a esto, se realizó una segunda fijación con acetona



fría por 3 min. eliminando el exceso con lavados de PBS 1X (Sol. Buffer salina de fosfatos). Después se adicionó estreptavidina por 15 min. conservando las laminillas en una cámara húmeda, evitándose así que las muestras se secan. Pasado el tiempo se hicieron lavados con PBS 1X y después se realizó un bloqueó con biotina por 15 min. Transcurrido el tiempo se lavó con PBS 1X y se bloqueó con albumina sérica bovina (1mg/mL) por 30 min. con el objeto de eliminar la señal inespecífico de fondo. El exceso de albumina se eliminó sacudiendo las laminillas e inmediatamente se colocó el anticuerpo primario de ratón anti- $\alpha_2$  integrina humana (mAb 1950) a una dilución (1/100) en una laminilla y en otra se adicionó el anticuerpo primario anti-prolilhidroxilasa preparado en ratón anti-humana (CLONE 5B5) a una dilución (1/50) durante dos horas. Se incluyó también un control negativo a éste no se le agregó el anticuerpo primario, únicamente se adicionó albumina sérica bovina. Al terminó de las dos horas se realizaron lavados con PBS 1X y se colocó un anticuerpo secundario biotinado de amplio espectro (anti-ratón) por una hora. Transcurrido el tiempo las laminillas se lavaron con PBS 1X y se adicionó estreptavidina-fluoresceína (10 $\mu$ g/mL) durante 10 min. seguido de lavados con PBS 1X. Por último, se colocaron entre 6 y 7  $\mu$ l del reactivo Vectashield con Dapi (4', 6'-diamino-2-fenilindol dihidroclorhidro) con el cual se marcaron los núcleos celulares de los fibroblastos. Las laminillas fueron examinadas utilizando un microscopio para fluorescencia Zeiss (Carl Zeiss, AB, Alemania), la luz de excitación (485 y 400nm de longitud para FITC y DAPI, respectivamente) se obtuvo a partir de una lámpara de Xenón. Se observaron con un aumento 20X y se fotografiaron. Las imágenes se analizaron utilizando el

software Axiovision del mismo microscopio, determinando la densitometría (intensidad luminosa de la fluorescencia emitida por cada proteína analizada) contemplando siempre un núcleo para asegurar que esta fluorescencia correspondiera a una célula y además se analizó el área que ocupaba la fluorescencia emitida. Finalmente, se calculó el cociente de la intensidad luminosa entre el área ocupada por dicha intensidad (densidad luminosa/área  $\mu\text{m}^2$ ), con esta medida se evidenció de manera cuantitativa la expresión de ambas proteínas.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de nuestros datos se utilizó el paquete Sigma Stat Versión 2.0 el cual sugirió las pruebas estadísticas de Mann Whitney y Student para el análisis de datos de las inmunofluorescencias y Tukey para el análisis de las áreas de los geles. Se utilizó una significancia de  $p < 0.05$ .

## VIII. Resultados

### Evaluación de la contracción de la matriz de colágena en presencia de colágena-PVP en geles de libre flotación.

Para nuestro estudio se prepararon los cultivos en tres dimensiones (3D) con fibroblastos en sexto, séptimo y octavo pase, derivados de una biopsia de piel de parpado de un paciente femenino de 48 años de edad. Se sembraron  $5.0 \times 10^4$  células con 2mg de colágena tipo I. Los cultivos se realizaron en cajas de cultivo de 24 pozos (área del pozo  $201\text{mm}^2$ ). Se monitoreó el área de la matriz de colágena a diferentes tiempos de incubación.

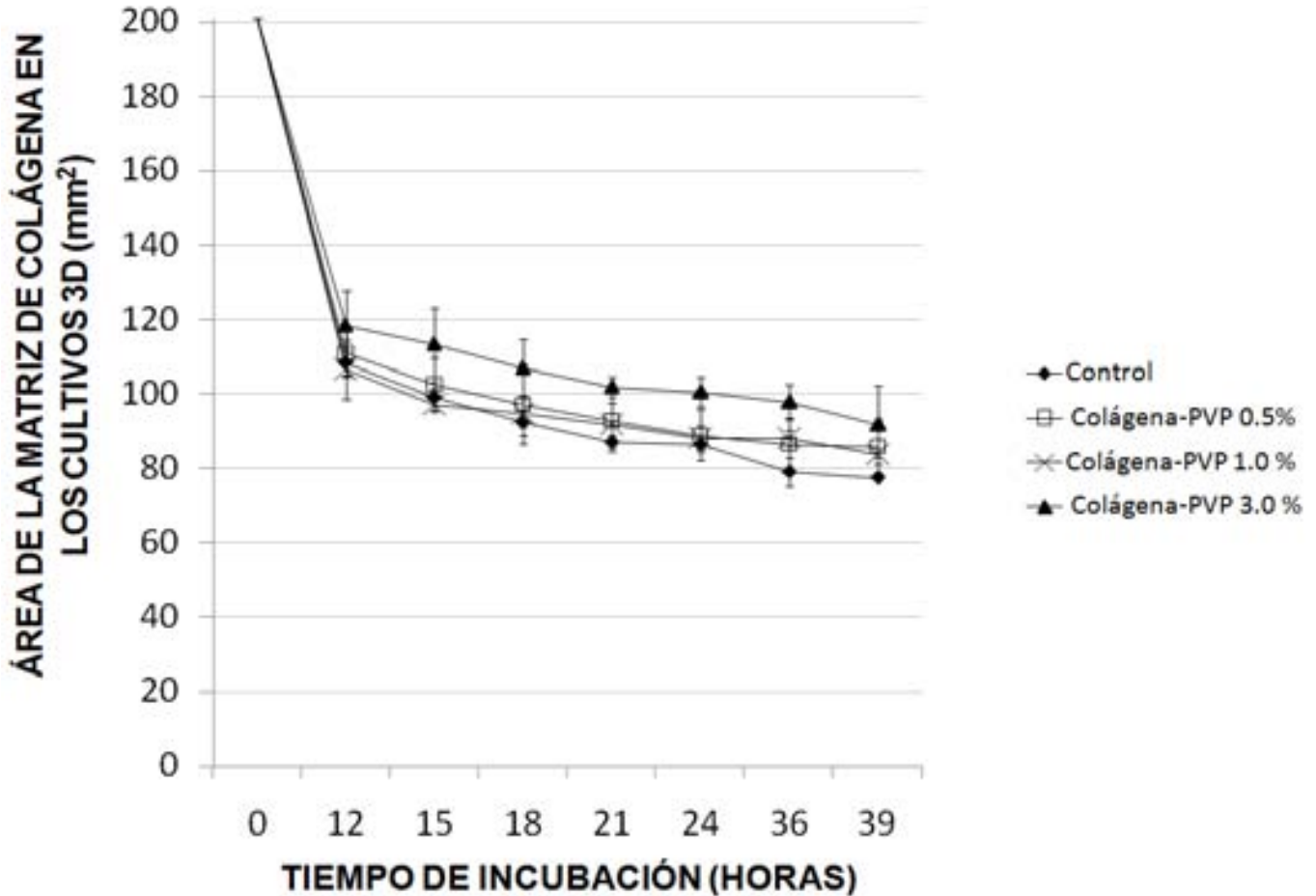
Cuando se sembraron los fibroblastos en la matriz de colágena, los fibroblastos colapsaron y reorganizaron la matriz hasta la formación de un cuerpo denso. La reducción en el área de la matriz de colágena, representaría la contracción del tejido conjuntivo intersticial en un proceso *in vivo* (Cornelia Mauch *et. al.*, 1988, Grinnell F, 2003 y Dallon JC y Ehrlich HP 2008).

En nuestro estudio, la contracción de la matriz de colágena se dio de manera gradual, observándose a partir de las 9 hrs de incubación, sin embargo, la mayor contracción se produjo entre las 12 y las 39 hrs. (**Figura 6**). Después de este tiempo los geles de colágena se rigieron perpendicularmente impidiendo su medición. Sin embargo, la matriz de colágena siguió contrayendo hasta que la contracción fue completada entre las 48 y 60 hrs (Dato no mostrado).



**Figura 6.** Contracción de los geles de colágena por fibroblastos de piel humana. Los cultivos en 3D fueron preparados en placas de 24 pozos de  $201 \text{ mm}^2$  de área y fotografiados a diferentes tiempos de incubación. De izquierda a derecha; 9, 24 y 39 hrs.

En los cultivos de colágena en 3D, primero se evaluó la contracción de la matriz de colágena en presencia de colágena-PVP a diferentes concentraciones 0.5, 1.0 y 3.0%. La contracción de la matriz se comportó igual tanto en presencia de colágena-PVP como en el control. Observándose que a las 12 horas de incubación la matriz de colágena disminuyó hasta alcanzar casi la mitad del área inicial pasando de  $201 \text{ mm}^2$  a  $110 \text{ mm}^2$ , posterior a este tiempo y hasta las 39hrs de incubación, la contracción fue mostrándose más lenta ya que el área de la matriz solo continuó reduciéndose  $30 \text{ mm}^2$  más. Colágena-PVP a una concentración de 3.0% parece contraer en menor proporción que el control, observándose una diferencia de área de casi  $10 \text{ mm}^2$  entre los dos grupos, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 7**). Además, se observó que el pase celular no fue un factor que pudiera influir en el fenómeno de contracción, dado que el comportamiento de la contracción descrito previamente fue similar aun cuando se utilizaron pases diferentes (Sexto, séptimo y octavo). Por lo que colágena-PVP no tuvo ni ningún efecto en la contracción de la matriz.

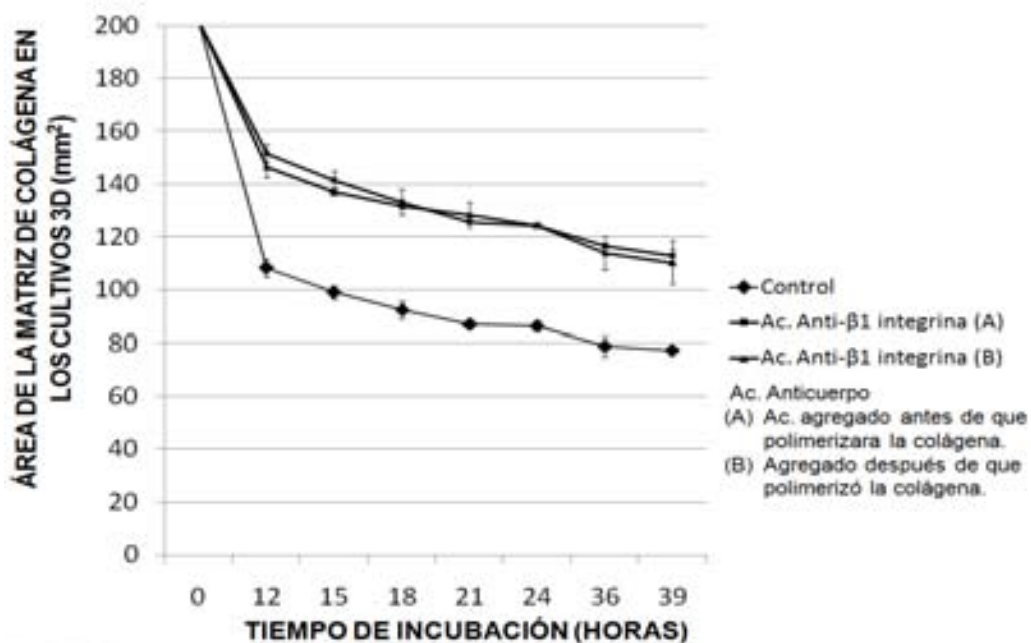


**Figura 7.** Contracción de los cultivos de colágena en 3D. Las áreas de los geles fueron medidas y expresadas como la media de triplicados por ensayo, las barras verticales representan la desviación estándar. Sólo se muestra la grafica de un ensayo representativo. La contracción en el control con respecto a los diferentes tratamientos con colágena-PVP (0.5, 1.0 y 3.0%) no mostraron cambios.

### Evaluación de la inhibición o retardo de la contracción de la matriz de colágena en los cultivos en 3D.

Se realizaron ensayos de inhibición o retardo de la contracción, adicionando a los cultivos en 3D un anticuerpo anti integrina  $\beta_1$ . El anticuerpo se colocó a los cultivos antes de que polimerizara la colágena y en otro ensayo se colocó una hora después de iniciada la incubación de los cultivos, ya que ha este tiempo la colágena ya había polimerizado.

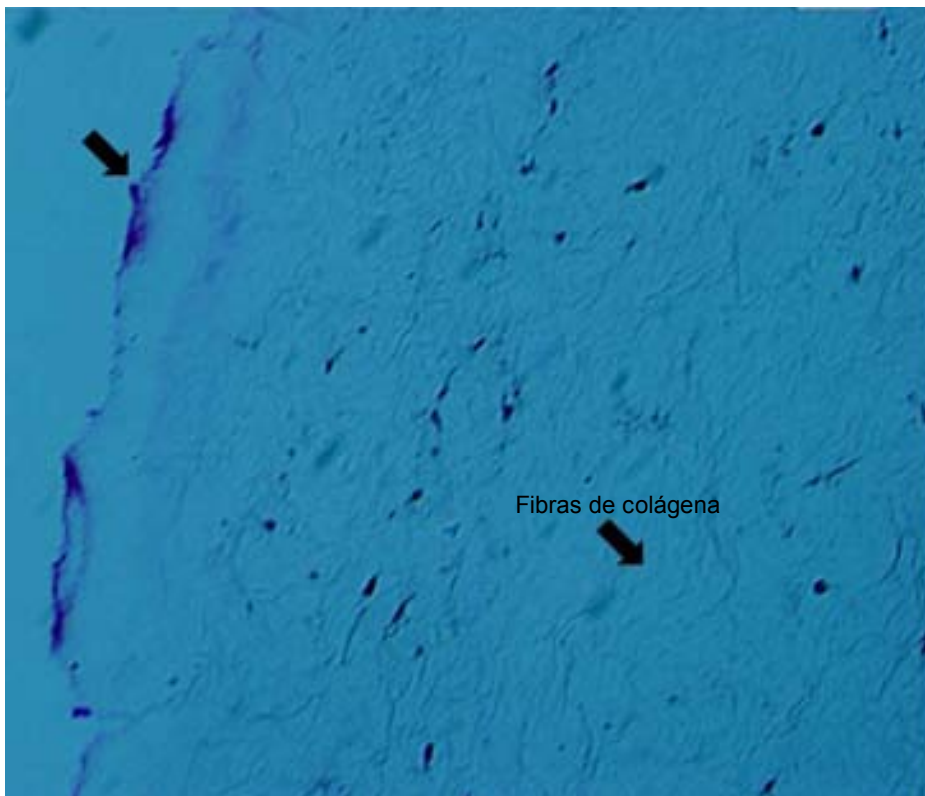
La presencia del anticuerpo produjo una menor contracción de la matriz de colágena con respecto al control en los diferentes tiempos de monitoreo. A las 12 hrs de incubación el control había contraído la matriz casi a la mitad del área inicial pasando de 201 a 100mm<sup>2</sup>, mientras que en presencia del anticuerpo la matriz de colágena solo había disminuido su área 50 mm<sup>2</sup> pasando de 201 a 150mm<sup>2</sup> (**Figura 8**). Éstas diferencias se mantuvieron en todo el tiempo de monitoreo y las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Con estos resultados se corrobora que los receptores de la familia  $\beta_1$  integrina juegan un papel importante en la contracción de la matriz (Langholz O y Cols. 1995). Por otro lado, la contracción de la matriz de colágena se comporto igual, cuando se adicionó el anticuerpo antes y después de que polimerizara la colágena, éste último resultado podría indicarnos que existe una continua neosíntesis de receptores ya que al adicionar el anticuerpo después de que polimerizara la colágena permitió determinarlo (**Figura 8**).



**Figura 8.** Retardo o inhibición de la contracción de la matriz de colágena tipo I por fibroblastos de piel humana. El área de la matriz de colágena en los cultivos tratados con el anticuerpo fue mayor que en el control en cada tiempo de monitoreo ( $p < 0.05$ ). La adición del anticuerpo antes y después de que polimerizara la colágena mostró el mismo comportamiento.

### Descripción histomorfológica de los cultivos tridimensionales (3D)

Con la finalidad de conocer si colágena-PVP interviene en la distribución y orientación de los fibroblastos dentro de la matriz de colágena, se realizó la histomorfológica de los cultivos 3D. Para ello, se utilizaron los geles de colágena de 48 horas de incubación los cuales fueron fijados e incluidos en parafina y con ayuda de la tinción de hematoxilina y eosina se evaluó la distribución celular. Observándose que las fibras de colágena que forman la matriz se alinean de forma perpendicular y los fibroblastos se orientan en la misma dirección que las fibras. Este arreglo espacial de los fibroblastos dentro de la matriz de colágena fue el mismo que presentaron los fibroblastos en los cultivos tratados con colágena-PVP a diferentes concentraciones, por lo que colágena-PVP no intervino en la distribución celular dentro de la matriz (Figura 9)



**Figura 9.**

Fotomicrografía de la matriz de colágena en los cultivos (3D). Los núcleos de los fibroblastos se aprecian alargados en oscuro, mientras que las fibras de colágena tipo I se observan en un color rosa. Tinción de hematoxilina y eosina

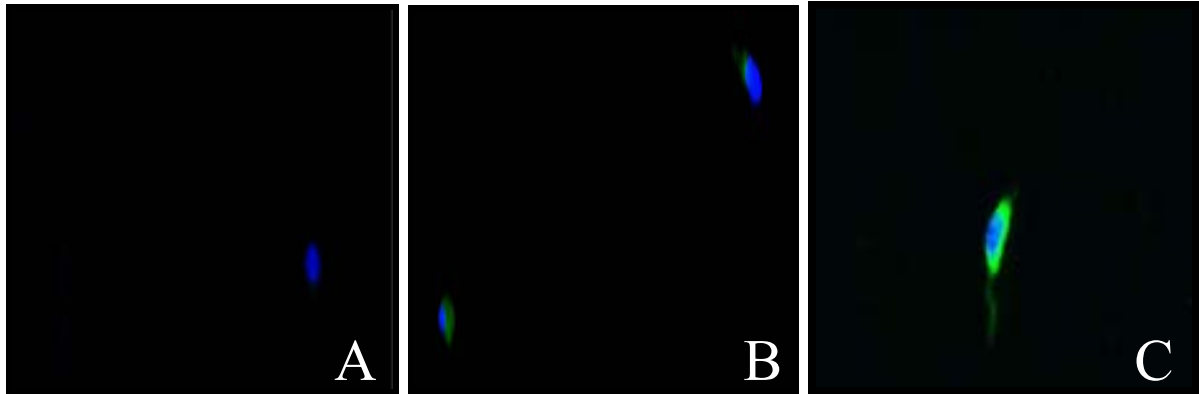
### Expresión de la subunidad $\alpha_2$ integrina y la enzima prolilhidroxilasa

La contracción del tejido de granulación en una herida, se lleva a cabo principalmente por la migración celular, dada por la interacción célula-matriz extracelular, esta interacción es mediada a través de receptores tipo integrinas (Sethi KK, *et al.*, 2002 y Barczyk M. *et al.*, 2010). Por ello, en el presente estudio se evaluó el patrón de expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina en presencia de colágena-PVP. Esta subunidad forma heterodímero con la cadena  $\beta_1$  (ver **Figura 3**). La  $\alpha_2\beta_1$  integrina es uno de los principales receptores que interactúan con la colágena intersticial tipo I (ver **Tabla 4**). Por otro lado, también se determinó si colágena-PVP podría modificar alguna actividad celular, como la síntesis de colágena. Para ello, se cuantificó la expresión de la enzima prolilhidroxilasa, como una medida indirecta de medir la síntesis de colágena. Esta enzima participa en la hidroxilación del aminoácido prolina durante la síntesis de esta proteína (Luque José 2008).

La expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina y la enzima prolilhidroxilasa se analizó por medio de inmunofluorescencia indirecta, en los cultivos en 3D de fibroblastos en octavo pase y tratados con colágena-PVP (0.5, 1.0 y 3.0%) o con medio (control) a las 12, 24 y 36 horas de incubación, así como también, en los cultivos donde se adicionó el anticuerpo anti integrina  $\beta_1$  antes de que polimerizara la colágena (debido a que no se observaron diferencias entre los dos ensayos antes y después de polimerizar la colágena) en éste último caso solo se analizaron los horarios de las 24 y 36hrs.



La intensidad de la fluorescencia de la enzima prolilhidroxilasa fue mucho más evidente que la que presentó la subunidad  $\alpha_2$  integrina, mostrada en color verde en ambos casos (FICT). Los núcleos celulares se observaron en azul DAPI (**Figura 10**).

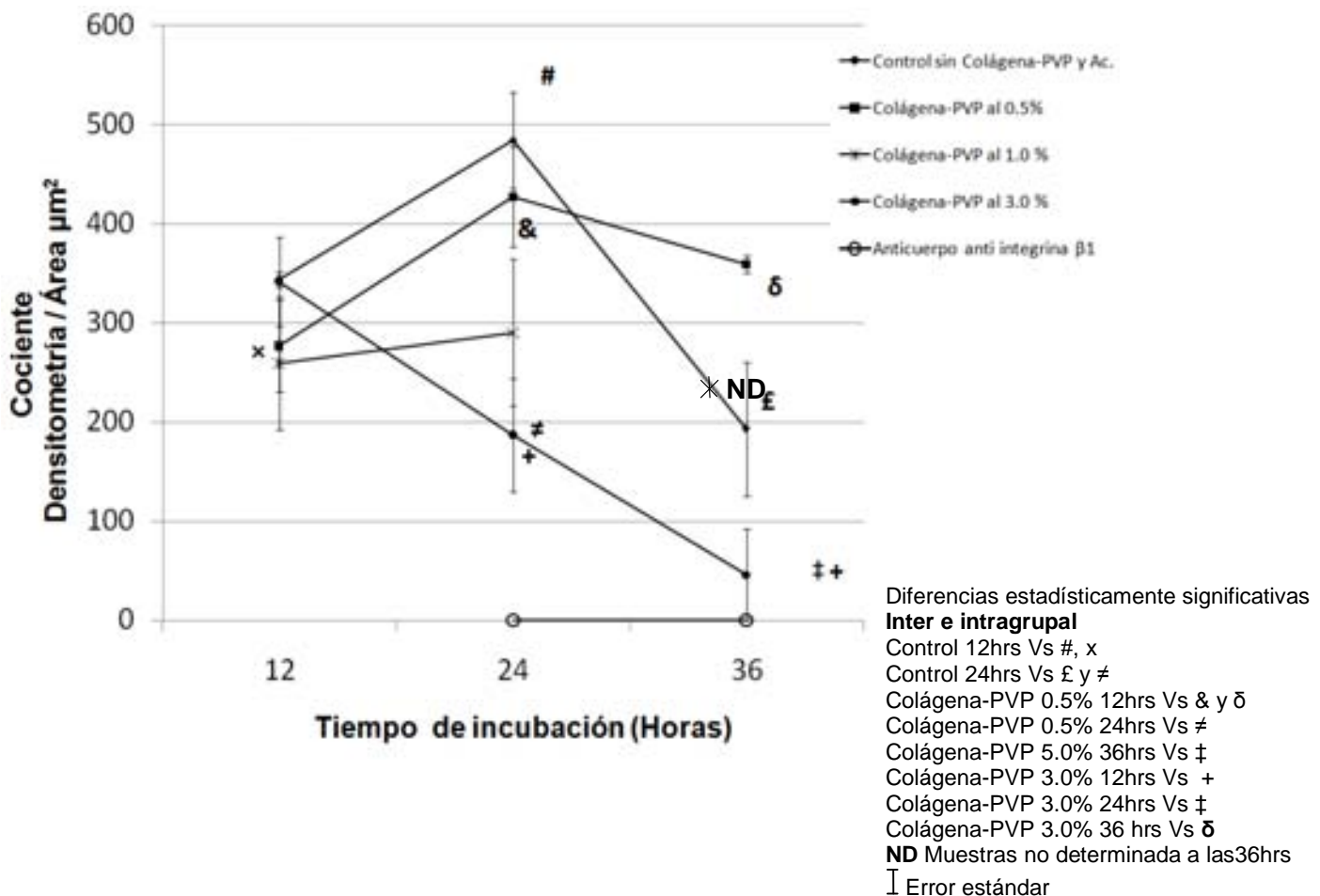


**Figura 10.** Fotomicrografía a 20X. Inmunofluorescencia indirecta de los sistemas en 3D. En azul (DAPI) se observan los núcleos de los fibroblastos. **A.** Blanco, sólo se observan los núcleos en azul (DAPI) y no hay marca para fluoresceína (FICT). **B.** Expresión de  $\alpha_2$  integrina en verde (FICT). **C.** Expresión de la enzima prolilhidroxilasa en verde (FICT). La evaluación cuantitativa de ambas proteínas, se realizó considerando los núcleos presentes en tres campos por laminilla. Solo se muestra una imagen representativa.

### Expresión de la subunidad $\alpha_2$ integrina

En el control la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina incremento de las 12 a las 24 hrs de monitoreo, para después disminuir hasta las 36 hrs, mostrándose un pico de los niveles máximos de expresión a las 24 hrs (variaciones estadísticamente significativas). El comportamiento en la expresión de  $\alpha_2$  integrina en presencia de colágena-PVP al 0.5% fue similar al control. Sin embargo, en presencia de colágena-PVP al 3.0% la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  fue disminuyendo de las 12 a las 39hrs de monitoreo, ésta disminución fue estadísticamente significativa. Con respecto a la expresión de  $\alpha_2$  integrina en presencia de colágena-PVP al 1.0% se presentó un comportamiento muy similar al de colágena-PVP al 3.0%, sin embargo, no fue tan claro como en este último (**Figura 11**). Estos resultados indican que colágena-PVP

por algún motivo modifica la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina, sin embargo, esta modificación no alteró la contracción de la matriz, ya que contrajeron igual los cultivos tratados con colágena-PVP al 3% y el control (**Figura 7**). Por otro lado, en los cultivos tratados con anti integrina  $\beta_1$  no se evidenció la subunidad  $\alpha_2$  integrina, este último resultado puede deberse a que el anticuerpo podría detectar a la subunidad solo en el heteródimero, aunque la información correspondiente del anticuerpo no lo especificaba (**Figura 11**).

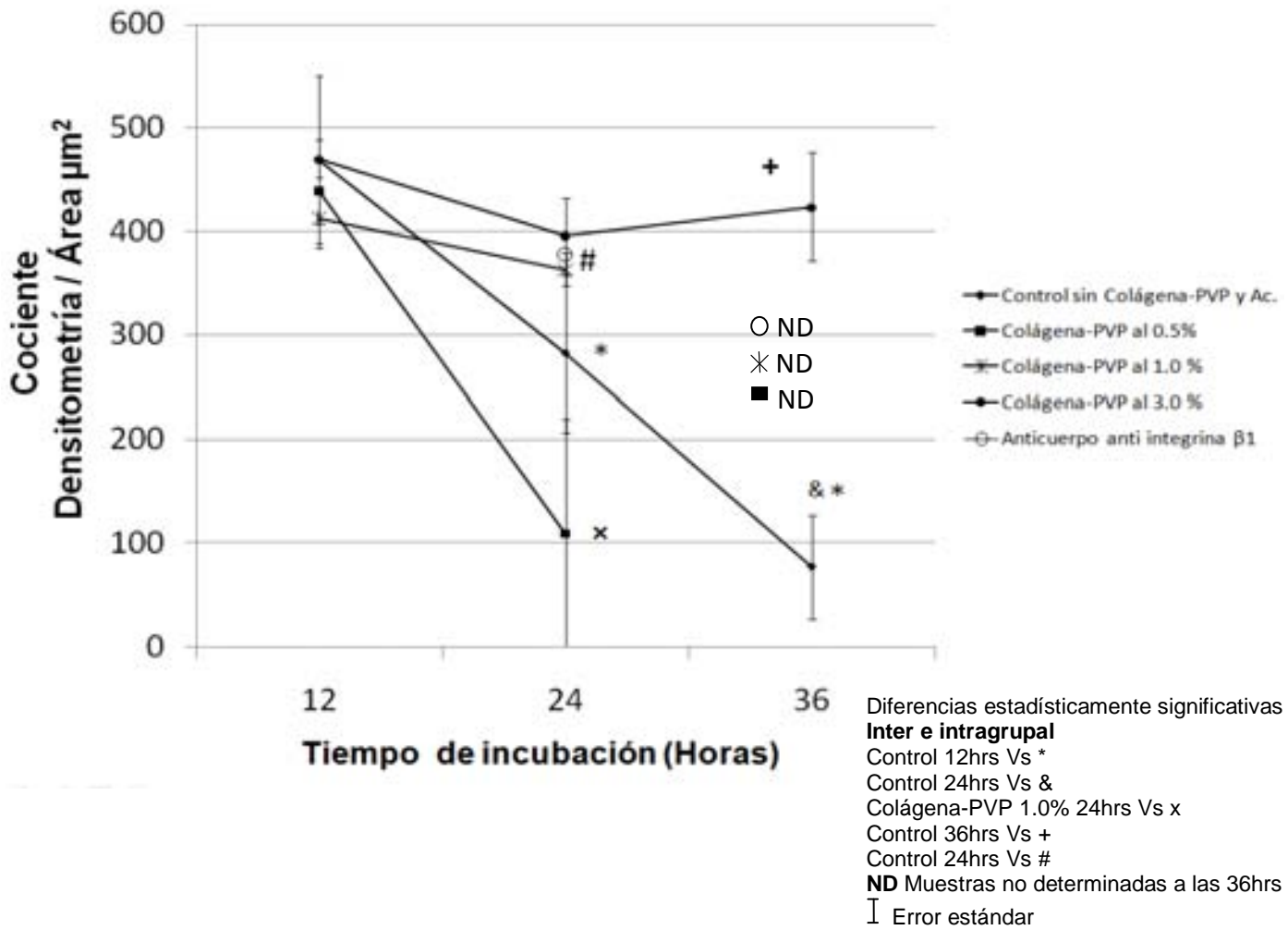


**Figura 11.** Cociente de densitometría/área expresada por la subunidad  $\alpha_2$  integrina. Dicha proteína presentó un pico máximo de expresión a las 24hrs tanto en el control como con colágena-PVP al 0-5%. Sin embargo, en presencia de colágena-PVP al 3.0 % la expresión de  $\alpha_2$  fue disminuyendo como avanzaba la contracción, un comportamiento similar a este último se observó en presencia de colágena-PVP al 1.0 %. **ND** representa muestras donde no hubo tejido ( $p < 0.05$  análisis estadístico de Mann Whitney y  $t$ -student)

### **Expresión de la enzima prolilhidroxilasa**

Con respecto a la expresión de la enzima prolilhidroxilasa, ésta fue disminuyendo conforme de las 12 a las 39 hrs de monitoreo, este comportamiento se observó tanto en el control, así como en los cultivos tratados con colágena-PVP al 0.5%. Sin embargo, en presencia de colágena-PVP al 3.0 y 1.0% la expresión de la enzima prolilhidroxilasa se mantuvo casi constante durante la contracción de la matriz (**Figura 12**). Por lo que, colágena-PVP si parece modificar la actividad celular, en el caso particular de la síntesis de colágena.

Por otro lado, la expresión de la enzima prolilhidroxilasa fue menor en los cultivos tratados con anti integrina  $\beta_1$  a las 24 hrs de incubación en comparación con el control a las 12hrs (**Figura 12**). Esta ultima comparación, es considerando que en estos horarios de las 12 y 24 hrs, el área de la matriz de colágena casi fue similar en ambos grupos (**Figura 8**). Sin embargo, a pesar que en los cultivos tratados con anticuerpo la matriz de colágena seguía siendo mayor al control, la expresión de prolilhidroxilasa fue menor. Por lo que, al parecer la inhibición del receptor  $\beta_1$  integrina podría influir en la disminución de la síntesis de colágena.



**Figura 12.** Expresión de la enzima prolilhidroxilasa. En los sistemas 3D la síntesis de colágena fue disminuyendo conforme avanzaba la contracción tanto en el control como con colágena-PVP al 0.5%, sin embargo, en presencia de colágena-PVP al 3.0% la síntesis de colágena se mantuvo constante. ( $p < 0.05$  análisis estadístico de Mann Whitney y  $t$ -student)

## IX. Discusión

### Efecto de la colágena-PVP en la contracción de la matriz de colágena.

La contracción en una herida consiste es la aproximación de los bordes de la herida dada por la compactación del tejido de granulación. Las interacciones célula-matriz extracelular, célula-célula y matriz-matriz proporciona una red de vínculos a través de la herida, ésta red le sirve a los fibroblastos y miofibroblastos para que la fuerza de tracción generadas cuando migran sobre la matriz, se propague por toda la herida. Estas interacciones se dan entre las fibras de actina del citoesqueleto celular y la matriz a través de integrinas principalmente. La contracción se ha podido estudiar *in vitro* gracias a los cultivos en tres dimensiones (3D). En donde se observó, que cuando se siembran fibroblastos sobre una matriz de colágena, los fibroblastos colapsan y reorganizaron la matriz hasta la formación de un cuerpo denso dada por la activa movilidad de las células (Klein CE *et. al.*, 1991, Clark Richard A.F 1996, Grinnell F 2003 y Dallon JC y Ehrlich HP 2008).

Al evaluar el efecto de la colágena-PVP en la contracción en los cultivos en 3D no se observó inhibición, retardo o aceleración de ésta (**Figura 7**), por lo tanto, la actividad moduladora en el metabolismo celular de la colágena-PVP aparentemente no reside en su capacidad de interaccionar con receptores de colágenas intersticiales como las integrinas. Posiblemente, esto se deba a que la colágena-PVP es rápidamente degradada por las enzimas constitutivas del organismo que regularmente se encuentran presentes en la región donde se administra farmacológicamente, como lo demuestra el trabajo de Nayelí Rodríguez

(Datos no publicados) en donde a una concentración de 6 ng de la enzima metaloproteasa-1 (MMP-1) y con tan sólo 15 min de incubación, 300 µg de colágena-PVP fueron digeridos en una proporción de alrededor del 50% a diferencia de la colágena por si sola que tardo más en degradarse.

### **Inhibición o retardo de la contracción de la matriz de colágena en los cultivos en 3D.**

Las integrinas son una gran familia de proteínas heterodiméricas transmembranales, compuestas por dos subunidades polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas por enlaces no covalentes (Heino J 2007 y Clark Richard A.F 1996). Las integrinas juegan un papel importante en la contracción del tejido al crear vínculos entre la célula y la matriz extracelular. En el presente trabajo al evaluar la contracción de la matriz de colágena en presencia de un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta_1$  integrina, se observó que la matriz contrajo en menor proporción que el control con una diferencia de casi 50mm<sup>2</sup> de área. Con este ensayo se evidenció la participación de los receptores pertenecientes a esta familia de integrinas en dicho proceso (**Figura 8**). En el presente trabajo, además de adicionar el anticuerpo dirigido a la subunidad  $\beta_1$  antes de que polimerizara la colágena, es decir, se adicionó durante la preparación de los cultivos y en otro ensayo se adicionó una hora después de iniciada la incubación cuando la colágena ya había polimerizado, con la finalidad de determinar el recambio de receptores de la familia  $\beta_1$  integrinas, que pudiera ser un factor clave en el la contracción de la matriz. El efecto en la contracción de la matriz en ambos casos (antes y después de polimerizar la colágena) fue el mismo, contrayendo en una menor proporción la matriz de colágena con respecto al control (**Figura 8**), con estos resultados podríamos

considerar que dichos receptores están en constante recambio debido a que una hora después de adicionado el anticuerpo la contracción fue menor que en el control y lo mismo sucedió cuando se adiciono el anticuerpo una hora antes.

Estos es importante, dado que la colágena-PVP es un biofármaco que se aplica una vez que se ha producido una herida o en una secuela fibrosa como la cicatriz hipertrófica, podríamos considerar que los receptores pertenecientes a la familia de las  $\beta_1$  integrinas, están en constante recambio lo que tendría como ventaja que la colágena-PVP pudiera tener la posibilidad de encontrar receptores libres pertenecientes a esta familia para poder interaccionar con ellos.

Por su parte, otros trabajos ha evidenciado la participación de otras subunidades de las integrinas en la contracción por fibroblastos en los cultivos en 3D. Langholz O y Cols. 1995 adicionaron anticuerpos contra las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  y también  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  integrinas, sin embargo, la adición del anticuerpo sólo lo hicieron durante la preparación de los cultivos 3D y no cuando polimerizo la colágena como en nuestro estudio. Ellos, encontraron que la presencia del anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta_1$ , se traduce en un retardo de la contracción, es decir, el control (sin anticuerpo) comenzó a contraer después de las 2 horas de incubación, mientras que en presencia del anticuerpo la contracción de la matriz se produjo hasta después de las ocho horas. Por otro lado, la incubación con los anticuerpos  $\alpha_1$  y  $\alpha_3$  no mostraron cambios con respecto al control. Por su parte, el anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha_2$  resultó en un retardo mínimo en la contracción. Además, también evaluaron el efecto de la contracción al adicionar una combinación de los anticuerpos dirigidos contra la subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , resultando en un retardo de la

contracción, sin embargo, éste no supero el efecto mostrado cuando se adicionó sólo el anticuerpo contra la subunidad  $\beta_1$ . En cambio, la inhibición de la contracción fue mucho mayor cuando se adicionó al cultivo los anticuerpos dirigidos contra las subunidades  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  integrinas, sugiriendo una fuerte participación de dicho heterodímero en el proceso. Sin embargo, la presencia de anticuerpos aplicados de forma individual o en combinación no inhibió de forma completa la contracción de la matriz de colágena. Posiblemente esto se deba a que los fibroblastos manifiesten un repertorio de receptores, además de las integrinas que coinciden con la colágena tipo I, lo que indicaría que otros receptores podrían intervenir en la contracción de la matriz. Esto es concebible, ya que se han identificado a otros receptores que pueden interaccionar con varias colágenas de la matriz extracelular incluyendo la tipo I, llevando a cabo varias funciones celulares, en algunos casos de forma independiente a las integrinas tal es el caso de los receptores de dominio discoidina  $DDR_1$  y  $DDR_2$  que pertenecen a la familia de receptores de tirosina cinasas (RTK). Así como, los sindecanos (proteoglicanos transmembranales), entre otros (Ver **anexo B**).

### **Expresión de integrinas**

El heterodímero  $\alpha_2\beta_1$  integrina es uno de los principales receptores para colágena tipo I (**Tabla 4**), Por lo que, en el presente estudio se evaluó la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina en los cultivos en 3D tratados con colágena-PVP en los horarios de las 12, 24 y 36hrs. En donde, la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  fue disminuyendo conforme aumentaba la contracción de las 12 a las 36 hrs. Este comportamiento se observo en presencia de colágena-PVP al 1.0 y 3.0 % aunque



en el primer caso no fue tan clara esta disminución como en el caso de colágena PVP al 3.0%. En contraste, en el control y en los cultivos tratados con colágena-PVP al 0.5% la expresión de dicha subunidad fue aumentado de las 12 a las 24 hrs, es decir, conforme fue aumentando la contracción, apreciándose un pico máximo de expresión a las 24hrs y a partir de aquí disminuyó hasta las 36 hrs. Al parecer colágena-PVP si intervino en la expresión de la subunidad  $\alpha_2$ , sin embargo, esta disminución en la expresión no afecto la contracción ya que como se muestra en la Figura 7 la contracción fue la misma tanto en presencia de colágena-PVP como en ausencia de ella.

Otros trabajos, han evaluado el patrón de expresión de otras subunidades de las integrinas en cultivos de fibroblastos de piel en 3D y en monocapa. Dentro de estos trabajos se encuentran los de Klein CE y Cols. 1991 quienes evaluaron a las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_V$  y  $\beta_1$  por medio de inmunoprecipitación. Encontrando que los niveles de síntesis del heterodímero  $\alpha_2\beta_1$  en los cultivos en 3D fue de 10 a 14 veces mayor que en los cultivos en monocapa. Mientras que las otras integrinas estudiadas se mantuvieron sin cambios ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_X$ ) o reducida en el caso de  $\alpha_4\beta_1$ . Los niveles de síntesis de  $\alpha_2\beta_1$  aumentaron conforme fue aumentando la contracción, sin embargo, cuando ya no había contracción de la matriz, la actividad de síntesis de  $\alpha_2\beta_1$  disminuyó hasta alcanzar un “nivel basal” semejante al de los cultivos en monocapa. Además, ellos también encontraron que en ciertas líneas de fibroblastos mostraron una tasa de contracción particularmente alta y éste se correspondía con un aumento en los niveles de síntesis de  $\alpha_2\beta_1$ . En paralelo, ellos analizaron la regulación transcripcional de la

expresión de las cadenas  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  en diferentes puntos claves durante la contracción, encontrando que la expresión del mRNA para  $\alpha_2$  incrementó considerablemente una vez iniciada la contracción, así como también los niveles de mRNA de  $\beta_1$ . Estos resultados llevan a la conclusión de que los altos niveles de  $\alpha_2\beta_1$  son asociados al proceso de contracción de la matriz y que el patrón de expresión cambia cuando la célula se encuentra en un ambiente más semejante al *in vivo*.

Sin embargo, en nuestro estudio, la contracción de la matriz en presencia de colágena-PVP fue la misma al control a pesar de que la expresión en la subunidad  $\alpha_2$  fue disminuyendo aun cuando aumentaba la contracción, por lo que cabría la posibilidad de que la colágena-PVP pudiera actuar a través de otros receptores incluyendo a otras subunidades de las integrinas, llevando a resultados similares en la señalización de la contracción.

Por otro lado, en los cultivos tratados con anti integrina  $\beta_1$  no hubo evidencia de la subunidad  $\alpha_2$  integrina (**Figura 11**). Esta falta de expresión en la subunidad podría deberse a que el anticuerpo utilizado sólo detecta a la subunidad en la forma de heterodímero, aunque la información correspondiente del anticuerpo no lo especificaba.

### **Enzima de la enzima prolilhidroxilasa**

Indirectamente la síntesis de colágena se evaluó con la expresión de la enzima prolilhidroxilasa en los cultivos en 3D a las 12, 24 y 36 hrs de contracción. Encontrando en el control una disminución en la expresión de la enzima prolilhidroxilasa conforme fue aumentando la contracción de la matriz,

mostrándose un comportamiento similar en presencia de colágena-PVP al 0.5%. En contraste, con colágena-PVP al 1.0 y 3.0% la expresión de la enzima prolilhidroxilasa parece mantenerse constante durante la contracción. Estos resultados podrían indicarnos que colágena-PVP modifica la actividad celular, como se observó también con la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  integrina.

Comparando nuestros resultados con los de Cornelia Mauch y Cols. 1988 quienes evaluaron la síntesis de colágena pero medida a través del aminoácido hidroxiprolina en cultivos en monocapa y 3D, encontrando que la síntesis de colágena fue disminuyendo conforme aumentaba la contracción de la matriz cayendo hasta el 5% con respecto a los valores encontrados en cultivos de monocapa y en geles no contraídos. La reducción involucró a las colágenas tipo I y III, lo que sugirió una regulación concomitante de ambas colágenas, a su vez se observó que la disminución en la síntesis de estas proteínas no se relacionaba con el aumento en la degradación, ya que encontraron los mismos valores de metaproteinasas tanto en los cultivos en monocapa como en los cultivos en 3D. Además, entre otras observaciones la morfología de los fibroblastos en los sistemas 3D se observó elongada y la proliferación se redujo significativamente a diferencia de los fibroblastos sembrados en monocapa. Esto sugirió la reprogramación de varias actividades celulares en respuesta al contacto con la reconstituida matriz extracelular (cultivos en 3D).

Por otro lado, otros trabajos han evaluado la síntesis de colágena en presencia de colágena-PVP pero en cultivos de fibroblastos en monocapa, tal el es el caso de Krötzsch Gómez F.E 1995 quien cuantificó por medio de la incorporación de la

prolina [ $^{14}\text{C}$ ] la síntesis de colágena en presencia de colágena-PVP, colágena y únicamente polivinilpirrolidona, encontrando un incremento en la síntesis de colágena en presencia de colágena-PVP, la cual disminuyó hasta niveles basales conforme se incrementaba la concentración del biofármaco. En cuanto a los tratados con colágena o PVP el comportamiento fue muy diferente.

Por lo que, la presencia de colágena-PVP modifica la actividad celular en los cultivos en 3D, manteniendo constante la síntesis de colágena, lo que haría pensar que las células responden de forma diferente al biofármaco en un sistema más semejante al *in vivo* (cultivos en 3D). Por lo que, no sólo el contacto de las células con la matriz extracelular reconstituida puede modificar la morfología, actividad, proliferación de la célula, como lo menciona Cornelia Mauch y Cols. 1988, a su vez la presencia de colágena-PVP puede modifica la actividad celular, de manera independiente, lo que se asocia con las actividades farmacológicas de la colágena-PVP en los procesos de remodelación tisular (Krötzsch Gómez F.E 1995 y Krötzsch Gómez F *et. al.*, 1998).

La disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha_2$  y prolilhidroxilasa se relacionada con la actividad metabólica y no es un resultado de muerte celular, esto se sustenta con la continuidad de la contracción de la matriz evaluado hasta por 60hrs (Dato no mostrado) y con los ensayos de tratamientos con colágena-PVP donde se mantiene la expresión de la enzima prolilhidroxilasa durante la contracción (**Figura 12**)

Por otro lado, con respecto a la expresión de la enzima prolilhidroxilasa en geles donde se adicionó el anticuerpo  $\beta_1$  a las 24hrs de incubación, el valor de

expresión fue menor al presentado por el control al tiempo de las 12hrs (**Figura 12**). Esta última comparación, es considerando que en presencia del anticuerpo la matriz de colágena redujo casi 100mm<sup>2</sup> su área hasta las 24 hrs de incubación, mientras que el control esta misma reducción del área la alcanzó a las 12 hrs (**Figura 8**). Sin embargo, aun cuando la matriz de colágena en los cultivos tratados con el anticuerpo seguía siendo mayor a las 24 hrs que el control a las 12hrs, la expresión de la enzima prolilhidroxilasa fue considerablemente menor en el primer caso. Por lo que, al parecer la inhibición del receptor  $\beta_1$  integrina podría influir en la disminución de la síntesis de colágena. Trabajos como los de Lui S y Cols. 2009 demuestran que la inhibición de la subunidad  $\beta_1$  integrina en ratones knockout se traduce en una reducción de la síntesis de colágena tipo I. Los receptores principalmente de la familia  $\beta_1$  integrina median las interacciones célula-matriz y a su vez esta adhesión celular resulta en la programación de la activación de genes fibrogénicos.

Algo muy interesante de nuestro estudio fue, que la enzima prolilhidroxilasa manifestó expresión en los cultivos en 3D tratados con el anticuerpo  $\beta_1$  integrina, por el contrario, la subunidad  $\alpha_2$  no se detectó, con ello se podría confirmar que el anticuerpo de reconocimiento para esta subunidad sólo se da cuando el receptor esta en su forma de heterodímero.

### **Histomorfología de los sistemas 3D**

Al evaluar los sistemas en 3D por medio de la técnica de hematoxilina y eosina observamos como la células se orientan en el mismo sentido que las fibras de colágena (**Figura 9**), con ello corroboramos la existencia de una fuerte interacción

entre la célula y la matriz, evento conocido como reciprocidad dinámica, en donde los receptores de la matriz inducen una cascada de señalizaciones físicas y bioquímicas que se transmiten desde la membrana celular hasta el núcleo, acompañada por cambios en la morfología celular y del tejido. Estas modificaciones implican la reorganización del citoesqueleto y cromatina, lo que conlleva a cambios en la expresión de los genes y que a su vez afecta el microambiente celular. Este diálogo dinámico y recíproco entre la célula y su microambiente actúa como un circuito que integra la arquitectura y función tisular. El conector de este circuito incluye un eje mayor de señalización que es transmitido y regulado por el citoesqueleto (Xu R *et. al.* 2009 y Roskelley CD, Bissell MJ 1995).

Como observamos en la figura 9 los fibroblastos se disponen en la misma dirección que las fibras de colágena lo que se llama orientación de contacto, ésta organización nos indica que la migración celular se da sobre las fibras y no se hace cruzando (Clark Richard A.F 1996). La presencia de colágena-PVP en los cultivos en 3D no afectó esta orientación.

Finalmente, los cultivos en tres dimensiones (3D) son una buena herramienta de estudio para seguir evaluando las actividades celulares a diferentes niveles, como es la morfología, proliferación, apoptosis, etc, así como para la evaluación de algunos fármacos, como fue el caso de la colágena-PVP, ya que con la ayuda de estos cultivos pudimos evaluar como la célula responde a este biofármaco en un ambiente mas semejante al *in vivo*.

## X. Conclusiones

- El contacto de las células con la matriz extracelular reconstituida puede modificar la morfología, actividad y proliferación de la célula, a su vez la presencia de colágena-PVP puede modificar la actividad celular en la expresión de las proteínas  $\alpha_2$  integrina y prolilhidroxilasa, de manera independiente, lo que se asocia con las actividades farmacológicas del biofármaco en los procesos de remodelación tisular.
- Colágena-PVP no afecta la reciprocidad dinámica entre la célula y la matriz extracelular, ya que no modificó la orientación de los fibroblastos con respecto a las fibras de colágena en los cultivos tridimensionales.
- La actividad moduladora de colágena-PVP en el metabolismo celular aparentemente no reside en su capacidad de interactuar con receptores de colágena intersticial, ya que no inhibió, ni siquiera de manera parcial, la contracción en los cultivos tridimensionales.
- Se corrobora la participación de los receptores pertenecientes a la familia de la  $\beta_1$  integrinas en la contracción de la matriz, así como el constante recambio de ellos.

## **XI. Anexos**

### **Anexo A**

#### **Interacción receptor- ligando**

La interacción entre el ligando y el receptor se da gracias a regiones específicas tanto en el receptor como en el ligando, por ejemplo, un subgrupo de subunidades  $\alpha$  integrinas presentan una región denominada  $\alpha I$  conformado por aproximadamente 200 aminoácidos. Esta región también se le conoce como región  $\alpha A$ , este nombre se debe a su semejanza con la región A del factor de Von Willenbrand una glicoproteína. La región  $\alpha I$  se ubica en el extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$  y  $\alpha_{11}$  estas subunidades forman heteródímeros con la subunidad  $\beta_1$ . La subunidad  $\alpha$  determina la especificidad por el ligando. A su vez, todas las subunidades  $\beta$  presentan una región llamada  $\beta I$ , habitualmente esta región es más pequeña que la región  $\alpha I$  y se caracteriza por ser rica en cisteínas (Heino J 2007 y Barczyk M *et. al.*, 2010).

Por su parte, los ligandos también presentan regiones de unión al receptor, estas regiones se han estudiado principalmente en las colágenas. Dichas regiones se pueden dividir en al menos cuatro categorías diferentes; las primeras son regiones específicas dentro del área helicoidal de la triple hélice. Estas regiones representan una alta especialización en el mecanismo de interacción y se puede especular que su evolución ha requerido cambios concomitantes en el receptor y el ligando. Una segunda categoría, es una secuencia común en la triple hélice, la secuencia GPO donde G es glicina, P es el aminoácido prolina y O es hidroxiprolina. La tercera categoría contiene sitios críticos de unión que sólo son reconocidos por los receptores después que la colágena es desnaturalizada. La última categoría son los sitios



específicos de dominios globulares llamados no colagénicos (NC1). Un buen ejemplo del mecanismo especializado de unión del receptor a la colágena es la región GFOGER (G= glicina, F= fenilalanina, O= hidroxiprolina, E= ácido glutámico, R = arginina) la triple hélice en la colágena tipo I formada por esta secuencia u otras muy similares tienen una alta afinidad con los receptores  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_1\beta_1$  y esta misma región es reconocida por otras integrinas. La colágena tipo III se une a la integrina  $\alpha_2\beta_1$  con alta afinidad por medio de las regiones GROGER y GLOGEN (L= leucina, N= asparagina), regiones similares también se encuentran en varias colágenas que forman fibrillas sugiriendo su importancia sobre todo en colágenas homotrimericas, mientras que en colágenas compuestas por dos o tres cadenas  $\alpha$  diferentes su mecanismo de unión podría ser mas complejo. El mecanismo de unión de la  $\alpha_1\beta_1$  a una de las regiones en la colágena tipo IV ha sido analizado y éste es muy diferente al presentada por la unión de  $\alpha_2\beta_1$  en colágenas que forman fibrillas. La región crítica de unión en la colágena tipo IV es formado por RDD (R= arginina en la cadena  $\alpha_2$  y D= ácido aspartico en la cadena  $\alpha_1$ ) estos aminoácidos están localizados en las diferentes cadenas  $\alpha$  de la triple hélice. Al parecer la hidroxilación de la prolina en la colágena es crítico para la unión al receptor  $\alpha_1\beta_1$ , a diferencia de  $\alpha_2\beta_1$  donde no es fundamental. Muchas colágenas entre la que se encuentra la colágena tipo I contienen el motivo RGD que es reconocido por varios receptores, entre ellos  $\alpha_1\beta_1$  (Jyrki Heino 2007).

## **Anexo B**

### **Otros receptores de unión a colágenas.**

Los receptores de dominio discoidina (DDR<sub>1</sub> y DDR<sub>2</sub>) que pertenecen a la familia de receptores de tirosina cinasas (RTK). Estos receptores se unen y son activados por diversos tipos de colágenas, la estimulación de los DDR requiere de la estructura triple helicoidal de la colágena nativa, la activación de los DDR es independiente de los receptores de colágena de la familia  $\beta_1$  integrinas. A su vez, DDR<sub>1</sub> y DDR<sub>2</sub> difieren en su especificidad por el ligando, sin embargo, ambos son activados por colágenas fibrilares (tipo I, III y V) y solo DDR<sub>1</sub> puede ser activado por la colágena tipo IV (no fibrilar). Otra característica interesante de los DDR, es su lenta autofosforilación al estímulo del ligando, en comparación con los típicos RTK quienes lo hacen en segundos. La señalización de DDR<sub>1</sub> es esencial para la diferenciación del gránulo del cerebelo, reparación de heridas arteriales y desarrollo de glándulas mamarias, mientras que DDR<sub>2</sub> regula la proliferación de fibroblastos, condrocitos y células hepáticas estelares, además en una línea celular de fibrosarcoma humano se observó DDR<sub>2</sub> puede regular la expresión de metaloproteinasas (MMP-1). Hasta el momento no se disponen de datos convincentes que definan la ubicación y naturaleza del sitio de unión a colágena en los DDR. Los DDR se colocan como nuevos receptores potenciales para colágenas, induciendo la señalización y controlando las respuestas celulares de la matriz extracelular (Corine G. M *et al.*, 2001, Birgit Leitinger 2003 y Agarwal G *et. al.* 2007).

Por su parte, el receptor LAIR-1 (Receptor-1 semejante a inmunoglobulina asociada a leucocitos) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (IG-SF) y es un receptor inhibidor presente en la mayoría de las células mononucleares como linfocitos y monocitos, así como en timocitos. Los receptores inhibidores regulan la respuesta inmune. La inhibición de la señalización depende de la fosforilación de residuos de tirosina ubicados en una región del tallo citoplasmático denominado ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs*) de LAIR-1. Este receptor se une a colágenas de tipo XVII, XIII y XXIII, así como a colágenas de la piel como la tipo I, II y III. Por lo tanto es un receptor transmembranal para múltiples colágenas de la matriz. Cuando las células inmunitarias migran dentro del tejido, ellas son potencialmente expuestas a múltiples señales, para asegurarse de que ellas respondan de manera adecuada a estos estímulos, los receptores inhibitorios como LAIR-1 están obligados a controlar la activación celular. La interacción de LAIR-1 y la colágena pueden inhibir la activación celular y como tal regular la respuesta celular. En virtud de las condiciones fisiológicas, las células inmunes presentes en la sangre no están expuestas a colágenas, sin embargo, su extravasación, resulta en la interacción con las colágenas presentes en las estructuras subendoteliales, pudiendo aumentar el control de la activación celular necesaria. Cuando las células inmunes llegan a un sitio en respuesta a un proceso inflamatorio, la presencia de estímulos específicos por células presentadoras de antígenos, citocinas o patógenos anularan la inhibición y permitirán que se activen y se medie su función. La regulación de la interacción de colágenas y LAIR-1 puede también ocurrir por una modulación en la expresión de éste, en diferentes estados de diferenciación o activación de células inmunes como

linfocitos B, T, neutrófilos y células dendríticas. La interacción de LAIR-1 y colágenas puede ser regulados por LAIR-2 (es una proteína que tiene un 84% de homología con LAIR-1), ya que este puede inhibir a LAIR-1. Ambos receptores, reconocen a la colágena tipo XVII (Lebbink RJ *et. al.*, 2006)

Las anexinas son otro grupo de receptores de colágenas, dicho receptor se caracteriza por su unión a los fosfolípidos de la bicapa lipídica de forma dependiente de calcio, a través de lo regiones de repetidos de anexina presentes en su secuencia. Anexina 5 o también llamada anexina V, fue descrito originalmente como un potente receptor de colágenas tipo II y después se observó su unión a la colágena tipo X. La región telopeptídica en la colágena tipo II y los dominios globulares de la colágeno tipo X parecen ser necesarios para la óptima unión y activación de señalizaciones de anexina V. Ésta, es expresada en cartílago y hueso jugando un papel crucial en el inicio del proceso de mineralización del tejido óseo (Thorsten Kirsch *et. al.*, 2000).

Algunos proteoglicanos pueden también unirse a colágenas a través de la vía de la cadena de glicosaminoglicanos. CD44 es expresado en varios tipos celulares en vertebrados y se ha descrito su unión a colágenas tipo I y VI. El proteoglicano heparina sulfato, sindecanos y glicanos, pueden también actuar como receptores de la matriz extracelular (Jyrki Heino, 2007).

Los sindecanos son proteoglicanos transmembranales que participan en la adhesión celular, ellos forman un grupo de cuatro proteínas, que participan en la interacción célula-matriz, regulan la unión y señalización de factores de crecimiento (FGFs, VEGF, HGF). El dominio extracelular de los sindecanos contiene cadenas de glucosaminoglicanos de heparan sulfato y condroitina sulfato. Los sindecanos difieren

en su expresión dependiendo del tejido donde se encuentren. Por ejemplo, sindecano-1 está presente principalmente en células epiteliales y en menor grado en células fibroblásticas. Sindecano-2 en cambio es abundante en fibroblastos. El sindecano-3 está presente en células neuronales mientras que el sindecano-4 es el más ubicuo y se localiza en los contactos focales de las células, entre ellas las células musculares lisas (Anónimo s/año y Brzóška E y Grabowska I 2005)

Los sindecanos tienen un repertorio variado de ligandos presentes en la MEC, como colágenas, laminina y fibronectina. Éstos interactúan con la proteína de actina del citoesqueleto celular. Los cambios en los sindecanos influyen en la expresión de la migración y adhesión celular, estructura y contactos focales del citoesqueleto, participando en la diferenciación y regeneración del tejido (Brzóška E y Grabowska I, 2005). Se ha observado, que en fibroblastos obtenidos de piel de lesiones fibróticas existe elevados niveles de expresión del sindecano-2 y 4 en relación con los fibroblastos de piel normal. Ellos, podrían contribuir a mejorar el fenotipo de adhesión y contractilidad característico de fibroblastos de lesiones fibróticas, al bloquear la síntesis de la cadena lateral de la cadena de heparan sulfato se reducen la capacidad de adhesión y contracción de la matriz de los fibroblastos. Lo que sugiere fuertemente que los sindecanos son necesarios para que estos tipos celulares participen en la adhesión y contacto con la matriz extracelular (Yunliang Chen *et al.*, 2005).

## **XII. Lista de abreviaturas**

Colágena-PVP	Colágena-Polivinilpirrolidona
DDR	Receptor de dominio discoidina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELAM-1	Molécula de adhesión leucocito- endotelial
FAK	Proteína tirosina cinasa fosforilada
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAG	Glicosaminoglicanos
GF	Factor de crecimiento
GFRs	Receptores de los factores de crecimiento
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina
HGF	Factor de crecimiento hepatocitos
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferón gama
LAIR-1	Receptor- 1 semejante a inmunoglobulina asociada a leucocitos
MMP	Metaloproteasas
NC1	No colágeno (región globular)
PA	Factor activador de plasminógeno
PD-ECGF	Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PVP	Polivinilpirrolidona
RTK	Receptores de tirosina cinasas
SMA	Actina de musculo liso alfa

TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

### **Abreviatura de aminoácidos**

G= glicina, F= fenilalanina, O= hidroxiprolina, E= ácido glutámico, R = arginina,  
L= leucina, N= Asparagina, D= Ácido aspártico

### XIII. Referencias

1. Adzick N S y Lorenz H P (1994). Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Annals of surgery* 220(1); 1-18
2. Agarwal G , Mihai C y Iscru D F (2007). Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1. *J Mol Biol.* 23;367(2):443-55 Abstrac.
3. Anónimo (s/año). Discusión.  
[http://www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-0520104-131526//5.DISCUSI%D3N.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0520104-131526//5.DISCUSI%D3N.pdf)
4. Arosemena S. A y Arosemena S. R (2007). Actualización sobre el queloide y la cicatriz hipertrófica. *Act Terap Dermatol* 30: 238-244
5. Barczyk M , Carracedo S y Gullberg D (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* 339(1):269-80
6. Birgit Leitinger (2003). Molecular Analysis of Collagen Binding by the Human Discoidin Domain Receptors, DDR<sub>1</sub> and DDR<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 278 (19);16761–16769
7. Brzóska E y Grabowska I (2005). Syndecans in cell adhesion and differentiation. *Postepy Biochem* 51(1); 52-9 Abstrac
8. Clark Richard A .F ( 1996). The molecular and cellular biology of wound repair. 2da edición. Ed. Plenum Press. New York and London. Pag. 611
9. Corine G . M. L. hôte, Peter H . Thomas, y Trivadi S . G anesan ( 2001). Functional analysis of discoidin domain receptor 1: effect of adhesion on DDR1 phosphorylation. *The FASEB J.* 28; 1-31
10. Cornelia Mauch, Atsushi Hatamochi, Karin Schaffetter y Thomas Krieg (1988). Regulation of Collagen Synthesis in Fibroblasts within a Three-Dimensional Collagen Gel. *Exp. Cell Research* 178: 493-503



11. Cornelia Mauch, Beate Eckes, Gabriele Hüppe y Thomas Krieg (1993). Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *FEBS Lett.* 318 (2) 129-133
12. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Krötzsch-Gómez F.E, Díaz de León L (1997). Implantes de Fibroquel<sup>MR</sup> aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. *Rev Biomed* 8:81-88.
13. Dallon JC y Ehrlich HP (2008). Review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Rep a Reg* 16;472-479
14. Delvoye P, Nusgens B, Lapière CM (1983). The capacity of retracting a collagen matrix is lost by dermatosparactic skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 81(3):267-70
15. Green JA y Yamada KM (2007). Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 59 (13); 1293-1298.
16. Grinnell F (2003). Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices *TRENDS in Cell Biology* 13 (5); 264-269
17. Furuzawa Carballada J, Rodríguez Calderón R, Díaz de León, Alcolcer Varela J. (2002). Mediators of inflammation are arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clin. Exp. Immunol.* 130; 140-149
18. Heino J (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bio Essays* 29:1001–1010
19. Horton Robert H, Moran Laurence A, Raymond S. O, Rawn David y Scrimgeour Gray K (1995). Bioquímica. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana. México. Pag. 4-13 a 4-16
20. Hunt Tomas K (1983). Cicatrización e infección de las heridas teoría y práctica quirúrgica. Ed. Manual moderno. México, D.F Pág. 33-37
21. Kanitakis J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 12(4):390-9

22. Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauch C, Eckes B, Krieg T, Bankert RB, Weber L (1991). Integrin  $\alpha_2\beta_1$  is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J Cell Biol.* 115(5):1427-36.
23. Kröttsch Gómez F.E (1995). Efecto del fibroquel<sup>MR</sup> sobre el metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos de rata. Tesis de maestría. Unidad Académica de los ciclos profesional y de posgrado UNAM.
24. Kröttsch Gómez F.E, Furuzawa Carballeda J, Reyes Márquez R, Quiroz Hernández E y Lino Díaz de León (1998). Cytokine Expression is Downregulated by Collagen-Polyvinylpyrrolidone in Hypertrophic Scars. *J. Invest. Dermatol* 111 (5); 828-834
25. Kröttsch Gómez F.E (1999). Análisis del efecto de la colágena-polivinilpirrolidona sobre la expresión *in vitro* de algunos mediadores solubles que participan en el metabolismo de la colágena. CCH. Tesis de Doctorado, México, D.F
26. Ladin DA, Garner WL y Smith DJ Jr (1995). Excessive scarring as a consequence of healing. *Wound Repair Regen.* 3 (1):6-14
27. Langholz O, Röckel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T y Eckes B (1995). Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  integrins. *J Cell Biol.* 131(6 Pt 2):1903-15
28. Lebbink RJ, de Ruiten T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, Koch M, Farndale RW, Lisman T, Sonnenberg A, Lenting PJ, Meyaard L (2006). Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med.* 12;203(6):1419-25
29. Liu S, Kapoor M, Denton CP, Abraham DJ y Leask A (2009). Loss of  $\beta_1$  integrin in mouse fibroblasts results in resistance to skin scleroderma in a mouse model. *Arthritis Rheum* 60(9):2817-21

30. López T, Kröttsch E, Ortiz-Islas E, Álvarez-Lemus M, Balsadella E, Martínez-Blanes JM y Odriozola J.A (2009). Release properties and acute biosecurity determination of collagen-polyvinylpyrrolidone loaded in ordered mesoporous silica. *Key Engineering Materials* 391:169-184
31. LumiDerm S.L (2007) ¿Qué es la dermis?  
[http://www.lumi-derm.com/md\\_cuatro.aspx?where=305&id=1](http://www.lumi-derm.com/md_cuatro.aspx?where=305&id=1)  
[http://www.lumi-derm.com/img\\_lumi/dermis.jpg](http://www.lumi-derm.com/img_lumi/dermis.jpg)
32. Luque José (2008). Texto ilustrado de Biología molecular e ingeniería genética. Ed. Harcourt Brace de España. Madrid. Pág. 328
33. Postlethwaite AE y Kang AH (1976). Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J Exp Med.* 143(6):1299-307
34. Rodríguez Fuentes Nayelí (2007). Identificación y caracterización de la fracción activa de la colágena-polivinilpirrolidona. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, (En proceso).
35. Roskelley CD y Bissell MJ (1995). Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol.* 73(7-8); 391-7
36. Sethi KK, Yannas IV, Mudera V, Eastwood M, McFarland C y Brown RA (2002). Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction. *Wound Repair Regen.* 10(6):397-408
37. Söderhäll Cilla, Ingo Marenholz, Tamara Kerscher, Franz Rüschenhoff, Jorge Esparza-Gordillo, Margitta Worn, Christoph Gruber, Gabriela Mayr, Mario Albrecht, Klaus Rohde, Herbert Schulz, Ulrich Wahn, Norbert Hubner, Young-Ae Lee (2007). Variants in a novel epidermal collagen Gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol* 5 (9); 1952-1961.
38. Thorsten Kirsch, Gerald Harrison, Ellis E. Golub y Hyun-Duck Nah (2000). The Roles of Annexins and Types II and X Collagen in Matrix Vesicle-mediated Mineralization of Growth Plate Cartilage. *J Biol Chem* 10;275(45):35577-83

39. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C y Brown RA (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(5):349-63.
40. Van Der Rest M y Garrone Robert (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5: 2814-2823
41. Xu R, Boudreau A y Bissell MJ (2009). Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. *Cáncer Metástasis Rev.* 28(1-2); 167-76
42. Yunliang Chen, Xu Shi-wen, Jonathan van Beek, Laura Kennedy, Marilyn McLeod, Elisabetta A. Renzoni, George Bou-Gharios, Sarah Wilcox-Adelman, Paul F. Goetinck, Mark Eastwood, Carol M. Black, David J. Abraham y Andrew Leask (2005). Matrix Contraction by Dermal Fibroblasts Requires Transforming Growth Factor- $\beta$ /Activin-Linked Kinase 5, Heparan Sulfate-Containing Proteoglycans, and MEK/ERK. *Am J Pathol.* 167(6): 1699–1711