



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación del desempeño preclínico de soportes
de Colágeno tipo I asociados con extractos
vegetales de *Aloe vera* en un modelo animal de
Cavia porcellus.**

Liliana Rocío Gil Cifuentes

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2016

Evaluación del desempeño preclínico de Soportes de Colágeno Tipo I Asociados a Extractos Vegetales de *Aloe vera* en un Modelo Animal de *Cavia porcellus*.

Liliana Rocío Gil Cifuentes

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacología

Directora:
Q.F. PhD. Marta Raquel Fontanilla Duque.

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
Bogotá, Colombia

2016

A mis amores el grande y el pequeñito... por tanta generosidad.

“... Es cierto que heredamos una vida que nos viene de atrás, y que por otro lado hay un aprendizaje como producto de un contacto con el mundo circundante. Pero existe un tercer costado que cierra el triángulo y que siempre he considerado como el ángulo fundamental de toda vida: lo que decidimos ser, lo que elegimos para nosotros y en lo que depositamos todo nuestro empeño...”.

Mario Mendoza.

Agradecimientos

A los ángeles por regalarme la dicha de estar viva y tener tantas personas que me aman a mi lado. A mi esposo por ser mi alma gemela, mi mejor amigo, por su comprensión y respeto incondicionales. A mi hijo Martín: La fuerza que mueve mi universo, quien con su amor infinito y sus dulces palabras me impulsa a ser mejor todos los días.

A mi familia, mis padres Ismael e Hilda quienes con su cariño y esfuerzo me permitieron ver el mundo con ojos diferentes, a mis hermanos Oscar, Paola, Hilda y Pili por inspirarme con su ejemplo, por demostrarme la importancia de la perseverancia y que la unión hace la fuerza.

A la Profesora Marta Fontanilla directora de este trabajo de tesis y del grupo de trabajo en ingeniería de tejidos, quien es ejemplo de dedicación, compromiso e integridad. Gracias por permitirme hacer parte de este viaje y por abrirme los ojos incluso sin proponérselo.

A mis compañeros integrantes del grupo de trabajo en ingeniería de tejidos del departamento de Farmacia especialmente a Adriana y Ronald por su apoyo constante y motivación en el tiempo y lugar precisos, a Iván, Edward, Dianita, Leito, Rosa Helena, Ana Milena, Johnny, Miguel, Sergio y Martha por participar de este proceso y ser críticos durante su desarrollo.

A mis colegas y amigos Alveiro Díaz y Pilar Useche quienes fueron parte importante en mi formación académica y profesional y de quienes recibí aliento y apoyo en los momentos más difíciles.

A la Universidad Nacional de Colombia: mi segunda casa, al departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias.

A Alejandra por su asesoría técnica y lo increíble de su personalidad, a Socorrito un agradecimiento especial por toda la buena energía y la solidaridad.

A Colciencias por el apoyo financiero.

Y, por último, pero no menos importante a mis pacientes, quienes todos los días me demuestran que vivir es sencillo, que hay que disfrutar el aquí y el ahora, y que la felicidad no es un estado de ánimo, es una manera de vivir la vida.

Resumen

Los soportes empleados en la ingeniería de tejidos con el objetivo de promover la regeneración pueden ser modificados para controlar la liberación de extractos vegetales comúnmente usados en el cierre de herida. Nuestro grupo ha desarrollado soportes de Colágeno Bovino tipo I que contienen micropartículas de gelatina/Colágeno (SC-GC) e *in vitro* son capaces de liberar concentraciones no cito-tóxicas de un extracto de *Aloe vera* de manera sostenida durante las fases iniciales del cierre de herida (datos no publicados). En Colombia el uso de extractos de *Aloe vera* para el manejo de heridas está aprobado por el Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño preclínico de un SC-GC cargado con un extracto acuoso de *A. vera* en un modelo de herida por escisión aguda en *Cavia porcellus*.

Para ello, treinta cobayos fueron asignados de manera aleatoria en 6 grupos, de cinco animales cada uno. En tres grupos se realizaron dos heridas contralaterales de espesor total de 1 cm² (herida pequeña); en los grupos restantes se efectuaron heridas de mayor tamaño 3cm² (herida grande). Un grupo con herida pequeña y uno con herida grande fueron injertados en una de las heridas con SC-GC, otro grupo con distribución idéntica fue injertado con SC-GCs cargados con el extracto acuoso de *A. vera* (CS-GC-Av) y los grupos remanentes fueron tratados con micropartículas de gelatina/colágeno cargadas con el extracto vegetal. En todos los casos las heridas contralaterales se dejaron cerrar por segunda intención (Control).

El seguimiento clínico se llevó a cabo los días 7, 15, 21, y 30, se evaluaron variables categóricas como persistencia del soporte, integración y severidad de las heridas. El día 30 los animales fueron sometidos a eutanasia y se tomaron muestras de tejido para procesamiento y análisis histológico e histomorfométrico.

Los hallazgos clínicos, histológicos e histomorfométricos sugieren que SC-GCs cargados con el extracto no se integran en las heridas de piel y se degradan más lentamente que el soporte sin carga SC-GC, esto podría indicar que el extracto de *A. vera* disminuye la

biocompatibilidad de los SC-GCs mediado posiblemente por un incremento en el grado de entrecruzamiento y la alteración del microambiente en el lecho de la herida.

Palabras clave: Colágeno, Sistema de entrega, *In vivo*, Soporte, *Aloe vera*.

Abstract

Scaffolds that support tissue growth can also be designed to control the release of plant extracts commonly used as wound healing agents. Our group has developed collagen type I scaffolds containing microparticles of gelatin-collagen (CS-GC) that *in vitro* sustain the release of non-cytotoxic concentrations of an extract of *Aloe vera* during a span of time that matches the *in vivo* remodeling stages of skin healing. The Colombian Drug Regulatory Agency (INVIMA) has approved the use of *A. vera* preparations to promote skin wound healing. The aim of this work was to perform a pre-clinical evaluation of the performance of a CS-GC loaded with an aqueous extract of *A. vera* mucilage gel in a *Cavia porcellus* wound model.

Thirty guinea pigs were divided in six groups, of five animals each. Three groups had two contralateral acute full-thickness wounds of 1 cm² (small wound); the remaining three had bigger (3cm²) full-thickness wounds (large wound). One small wound group and one large wound group were grafted on one side with CS-GC. Another small wound group and large wound group were grafted with CS-GC loaded with the aqueous extract of *A. vera* (CS-GC-Av). The two remaining groups were treated with gelatin-collagen microparticles loaded with the plant extract. In all cases contralateral wounds were left to close by secondary intention (control). Clinical follow-ups were made at 7, 15, 21, and 30 days to assess wound contraction, persistency of the scaffold, integration rate and wound inflammatory state. At day 30th the animals were euthanized and skin biopsies were taken for histopathological and histomorphometric analysis.

Clinical, histological and histomorphometric data suggest that CS-GCs loaded with the *A. vera* extract does not integrate into full-thickness skin wounds and have a degradation rate significantly lower than the one of CS-GC unloaded, these might indicate that the *A. vera* extract loaded into the CS-GCs harness the biocompatibility of the scaffolds increasing their cross-linking and changing the environment inside the wound bed.

Keywords: Collagen, Drug Delivery System, *In vivo*, Scaffold, *Aloe vera*.

Contenido

Resumen	VII
Abstract.....	IX
Lista de Figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Introducción	1
1 Marco conceptual y antecedentes	5
1.1 La piel y sus funciones.....	5
1.2 Cierre de heridas.....	6
1.3 Reparación en heridas de tipo agudo.....	6
1.3.1 Hemostasia	7
1.3.2 Inflamación.....	7
1.3.3 Proliferación	8
1.3.4 Remodelación	9
1.4 Regeneración	10
1.5 Sustitutos cutáneos de Ingeniería de Tejidos.....	11
1.6 Modelos animales para el estudio de cierre de herida	16
1.7 Aloe vera.....	18
2 Objetivos.....	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 Materiales y Métodos	23
3.1 Obtención del Material Vegetal y Obtención del Extracto.....	23
3.2 Evaluación de la Citocompatibilidad del Extracto	23
3.3 Elaboración de Soportes de Colágeno con Micropartículas de Gelatina-Colágeno (SCGC).....	24
3.4 Asociación del Soporte de Colágeno y el Extracto Vegetal.....	24
3.5 Ensayo de Desempeño Preclínico <i>In Vivo</i>.....	25
3.5.1 Revisión Documental	25
3.5.2 Animales	25
3.5.3 Ensayo piloto.....	26
3.5.4 Tratamientos	26

3.5.5	Diseño experimental.....	27
3.5.6	Procedimiento quirúrgico y posicionamiento del injerto.	28
3.5.7	Seguimiento clínico	29
3.5.8	Análisis histológico e histomorfológico del tejido.....	30
3.6	Análisis Estadístico	31
3.7	Consideraciones Éticas	32
4	Resultados.....	33
4.1	Ensayo piloto para el desarrollo de un modelo de herida de espesor total en la especie <i>Cavia porcellus</i>.	33
4.2	Evaluación Clínica del Desempeño de los Tratamientos en Estudio.	35
4.3	Análisis Histomorfológico del Tejido	40
4.3.1	Análisis histológico descriptivo	40
4.3.2	Número de capas de epitelio.....	42
4.3.3	Grosor del tejido conectivo	44
4.3.4	Disposición de las fibras colágenas.....	45
4.3.5	Infiltrado Inflamatorio y Vascularización	46
5	Discusión.....	49
6	Conclusiones y recomendaciones.....	53
6.1	Conclusiones.....	53
6.2	Recomendaciones.....	53
	Bibliografía	55

Lista de Figuras

Figura 1-1 Estructura de la piel. Tomado y modificado de: (Catalano et al., 2013)	5
Figura 1-2 Componentes de los Productos de Ingeniería de Tejidos.	12
Figura 3-1 Representación Esquemática de las Heridas en el Sujeto Experimental (<i>Cavia porcellus</i>).....	28
Figura 3-2 Procedimiento Quirúrgico	29
Figura 4-1 Resumen de Publicaciones Anuales	33
Figura 4-2 Procedimiento Quirúrgico Realizado en el Ensayo Piloto	35
Figura 4-3 Severidad de las Heridas en los Tres Grupos de Animales Estudiados.	36
Figura 4-4 Seguimiento Clínico.....	37
Figura 4-5 Apariencia de la Zona Tratada con SC-GC en el Día 21.....	37
Figura 4-6 Seguimiento del Grupo Tratado con SC-GC asociado a <i>Aloe vera</i>	38
Figura 4-7 Fotografías del Grupo Tratado con Dispersión Coloidal de Colágeno y Micropartículas de Gelatina-Colágeno Asociadas con <i>Aloe vera</i>	38
Figura 4-8 Imágenes clínicas representativas de las cicatrices después de los tratamientos en cada grupo.	39
Figura 4-9 Análisis Histológico Descriptivo	42
Figura 4-10 Detalle de la zona injertada con soporte de Colágeno asociado con <i>Aloe vera</i>	42
Figura 4-11 Evaluación del Número de Capas del Epitelio Formado.	43
Figura 4-12 Evaluación del Grosor del Tejido Conectivo Formado..	44
Figura 4-13 Porcentajes de la Disposición de Fibras Colágenas.	45
Figura 4-14 Número de células inflamatorias	47
Figura 4-15 Número de Vasos Sanguíneos para cada grupo	48

Lista de tablas

Tabla 1-1 Sustitutos cutáneos comerciales.....	13
Tabla 1-2 Principales diferencias entre la piel de los humanos y los roedores.....	18
Tabla 3-1 Matriz para Asignar Tratamientos en el Ensayo Piloto	26
Tabla 3-2 Resumen del Sistema de Puntuación y los Elementos de Descripción (Herramienta BWAT), empleados para la Evaluación de las Características Clínicas de las Heridas *.....	29

Introducción

La piel es el órgano más extenso, y es crítica para la supervivencia principalmente por su función como sistema de defensa primario y su papel en la regulación de la temperatura y el equilibrio hidroelectrolítico (Wong & Chang, 2009). Para cumplir con estas funciones, la piel se renueva constantemente y cuenta con mecanismos para reparar las heridas, este proceso de reparación es un evento fisiológico complejo que desemboca frecuentemente en la formación de una cicatriz (Gantwerker & Hom, 2012). El profundo impacto físico y psicológico de las cicatrices para un individuo, va más allá de las consideraciones estéticas, en la mayoría de los casos las cicatrices están acompañadas de pérdida de funcionalidad lo que se relaciona directamente con la calidad de vida (Tziotzios, Profyris, & Sterling, 2012), por esta razón cualquier esfuerzo que se haga en la búsqueda de alternativas que permitan minimizar la formación de cicatriz o que cambien las características de la misma es valioso.

Cuando las lesiones en piel son extensas como en el caso de las quemaduras, los traumas y algunas enfermedades congénitas (*giant nevi*), o los mecanismos de reparación se encuentran alterados como por ejemplo en pacientes diabéticos, hipertensos o con alteraciones vasculares; los sustitutos artificiales producto de la ingeniería de tejidos tienen una relevancia particular, ya que proveen un ambiente propicio para el cierre de la herida y además estimulan la maquinaria regenerativa a nivel molecular, sin crear sitios mórbidos en otras zonas y cubriendo áreas extensas de lesión (Shevchenko, James, & James, 2010). No obstante, y a pesar de resultados positivos de la aplicación de productos derivados de ésta tecnología en los países desarrollados, en países en desarrollo su impacto en la práctica clínica es limitado (German, Falke, & Atala, 2000). Este fenómeno puede obedecer al desconocimiento general de las características y empleo de los mismos; como también, su alto costo y los procesos complicados que caracterizan la importación de tejidos vivos artificiales (Greenwood & Thorsteinsdóttir, 2006). De ahí, la importancia de impulsar su producción local.

En nuestro país algunos estudios muestran una alta incidencia de heridas en piel representadas principalmente por tres grupos: quemaduras (1187 casos reportados a mayo de 2014 (Gutierrez Bolivar, 2014); cáncer en piel (entre 880 -1020 casos nuevos por año entre 2004-2010) (Cormane & Rodelo, 2014); úlceras vasculares(40.789 casos reportados en 1995) (Anaya & Quintero, 1998). Estos datos demuestran la necesidad de explorar alternativas terapéuticas como, por ejemplo, el uso de productos de ingeniería de tejidos, soportes sin células o tejidos artificiales, para el tratamiento de heridas de piel.

Durante las dos últimas décadas, el grupo de trabajo en ingeniería de tejidos, ha desarrollado soportes de colágeno tipo I que al ser empleados como injertos en heridas de espesor parcial de mucosa oral (Espinosa, Sosnik, & Fontanilla, 2010) y en pacientes con lesiones cutáneas de diferente naturaleza (Datos No Publicados), mejoran la cicatrización con respecto al cierre por segunda intención. El método establecido por el grupo para la fabricación de los soportes fue modificado recientemente mediante la incorporación de micropartículas elaboradas a partir de una mezcla de gelatina-colágeno que busca mejorar su actividad biológica (R. Jimenez, 2013). El sistema constituido por el soporte de colágeno tipo I y las micropartículas de gelatina-colágeno, fue asociado a un extracto hidroglicólico de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), ensayos *in vitro* mostraron que este sistema permite liberar de manera controlada los metabolitos activos de un extracto hidroglicólico de la flor de *Calendula* en concentraciones no citotóxicas (R. A. Jimenez, Millan, Suesca, Sosnik, & Fontanilla, 2015). Entre los años 2012 y 2014 se evaluó la eficacia de éste soporte cargado como sustituto artificial en un modelo animal de heridas cutáneas agudas de espesor total, los resultados obtenidos indicaron que el soporte no se integró al lecho de la herida y tuvo una tasa de degradación lenta (Millan Cortes, 2014) .

Al igual que los extractos de *C. officinalis*, las plantas del genero *Aloe* (particularmente de la especie *Aloe vera*), son empleadas por la medicina tradicional para el tratamiento de lesiones de la piel; entre ellas: abrasiones, laceraciones y manifestaciones cutáneas del Lupus eritematoso y del Pénfigo (Ferraro, 2009; Hamman, 2008) . Sus hojas contienen un mucílago rico en glucomananos (polisacáridos), aminoácidos, esteroides y vitaminas, compuestos responsables de las propiedades curativas de la planta (Gupta & Malhotra, 2012). Hasta el momento la inclusión de extractos de plantas en constructos de ingeniería de tejidos es limitada, esta aproximación permite explotar conocimientos de la etnofarmacología y la ingeniería de tejidos en favor de los pacientes, lo que la hace

innovadora en el ámbito local y emergente a nivel mundial (Jithendra *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2010).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el desempeño preclínico de los soportes de colágeno asociados con micropartículas de gelatina/colágeno y *A. vera* en un modelo roedor de herida por escisión, para tal fin se llevaron a cabo procedimientos quirúrgicos *in vivo*, seguimiento clínico y evaluación histomorfométrica de las cicatrices resultantes después de tratar las lesiones.

1 Marco conceptual y antecedentes

1.1 La piel y sus funciones

La piel es una barrera eficiente contra los disturbios mecánicos, radiación ultravioleta, y agentes microbianos patógenos; además previene la pérdida de fluidos y juega un papel importante en la termorregulación y la respuesta inmune (Lorenti, 2012).

Morfológicamente la piel se divide en dos capas: epidermis y dermis, la epidermis es una estructura estratificada compuesta principalmente por queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, terminales nerviosas libres y células de Merkel; las células y las proteínas sintetizadas por las mismas conforman la denominada “barrera cutánea” (Guo & Dipietro, 2010). Por su parte, la dermis le confiere las propiedades mecánicas a la piel, en ella se encuentran los capilares y los apéndices cutáneos y está compuesta principalmente por fibroblastos que se encargan de la síntesis de la matriz extracelular, macrófagos que están asociados con la inmunocompetencia de la piel, debajo de la dermis se encuentran los adipocitos que además de las propiedades mecánicas de amortiguación tienen funciones apocrinas, paracrina y de reservorio energético (Celleno & Tamburi, 2009; Fitzpatrick & Frydman, 2001).

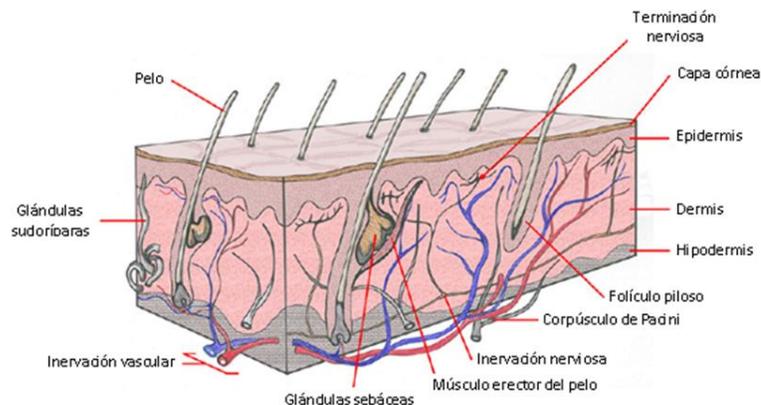


Figura 1-1 Estructura de la piel. Tomado y modificado de: (Catalano et al., 2013)

1.2 Cierre de heridas

Una herida se define como la interrupción de la continuidad celular, anatómica y funcional de un tejido vivo, puede producirse por insultos físicos, químicos, térmicos, microbianos o inmunológicos (Shrimanker, Patel, Modi, & Dave, 2013). Se han descrito tres tipos de cierre de herida que se clasifican de acuerdo con el tiempo durante el cual la herida permanece abierta y la presencia o no de factores perpetuadores que impiden el cierre de la misma.

El termino cierre por primera intención se refiere al proceso que se lleva a cabo en heridas limpias donde no hay pérdida importante de tejido y la contaminación bacteriana está bajo control. Éste tipo de heridas sana con intervenciones pequeñas (sutura o grapas quirúrgicas), no hay pérdida de funcionalidad y el resultado cosmético es adecuado (Enoch & Leaper, 2005).

El cierre primario retardado hace referencia a las heridas donde existe un proceso infeccioso que debe ser controlado antes de posicionar los bordes de la herida. En cuyo caso, se debe mantener la herida abierta para hacer desbridación quirúrgica del tejido muerto y eliminar el foco infeccioso antes de proceder con el cierre primario (Diegelmann & Evans, 2004).

El cierre por segunda intención, sucede en heridas que se caracterizan por tener un tamaño superior a 4cm de diámetro, con bordes irregulares y que generalmente presentan alguna complicación que impide el cierre quirúrgico (infección, inflamación prolongada, comorbilidades del paciente). Por ésta razón, el cierre depende en gran medida de la formación de tejido de granulación y de una contracción eficiente de los bordes de la herida (Enoch & Leaper, 2005; Vermeulen, Ubbink, Goossens, De Vos, & Legemate, 2005).

1.3 Reparación en heridas de tipo agudo

Las heridas de tipo agudo que no presentan complicaciones, tienden a repararse en un proceso continuo, estrictamente regulado, y dentro de un tiempo determinado. Éste proceso involucra la interacción de diversos componentes celulares y moleculares que pueden encontrarse en el sitio de la herida o que migran desde el torrente sanguíneo o el tejido periférico (Demidova-Rice, Hamblin, & Herman, 2013).

El cierre de herida en un adulto sano es dinámico y requiere una serie de eventos que incluyen la hemostasia, una respuesta inflamatoria aguda y la síntesis y remodelación de la matriz extracelular. La subdivisión clásica en tres o cuatro fases (Hemostasia e Inflamación, Proliferación y Maduración/Remodelación), permite abstraer los principios básicos de la reparación (Broughton, Janis, & Attinger, 2006).

1.3.1 Hemostasia

Esta fase sucede de forma inmediata una vez se ha interrumpido la estructura normal de la piel ya que la exposición de la lámina basal y la disrupción del endotelio vascular activan la cascada de la coagulación (Sinno & Prakash, 2013) y promueven la síntesis y liberación de TxA_2 y $\text{PG}_2\alpha$ (Derivados del ácido araquidónico), moléculas que funcionan como potentes vasoconstrictores (Velnar, Bailey, & Smrkolj, 2009). El factor de von Willebrand se ancla a la lámina subendotelial y la señala para que las plaquetas se adhieran y posteriormente sean activadas; la adhesión y la activación plaquetaria, permiten la migración de más plaquetas al sitio de la lesión y la posterior agregación de las mismas. Lo que se obtiene finalmente es un tapón que está constituido en su mayoría por fibrina y plaquetas. Las plaquetas además se degranulan liberando en la zona citoquinas y factores de crecimiento importantes para los procesos de epitelización (FGF y EGF), angiogénesis (VEFG) y formación de matriz extracelular ($\text{TGF-}\beta$) (Broughton *et al.*, 2006; Enoch & Leaper, 2005; Hahm, Glaser, & Elster, 2011; Sinno & Prakash, 2013). Los objetivos de esta fase son detener la pérdida de fluidos, específicamente sangre, proveer una matriz provisional a donde migren las células del lecho de la herida y en donde se concentren las moléculas de quimiotaxis y los factores de crecimiento que modulan la reparación (Diegelmann & Evans, 2004).

1.3.2 Inflamación

Las señales celulares generadas durante la hemostasia y la activación de la cascada del complemento atraen los leucocitos a la matriz provisional recién formada. Las prostaglandinas, histamina, serotonina y algunos productos bacterianos producen vasodilatación y promueven la diapédesis de leucocitos, principalmente neutrófilos, desde el endotelio vascular (Sinno & Prakash, 2013; Velnar *et al.*, 2009). Los neutrófilos liberan enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno que eliminan la población bacteriana

y destruyen el tejido no viable; la actividad fagocítica de éstas células es importante porque las heridas que tienen una carga bacteriana mayor a 10^5 bacterias por gramo de tejido, no cicatrizan (Hart, 2002; Robson, 1997; Robson, Steed, & Franz, 2001).

Entre las 24-48 horas de ocurrida una lesión, los monocitos migran al lecho de la herida y se diferencian a macrófagos bajo el estímulo de citoquinas como el TGF- β y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (Leibovich & Ross, 1975). Los macrófagos además de cumplir con funciones fagocíticas, son los encargados de regular la transición entre la fase inflamatoria y la fase proliferativa, debido a que secretan factores de crecimiento y citoquinas que aceleran la migración y activación de los fibroblastos, así como, la reepitelización y la angiogénesis (Sindrilaru & Scharffetter-Kochanek, 2013). Los linfocitos son los últimos en llegar al sitio de lesión y aún no está muy claro cuál es su función en el proceso de cierre de herida (Park & Barbul, 2004; Swift, Burns, Gray, & DiPietro, 2001).

1.3.3 Proliferación

Esta fase inicia a las 48 horas y se prolonga hasta el día 10 en promedio. En ella se lleva a cabo la reepitelización, la angiogénesis y la formación de tejido de granulación (Jie Li, Chen, & Kirsner, 2007). Al inicio de la reepitelización, los queratinocitos que se encuentran en los bordes de la herida y en los apéndices dermales intactos del tejido circundante se desdiferencian y migran hacia el centro de la misma; los factores de crecimiento como el EGF, TGF- β y KGFs favorecen la disolución de las uniones hemidesmosomales y la formación de filamentos de actina en los polos de la célula, lo cual permite su migración. Luego de adherirse provisionalmente a la matriz en formación, los queratinocitos proliferan y se estratifican para formar la nueva epidermis; finalmente, se restaura la membrana basal (Janis & Harrison, 2014; Velnar *et al.*, 2009). Esta serie de eventos, tiene como objetivo restablecer la barrera epidérmica para evitar la pérdida de fluidos y la exposición al medio externo (Williamson & Harding, 2004).

La hipoxia en el lecho de la herida y los niveles elevados de lactato estimulan macrófagos, queratinocitos y células endoteliales para que secreten factores angiogénicos (Jie Li *et al.*, 2007), que incluyen angiopoyetina 1, TNF α , trombospondina, FGF, VEGF, TGF- β y angiogenina (Sinno & Prakash, 2013; Tellechea, Leal, Veves, & Carvalho, 2010), estos factores modulan la formación de túbulos capilares en la nueva matriz extracelular. Ha sido demostrado que las lamininas, específicamente lamininas 10 y 8, son las proteínas que

suministran el sostén necesario para la migración y proliferación de células endoteliales durante la neoformación de capilares (Gonzales *et al.*, 2001; J Li, Zhang, & Kirsner, 2003; Jie Li *et al.*, 2006). La angiogénesis, es de vital importancia en la fase proliferativa para suministrar oxígeno y nutrientes a las células metabólicamente activas que conforman el tejido de granulación. Una vez éste tejido está completamente formado, los vasos sanguíneos sufren regresión en respuesta a los factores de crecimiento liberados, razón por la cual la cicatriz madura se caracteriza por ser avascular (Tziotzios *et al.*, 2012).

Entre las 48 y las 72 horas los fibroblastos reclutados del tejido conectivo periférico y la adventicia perivascular, son activados para que sinteticen y secreten los componentes de la matriz extracelular (glicosaminoglicanos, proteoglicanos, elastina y colágeno principalmente) y las sustancias encargadas de degradar la matriz provisional de fibrina (metaloproteasas). En respuesta al TGF- β 1 algunos de estos fibroblastos alteran su fenotipo al de células especializadas contráctiles, los miofibroblastos, que mediante la formación de agregados celulares se encargan de la contracción de la herida (Janis & Harrison, 2014; Jie Li *et al.*, 2007; Williamson & Harding, 2004).

1.3.4 Remodelación

Durante la cicatrización es primordial la formación, degradación y reorganización de la matriz extracelular (Barrientos, Stojadinovic, Golinko, Brem, & Tomic-Canic, 2008). En éstos procesos, las interacciones de la matriz con los diferentes tipos celulares a través de receptores de integrinas juegan un papel importante (Koivisto, Heino, Häkkinen, & Larjava, 2014). Durante las primeras 2-3 semanas los fibroblastos activados secretan colágeno, principalmente del tipo III; luego, el colágeno es recambiado por colágeno tipo I que le confiere propiedades mecánicas diferentes a la cicatriz; como por ejemplo, una mayor fuerza tensil debido a la orientación y organización de las fibras en el estroma (Broughton *et al.*, 2006; Jie Li *et al.*, 2007; Sinno & Prakash, 2013).

La degradación de la matriz está a cargo de las metaloproteasas (MPP), que a su vez son moduladas por los inhibidores tisulares de metaloproteasas (IMPP); el delicado balance de las MMP y los IMMP que se establece en la lesión, permite que la remodelación se lleve a cabo de manera oportuna y ordenada (Visse & Nagase, 2003). Durante esta fase hay una disminución marcada en la población celular y cesa la vascularización (Yamaguchi &

Yoshikawa, 2001). El objetivo de la remodelación es devolver la integridad estructural y la competencia funcional al tejido neoformado, esto no siempre sucede y depende en gran medida de características de la herida como sitio anatómico y área total afectada (Robson *et al.*, 2001). La fuerza tensil de la cicatriz nunca llega a ser idéntica a la de la piel sana, pero se incrementa de manera progresiva completando un 3% después de una semana, un 30% en las primeras 3 semanas y aproximadamente un 80 % alrededor del tercer mes de ocurrida la lesión (Levenson, S. M., Geever, E. F., Crowley, L. V., Oates, J. F., Berard, C. W., & Rosen, 1965). La cicatriz refleja el patrón de cicatrización del área afectada y pueden ser hipertróficas o atróficas dependiendo de cómo se organicen las fibras de colágeno; las cicatrices se caracterizan por tener bordes irregulares, una epidermis muy delgada y no poseer ningún tipo de apéndice (Guo & Dipietro, 2010). La formación de una cicatriz en la mayoría de los tejidos conectivos, es la consecuencia de favorecer la reparación sobre el proceso de regeneración (Janis & Harrison, 2014).

1.4 Regeneración

Uno de los objetivos de la investigación en el cierre de herida es entender los mecanismos de la formación de cicatriz y como éstos se pueden controlar para redirigir el proceso hacia la regeneración (cierre sin cicatriz) (Gawronska-Kozak, Grabowska, Kopcewicz, & Kur, 2014). Contrario a la reparación que resulta en la formación de una cicatriz fibrótica con funcionalidad disminuida, la regeneración restaura en los órganos dañados la arquitectura y funcionalidad normal del tejido sano (Yannas, 2013). Se han descrito dos tipos de cierre regenerativo, la regeneración epimórfica y el cierre en fetos mamíferos.

La regeneración epimórfica, también llamada regeneración verdadera, es un proceso que se basa en la formación de una estructura tipo blastema (Brockes & Kumar, 2005). Ésta estructura consiste en una masa de células desdiferenciadas, las cuales sufren procesos de proliferación celular y rediferenciación que permiten restablecer las estructuras perdidas; éste tipo de regeneración es característico de algunos vertebrados menores como las salamandras, los axolotes y los peces cebra (Gilbert, 2000).

Ha sido demostrado que las heridas cutáneas de los fetos de los mamíferos (incluyendo a los humanos), sanan sin formar cicatriz si la lesión ocurre durante los dos primeros trimestres de la gestación (Longaker *et al.*, 1990). Los trabajos realizados en embriogénesis de la piel, que comparan el cierre sin cicatriz observado en los primeros

trimestres con la formación de cicatriz hacia el final de la gestación, han evidenciado diferencias importantes en la respuesta inflamatoria, las citoquinas, los factores de crecimiento, la reepitelización, los componentes de la matriz extracelular y la contracción de la herida (Namazi, Fallahzadeh, & Schwartz, 2011). Los estudios de cierre de herida fetal, son una herramienta muy útil para el avance científico en los procesos que intervienen durante la regeneración; sin embargo, aún se desconoce cuál es el impacto real de la inmadurez de los sistemas inmune y endocrino sobre la regeneración y cuales son los mecanismos exactos de este proceso (Gawronska-Kozak *et al.*, 2014). Algunas investigaciones recientes, mostraron que los ratones adultos *Foxn1^{nu}* (deficientes en el gen Forkhead box N1, lo que produce una cepa de ratones atímicos y con atrofia de los folículos pilosos) y el fenotipo salvaje del “African Spiny Mice” son capaces de regenerar la piel y las orejas; dichos hallazgos sugieren que los mamíferos adultos poseen la maquinaria necesaria para sanar la piel a través de la regeneración (Gawronska-kozak, 2012; Seifert *et al.*, 2012).

1.5 Sustitutos cutáneos de Ingeniería de Tejidos

Los autoinjertos continúan siendo la terapia de elección en los protocolos actuales para el cuidado de pacientes con heridas graves (Lazic & Falanga, 2011). Sin embargo, al emplearlos se crean áreas mórbidas en las zonas donantes, y en muchas circunstancias la piel sana no es suficiente para cubrir la extensión de las lesiones. En los pacientes que sufren de pérdida de tejido severa (extensa y/o profunda), el objetivo debe ser alcanzar la máxima capacidad funcional y buenos resultados estéticos; con el fin, de facilitar el reintegro del paciente a la sociedad (Lorenti, 2012). En los casos en que los autoinjertos no son viables, los sustitutos de piel son una estrategia efectiva ya que no requieren procedimientos dolorosos e invasivos y pueden ser usados por pacientes ambulatorios (Shevchenko *et al.*, 2010).

La ingeniería de tejidos combina los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos lesionados (Langer & Vacanti, 1993). Estos productos resultan de usar (solos o combinados) células, soportes y factores bioactivos (Sasireka & Sivakumar, 2013). La Figura 1-2 muestra un resumen de los tipos de células, biomateriales y factores comúnmente empleados.

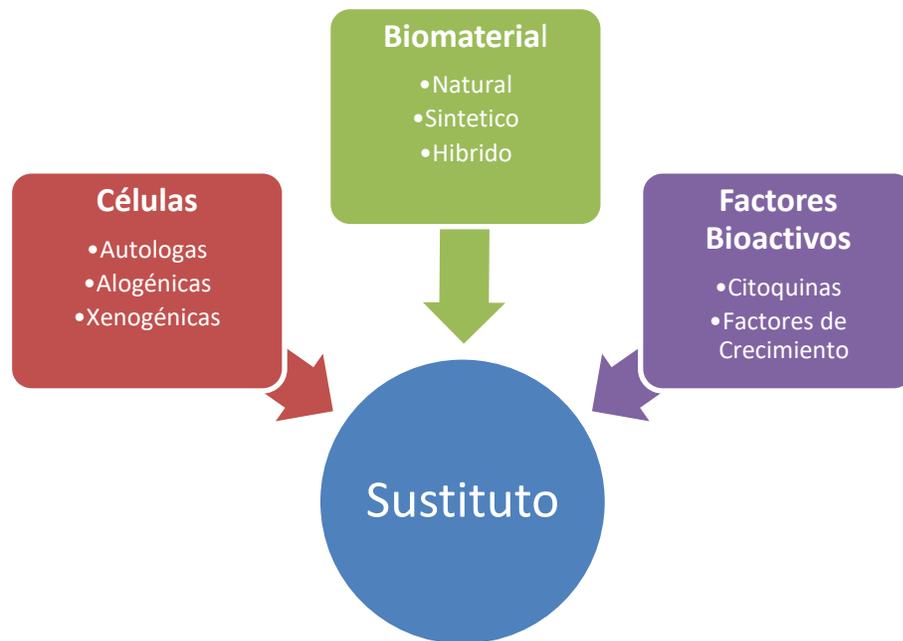


Figura 1-2 Componentes de los Productos de Ingeniería de Tejidos. La figura muestra un diagrama de los componentes fundamentales de los sustitutos tisulares elaborados por la Ingeniería de Tejidos. El diagrama corresponde a la traducción y modificación de una figura elaborada por *Ohba, Yano, & Chung, 2009*

El desempeño de los sustitutos tisulares, especialmente cutáneos, está condicionado por la interacción de los factores bioactivos incluidos en el sustituto o provenientes de la herida (Kamolz & Lumenta, 2013), las células del sustituto o del lecho de la herida (Wong *et al.*, 2007), y los biomateriales que componen los soportes tridimensionales que facilitan la organización del tejido. Estos componentes, solos o en conjunto, promueven la remodelación del sitio del injerto porque simulan el ambiente fisiológico de las células en los tejidos nativos (Lorenti, 2012), (Z. Zhang & Michniak-Kohn, 2012). Los avances tecnológicos en el área de los biomateriales, la biología molecular y las técnicas de cultivo celular permiten que los sustitutos cutáneos sean una realidad terapéutica para lesiones crónicas o agudas en la piel; a continuación, se hace un breve resumen de las características de los sustitutos más importantes disponibles en el mercado actualmente (Tabla 1-1).

Tabla 1-1 Sustitutos cutáneos comerciales

Nombre / empresa fabricante	
<i>Sustitutos epidérmicos</i>	<i>Sustitutos dérmicos</i>
Epidex® // Modex Therapeutiques	
Myskin® // CellTran Ltd	AlloDerm® // LifeCell Corporation
ReCell® // Avita Medical	Dermagraft® // Adv. BioHealing Inc.
Epifast® // Bioskinco	Integra® // Integra NeuroSciences
Laserskin® // Fidia Adv. Biopolymers	Matriderm® // Dr. Suwelack Skin and HealthCare
Bioseed-S® // BioTissue Tech	
<i>Sustitutos dermo-epidérmicos</i>	
Apligraf® // Organogenesis Inc.	SurDerm® // Hans Biomed Corporation
Orcel® // Ortec Internacional, Inc.	EZ Derm® // Brennen Medical, Inc.
Permaderm® // University of Cincinnati/ Shriners Hospitals	Terudermis® // Olympus Terumo Biomat
Karoskin® // Karocell® Tissue Engineering AB	TransCyte® // Advanced BioHealing Inc.
PolyActive® // HC Implants BV	Biobrane® y Biobrane-L® // UDL Laboratorios, Inc
TissueTech Autograft System® // Fidia	Hyalomatrix PA y Hyalograft 3D® //
Advanced Biopolymers	Fidia Advanced Biopolymers

Tomado y modificado de (Gómez, Soto Merizalde, & Múnera Restrepo, 2012)

Sustitutos epidérmicos

Los sustitutos epidérmicos Epicel® y Epidex® se elaboran a partir de queratinocitos autólogos, que se cultivan *in vitro* para obtener una lámina de epidermis diferenciada que posteriormente se injerta en el paciente (Carsin *et al.*, 2000; Tausche *et al.*, 2003). Por su fragilidad, el epitelio obtenido *in vitro* es difícil de manipular; esta característica afecta de manera directa la integración del injerto al lecho de la herida y hace que el uso de sustitutos epidérmicos no siempre sea exitoso (Supp & Boyce, 2005).

MySkin® se elabora a partir de queratinocitos autólogos en co-cultivo con fibroblastos murinos irradiados sobre una lámina de silicona (Canonico & Campitiello, 2013). Ésta técnica permite obtener la confluencia mucho más rápido y favorece la estratificación del epitelio; igualmente, la presencia de la silicona facilita su manejo y aplicación. Este

producto ha sido evaluado en el tratamiento de quemaduras superficiales y úlceras diabéticas, con diversos resultados (Moustafa *et al.*, 2007).

Sustitutos dérmicos

Debido a que la mayoría de los fracasos observados al aplicar láminas epiteliales han sido atribuidos a la ausencia de tejido conectivo que soporte la integración del epitelio (Auger, Berthod, Moulin, Pouliot, & Germain, 2004), diversos productos han sido desarrollados para sustituir la dermis. Integra[®] está compuesto por una matriz de colágeno bovino tipo I y condroitin sulfato, cubierta por una membrana de silicona que funciona como barrera epidermal (Z. Zhang & Michniak-Kohn, 2012). Fue el primer sustituto cutáneo en ser aprobado por la FDA para el tratamiento de quemaduras complejas (Heitland, Piatkowski, Noah, & Pallua, 2004).

Dermagraft[®] es un material criopreservado que utiliza fibroblastos obtenidos de prepucio de neonato sembrados sobre una matriz o soporte de ácido poliglicólico/ácido poliláctico. Su uso se ha descrito principalmente en pacientes con úlceras diabéticas y venosas (Omar, Mavor, Jones, & Homer-Vanniasinkam, 2004). Por su composición química, el soporte en que crecen las células es biodegradable y sustituido por nuevo tejido; lo cual, facilita la regeneración.

Alloderm[®] está constituido por dermis cadavérica de origen humano, que ha sido tratada para descelularizar y eliminar antígenos que puedan inducir rechazo inmunológico (Supp & Boyce, 2005). Su uso se ha descrito en periodoncia y en cirugías reconstructivas de uniones mucocutáneas (Lesser, Aboseif, & Abbas, 2008).

Sustitutos dermoepidérmicos

Este tipo de constructos contienen dermis y epidermis artificiales. Algunos se consideran como cubiertas temporales biológicamente activas, que proveen las condiciones necesarias para mejorar el cierre de herida en el paciente (Supp & Boyce, 2005).

Los ejemplos más representativos dentro del grupo son Apligraf[®] y OrCell[®]. Apligraf[®] está compuesto por fibroblastos y queratinocitos alogénicos sembrados en una matriz de colágeno bovino tipo I, aprobado por la FDA para el tratamiento de úlceras venosas y pie diabético (Shevchenko *et al.*, 2010). Este producto es considerado como dispositivo clase III y no se distribuye a través de la web o de farmacias. Debe ser prescrito y aplicado por profesionales médicos en centros de cuidado de heridas especializados y con experiencia

en su manejo y aplicación. OrCell[®], se fabrica también a partir de fibroblastos y queratinocitos alogénicos (origen neonatal) incluidos en una matriz de colágeno bovino tipo I. Se diferencia de Apligraf[®] en que el soporte de colágeno I entrecruzado en el que se siembran los fibroblastos es asimétrico: contiene un lado poroso en el que se siembran los fibroblastos y un lado menos poroso sobre el que se cultivan los queratinocitos. Apligraf[®] fue aprobado por la FDA para el tratamiento de sitios donantes en pacientes quemados y para el tratamiento de la epidermólisis papular distrófica recesiva (Fontanilla, Suesca Quintero, & Casadiegos Rincon, 2015; Huang & Fu, 2011).

Soportes de Colágeno

Los soportes empleados en ingeniería de tejidos, son estructuras tridimensionales elaboradas a partir de polímeros de diferente naturaleza; proveen el andamiaje estructural requerido para que las células del lecho de la herida migren, se adhieran, proliferen, se diferencien y sintetizen nuevo tejido (Chan & Leong, 2008). Se pueden emplear solos o sembrados con células, las cuales permanecen durante un tiempo y luego mueren o sufren apoptosis (Espinosa *et al.*, 2010). El colágeno tipo I es el biomaterial más empleado para la elaboración de soportes empleados en el cierre de herida cutánea (Chattopadhyay & Raine, 2014; Ruszczak, 2003); además de ser utilizado en la producción de soportes recomendados para el tratamiento de pérdidas de continuidad de tejido conectivo oral y hueso. Se usa solo o mezclado con otros biomateriales naturales o sintéticos biodegradables, como glicosaminoglicanos y copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico (Chanjuan & Yonggang, 2016). Este tipo de soportes, solos o sembrados con células, son degradados y reemplazados por nuevo tejido después de ser colocados en heridas. En el mercado también se encuentran soportes de materiales no biodegradables que contienen colágeno, usados como cobertura temporal de heridas y quemaduras. Su función es permanecer mientras se mejoran las condiciones de la dermis, con el fin de proveer un lecho en el que se pueda colocar un injerto de piel de tipo malla o un injerto epidermal; luego, son removidos (Chanjuan & Yonggang, 2016).

La principal fuente de colágeno I es el tejido conectivo animal, especialmente de mamíferos (murinos, porcinos y bovinos) y peces (Parenteau-bareil *et al.*, 2011). Sin embargo, se han hecho algunas aproximaciones para la producción de colágeno humano por tecnología de DNA recombinante (Peng *et al.*, 2012; Shilo, Roth, Amzel, Harel-adar, & Tamir, 2013). Desde el punto de vista terapéutico los soportes de colágeno tienen tres

objetivos principales: proveer una estructura óptima para la migración, diferenciación y proliferación celular, modular el microambiente del lecho de la herida para facilitar el cierre y servir como plataforma para la liberación controlada de moléculas bioactivas, como factores de crecimiento, sustancias promotoras del cierre de herida, antibióticos, etc. (Badylak, 2007).

Las características físicoquímicas, micro y macroestructurales, mecánicas y biológicas de los soportes de colágeno I solo o mezclado, determinan su desempeño clínico (Dunn & Ghodbane, 2016; Gorgieva & Kokol, 2008). Su pureza, grado de entrecruzamiento de las fibras y características microestructurales como la interconectividad y la orientación de los poros afectan la migración, adhesión, morfología y diferenciación de las células procedentes del lecho tisular; así como la difusión de nutrientes, desechos metabólicos y oxígeno. La capacidad de inducir un efecto benéfico en las heridas en que se utilizan, depende enormemente de su biodegradabilidad y biocompatibilidad; ya que, los soportes deben ser recambiados por nuevo tejido y no deben ser citotóxicos. Todas estas características dependen del proceso de manufactura, la concentración de colágeno y el método de entrecruzamiento (Q. Zhang, Lu, Kawazoe, & Chen, 2013; Suesca E., 2013; Suesca E., et al., Manuscrito en Revisión).

1.6 Modelos animales para el estudio de cierre de herida

Nuestra comprensión limitada de los mecanismos moleculares, celulares y fisiológicos que gobiernan el cierre de herida repercute en los resultados a menudo decepcionantes de las terapias empleadas. La complejidad del cierre de herida *in vivo* no puede ser completamente recreada en un frasco de cultivo; por eso, los modelos animales constituyen una herramienta necesaria para elucidar la fisiopatología de la enfermedad y proveer soluciones terapéuticas adecuadas (Shrimanker *et al.*, 2013).

Los modelos animales de herida descritos en la literatura, se pueden clasificar en dos grandes grupos: modelos de herida agudos y modelos de herida crónicos. Los primeros, buscan semejar las lesiones de tipo agudo que involucran la epidermis y/o la dermis; dentro de los más representativos encontramos los modelos incisional, excisional y de quemaduras. El otro gran grupo está representado por las heridas de tipo crónico, donde mediante técnicas quirúrgicas especializadas o manipulación genética de los animales se

recrea una condición crónica de los humanos; como por ejemplo, las úlceras diabéticas o las úlceras de origen isquémico (Ansell, Holden, & Hardman, 2012; Dorsett-Martin, 2004; Wang, Olson, Reno, Wright, & Hart, 2001).

Para la evaluación de sustitutos cutáneos, “apósitos inteligentes” y otros dispositivos médicos se prefiere emplear el modelo excisional, ya que este modelo permite la evaluación más amplia de mecanismos involucrados en el cierre, como: epitelización, formación de tejido de granulación, angiogénesis, contracción y formación de cicatriz (Galiano, Michaels, Dobryansky, Levine, & Gurtner, 2004). Adicionalmente, se pueden emplear múltiples estrategias de análisis como el seguimiento clínico con fotografías digitales y algunos métodos más complejos como el análisis histológico, el uso de marcadores para la detección de mediadores moleculares, la estimación de la cantidad de colágeno mediante el contenido de hidroxiprolina y técnicas para evaluar las características mecánicas de la cicatriz (Chaudhari & Mengi, 2006; Dorsett-Martin, 2004; Shrimanker *et al.*, 2013).

El cierre de herida se ha estudiado en diversas especies de animales incluyendo ratones, ratas, cerdos, anfibios, entre otros (Ansell *et al.*, 2012; Middelkoop *et al.*, 2004; Sullivan, Eaglstein, Davis, & Mertz, 2001). Los roedores son candidatos atractivos debido a su disponibilidad, selección, bajo costo y fácil manejo; sin embargo, el uso de éstos animales como modelos ha sido cuestionado debido a las diferencias que presenta con los humanos en la arquitectura tisular y algunos mecanismos que intervienen en el proceso de cierre (V. W. Wong, Sorkin, Glotzbach, Longaker, & Gurtner, 2011). Debido a que es importante considerar estas diferencias para entender las limitaciones inherentes a la biología y anatomía del modelo murino, en la Tabla 1-2 se enuncian y comparan características de la piel de los roedores y la piel de los humanos (Ansell *et al.*, 2012; Dorsett-Martin, 2004).

Tabla 1-2 Principales diferencias entre la piel de los humanos y los roedores

	Roedores	Humanos
Ciclo capilar	Aproximadamente 3 semanas	Altamente variable, depende de la región
Arquitectura epitelial	No posee papilas dermales	Posee papilas dermales
Glándulas sudoríparas apocrinas	No están presentes en la piel, están en la glándula mamaria.	Presentes en la piel de las axilas, la ingle y la región perianal
Propiedades biomecánicas	Delgada, elástica y suelta	Gruesa, relativamente firme, adherida a los tejidos subyacentes.
Grosor de la hipodermis	Dependiente del ciclo capilar	Menos variable
Capa muscular subcutánea	Presente debajo de toda la superficie (<i>Panniculus carnosus</i>)	Presente únicamente en la región del cuello (Platisma)
Mecanismo más importante para el cierre de herida	Contracción	Formación de tejido de granulación y reepitelización

Tomado y modificado de (Ansell *et al.*, 2012)

1.7 Aloe vera

El *Aloe vera* también conocido como *Aloe Barbadosis Miller*, es una planta perenne, xerófila, de tallo cortos y hojas lanceoladas y gruesas. En las hojas se encuentra un tejido especializado para el almacenamiento de agua, esta estructura parenquimatosa contiene el denominado gel o mucilago de *Aloe vera* reconocido por poseer la mayor cantidad de sustancias activas presentes en la planta (Gupta & Malhotra, 2012). En la medicina tradicional, el gel se ha empleado en una gran variedad de condiciones dermatológicas que van desde heridas de tipo agudo como abrasiones, laceraciones y quemaduras solares hasta enfermedades crónicas como la psoriasis, el pénfigo y el lupus en sus manifestaciones cutáneas (Dat, Poon, Pham, & Doust, 2012; Gupta & Malhotra, 2012; Oryan, Mohammadalipour, Moshiri, & Tabandeh, 2014). A pesar de ser una de las especies donde mejor se ha descrito el perfil fitoquímico, actualmente son pocos los compuestos

que se han podido relacionar de manera directa con un efecto terapéutico (Chen, Van Wyk, Vermaak, & Viljoen, 2012).

Las investigaciones realizadas en las últimas tres décadas han mostrado que la acción terapéutica del gel de *A. vera* en el cierre de herida se concentra en dos de las fases más importantes del proceso: la fase inflamatoria y la fase proliferativa. El gel se caracteriza por tener actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, angiogénica y antioxidante (Hamman, 2008; Oryan *et al.*, 2014; Tabandeh, Oryan, & Mohammadalipour, 2014). Los compuestos relacionados con estas actividades terapéuticas son mono y polisacáridos, siendo la manosa-6-fosfato y el Acemanano los más representativos, algunos fenóles, glicósidos como las antraquinonas, enzimas y vitaminas (Gupta & Malhotra, 2012; Hamman, 2008). Los efectos terapéuticos que se atribuyen a la planta se deben a un efecto sinérgico de los compuestos más que a la acción de una única sustancia dentro del extracto (Dagne, Bisrat, Viljoen, & Wyk, 2000).

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el desempeño pre-clínico de soportes de colágeno tipo I con micropartículas de gelatina--colágeno (SC--GC), asociados a un extracto acuoso de mucílago de la hoja de *Aloe vera* en heridas cutáneas de espesor total.

2.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar un modelo de herida de espesor total de piel en animales de la especie *Cavia porcellus*.
2. Evaluar la eficacia clínica de injertar SC-GC asociados a extracto de *Aloe vera* en heridas en piel de espesor total en el modelo animal planteado.
3. Determinar y relacionar las alteraciones histomorfométricas secundarias a la implementación del injerto con la eficacia clínica del mismo.

3 Materiales y Métodos

3.1 Obtención del Material Vegetal y Obtención del Extracto

Pencas de *Aloe vera* provenientes de tres cultivos diferentes fueron adquiridas en plazas de mercado de Bogotá. El procesamiento para la extracción del mucilago de la planta se realizó siguiendo el método descrito por Choi *et al.*, con algunas modificaciones (Choi *et al.*, 2001). Las pencas fueron lavadas exhaustivamente con agua desionizada y congeladas a -20°C durante 24 horas. Siguiendo el eje longitudinal de cada penca congelada, cuidadosamente se retiró la corteza con una hoja de bisturí y se extrajo el mucilago; el cual, fue homogenizado en una licuadora y centrifugado a 1500 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos fueron congelados y liofilizados para garantizar su conservación. Los liofilizados a su vez fueron almacenados y protegidos de la luz y la humedad.

3.2 Evaluación de la Citocompatibilidad del Extracto

Antes de cargar el extracto de *A. vera* en los soportes de colágeno I que contienen micropartículas de gelatina-colágeno, se llevó a cabo un ensayo para evaluar su citotoxicidad de acuerdo con la norma ISO 10993-5 (Biological evaluation of medical devices-part 5: in vitro MTT cytotoxicity test), siguiendo métodos de evaluación de citotoxicidad *in vitro* detallados en trabajos previos del grupo (Millan Cortes, 2014). Diferentes cantidades del liofilizado del mucilago (0.1% - 2% p/v) fueron resuspendidas en agua desionizada y agitadas para asegurar su completa dispersión. Por otro lado, fibroblastos L929 (NCTC clone 929, American Type Culture Collection (ATCC) número: CCL-1™) fueron sembrados en cajas de 96 pozos con una densidad de 1×10^4 células/100 µl, se incubaron (37 °C, 5 % CO₂, 24 h) con las concentraciones mencionadas anteriormente y controles positivos (50 % glicerol y 25 % DMSO) y negativos (Silicona 0.2g/ml medio de cultivo). Después de remover el extracto o los controles, se agregaron

100 µl de MTT (1 mg/ml) y se incubó por 2h. Finalmente, se removió el MTT y se adiciono isopropanolol para disolver los cristales de Formazan, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm (TRIAD Multimode Detector). La reactividad biológica de las células incubadas con las mismas concentraciones del extracto fue evaluada con un microscopio de luz invertida.

3.3 Elaboración de Soportes de Colágeno con Micropartículas de Gelatina-Colágeno (SCGC)

Estos soportes fueron elaborados siguiendo la metodología establecida por el grupo (Jiménez R., *et al.*, 2015). Brevemente, una dispersión coloidal de colágeno bovino tipo I, extraído mediante métodos estandarizados por el grupo (Suesca, 2013), fue mezclada en condiciones de agitación con micropartículas de gelatina-colágeno; las cuales, fueron obtenidas con la técnica de microemulsión a partir de una dispersión coloidal en proporción 10:1 de gelatina/colágeno. Para obtener los soportes, la mezcla obtenida fue servida en moldes, congelada y liofilizada; posteriormente se entrecruzaron con Glutaraldehído y se lavaron.

3.4 Asociación del Soporte de Colágeno y el Extracto Vegetal.

Para establecer la dosis de carga del extracto se tuvieron en cuenta los resultados del ensayo de citotoxicidad y la facilidad de asociación de un extracto altamente viscoso, la dosis establecida fue 0.2% p/v para lo cual se preparó una dispersión del liofilizado del mucílago en agua desionizada. Fragmentos (3 cm²) de los soportes de colágeno bovino tipo I conteniendo micropartículas de gelatina-colágeno fueron sumergidos en el extracto de *Aloe vera* durante 12 horas en condiciones de vacío (20 mTorr), para después ser congelados a -20°C y liofilizados. El extracto fue cargado en las micropartículas de gelatina-colágeno, colocándolas en el extracto acuoso de *A. vera* durante 12 horas en condiciones de vacío (20 mTorr) y luego, dejándolas secar.

Por último, se evaluó la citotoxicidad y reactividad biológica de los soportes cargados, para lo cual se incluyeron los mismos controles empleados en la evaluación de citotoxicidad hecha para el extracto solo. Para realizar los ensayos de citotoxicidad de los soportes asociados previo a su uso como injerto en animales de experimentación, se empleó la línea

celular de fibroblastos L929 (NCTC clone 929, American Type Culture Collection (ATCC) número: CCL-1™). A manera de resumen: Las células fueron cultivadas en cajas T-75 hasta alcanzar una confluencia del 80% en Medio Esencial Mínimo de Dubelco (DMEM) suplementado. Los cultivos fueron mantenidos en atmósfera de aire 95% y CO₂ al 5% a 37°C, reemplazando el medio cada tercer día. Por otro lado, los soportes asociados con el extracto acuoso de *Aloe vera* fueron sumergidos en cajas de cultivo de 6 pozos (Costar®, Inc) que contenían 1mL de Medio DMEM suplementado como vehículo de extracción y se incubaron por 24h (5 % CO₂, 37 °C y humedad > 90 %); seguidamente se retiró el vehículo de extracción, se puso en contacto con los fibroblastos cultivados y se evaluó la citotoxicidad del mismo adaptando el protocolo de citotoxicidad descrito en el numeral 3.2.

La viabilidad de las células sometidas al ensayo descrito anteriormente fue superior al 80% en todas las réplicas realizadas (datos no publicados) por esta razón el sistema se consideró como no citotóxico.

3.5 Ensayo de Desempeño Preclínico *In Vivo*

3.5.1 Revisión Documental

Con el fin de seleccionar el modelo animal que mejor se ajustara a las necesidades del proyecto, se tuvieron en cuenta factores como la realización de heridas de dos tamaños diferentes, la dificultad para la manipulación y elaboración de soportes de colágeno con tamaños inferiores a 1cm² y la necesidad de un modelo homogéneo. Se llevó a cabo una búsqueda en tres de las principales bases de datos del área Biomédica (Scopus, Science Direct y Pubmed) con los siguientes criterios de búsqueda "*animal and models and skin and tissue engineering*" // "*pig or guinea-pig or mice or rat*". El motor de búsqueda se renovó cada dos semanas dentro del periodo comprendido entre diciembre de 2014 y mayo de 2016 al final se obtuvieron los datos que se ilustran en la gráfica del numeral 4.1.

3.5.2 Animales

Se emplearon cobayos Hartley machos sanos, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud, de 120 días, con un peso inicial de 600 a 650 gramos. Los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable (temperatura: 19 +/- 2°C), con ciclos de

luz/oscuridad (12 horas) y alimentados con concentrado peletizado (LabDietGuineaPig® Lab Diet). Durante todo el tiempo del experimento dispusieron de agua potable a voluntad.

3.5.3 Ensayo piloto

Para el experimento piloto se utilizaron 8 machos sanos de raza Hartley, dos de los animales provenían de un ensayo anterior y se emplearon para determinar el tamaño máximo de herida teniendo en cuenta que se realizarían dos heridas por cada individuo, se probaron tres tamaños de herida diferentes (1, 2 y 3 cm²). Se realizaron seis heridas cuadradas contralaterales en la piel del dorso (2 por cada tamaño) mediante disección aguda y se observó que el tamaño intermedio no representó una diferencia significativa, se empleó la constante de Meeh's con algunas modificaciones (Gouma *et al.*, 2012) para calcular la superficie corporal total y se obtuvo que para un cobayo con un peso de 600 gramos una herida de 6cm² corresponde al 25% de la superficie corporal. Por lo anterior, se eligieron los tamaños de 1 y 3 cm² para ser usados en el piloto y el ensayo principal.

En los seis animales restantes se evaluó la técnica quirúrgica a emplear, en tres de los animales se probó una técnica descrita previamente para crear heridas por escisión que busca evitar la contracción de la piel (Galiano *et al.*, 2004), como se explicó anteriormente este es el principal mecanismo para el cierre de herida en los roedores, y una diferencia importante con el cierre de herida en humanos. En el grupo restante de tres animales se realizó la técnica descrita por Cross (Cross, Naylor, Coleman, & Teo, 1995). Aleatoriamente dentro de los dos grupos se evaluó además el uso de dos vendajes oclusivos: Tegaderm® y Opsite®, obteniendo mejores resultados con Tegaderm®, la venda se adhería mejor a la piel, permitía la salida del exudado y no provocaba irritación en los sitios de contacto. Los animales fueron asignados de manera aleatoria a cada tratamiento. La matriz empleada se muestra en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1 Matriz para Asignar Tratamientos en el Ensayo Piloto

	Técnica Quirúrgica de Galiano	Técnica Quirúrgica de Cross
Opsite®	n1-n4	n3
Tegaderm®	n2	n5-n6

3.5.4 Tratamientos

Los tratamientos evaluados durante este estudio, fueron:

- ✓ Tratamiento 1: Injerto de soportes de colágeno I que incluyen micropartículas de gelatina-colágeno (SC-GC).
- ✓ Tratamiento 2: Injerto de soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno, cargados con extracto acuoso de *Aloe vera* (SC-GCAv).
- ✓ Tratamiento 3 (MPAv): Cubrimiento con una suspensión de micropartículas de gelatina-colágeno cargadas con el extracto acuoso de *Aloe vera* (MPAv), en un hidrogel de colágeno bovino tipo I que facilita su aplicación sobre la herida.

3.5.5 Diseño experimental

El número de animales empleado en el estudio fue calculado usando el paquete estadístico STATISTICA® basándose en los datos obtenidos del ensayo piloto. Se emplearon 30 cobayos que fueron distribuidos al azar en uno de los seis grupos experimentales. Por cada tamaño de herida se usaron tres grupos experimentales, cada uno de los cuales recibió uno de los siguientes tratamientos: micropartículas de gelatina colágeno (SC-GC), micropartículas de gelatina colágeno asociadas al extracto acuoso de *A. vera* (SC-GC-Av) o micropartículas de colágeno suspendidas en una dispersión coloidal de colágeno I (MP-Av). Una de las heridas de los animales de cada grupo recibió el tratamiento asignado, mientras que la herida contralateral se dejó cerrar por segunda intención (control). Los tratamientos fueron aleatorizados de la forma en que se indica en la Tabla 3-2. El número total de grupos incluidos en el estudio preclínico, fue de seis.

Tabla 3-2 Distribución de los Grupos de Tratamiento de Acuerdo con el Diseño Experimental

	Herida de 1 cm ²			Herida de 3 cm ²		
	G1 (n=5)	G2 (n=5)	G3 (n=5)	G4 (n=5)	G5 (n=5)	G6 (n=5)
Tratamiento	C+SC-GC*	C+SC-GC-Av**	C+MP-Av***	C+SC-GC*	C+SC-GC-Av**	C+MP-Av***

C control (Segunda intención) * **SC-GC** Soporte de Colágeno. ****SC-GC-Av** Soporte de Colágeno y Micropartículas de *Aloe vera*. *** **MP-Av** Micropartículas de *Aloe vera*

La ubicación en el animal de las heridas por escisión realizadas, es mostrada en la Figura 3-1.

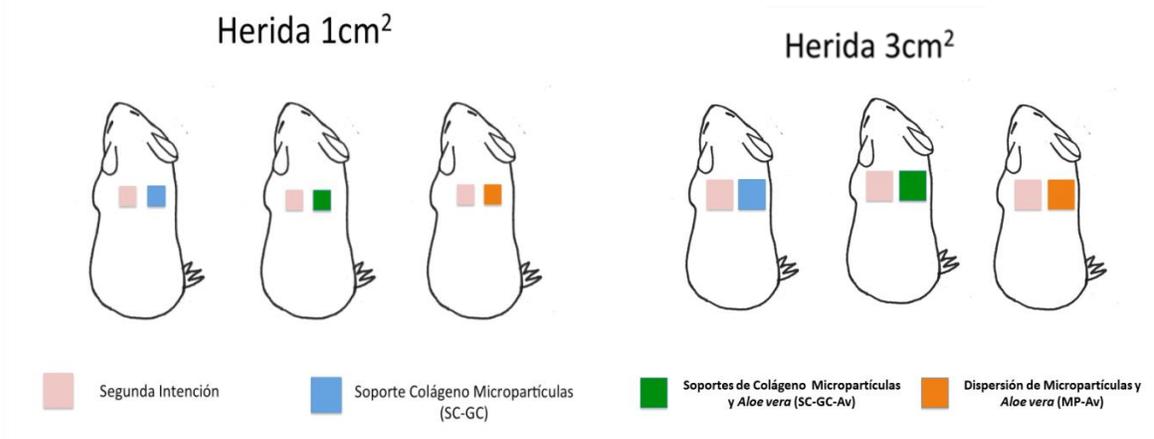


Figura 3-1 Representación Esquemática de las Heridas en el Sujeto Experimental (*Cavia porcellus*).

3.5.6 Procedimiento quirúrgico y posicionamiento del injerto.

Los animales fueron anestesiados mediante el suministro por vía intraperitoneal de una dosis de Xilacina 5mg/kg (Rompun®, Bayer) y Ketamina 80 mg/kg (Ketamina®, Holliday); la analgesia se completó usando Butorfanol 2mg/kg (Butormin®Holliday) por vía subcutánea. Una vez en plano anestésico quirúrgico, se procedió con la tricotomía en el área del dorso, para esto se utilizó un Clipper eléctrico (Oster Professional®) y hojas para afeitar de acero inoxidable (Minora®), se lavó con agua jabonosa y se desinfectó con una solución de Clorhexidina al 0.5% y Etanol al 70%.

En las regiones paravertebral izquierda y derecha, se realizó una herida por escisión de espesor total, el área correspondió al grupo al cual pertenecía el animal. Todos los defectos tenían el mismo tamaño, se manejaron con la misma técnica quirúrgica y fueron realizados por el mismo cirujano. Los soportes estériles se fijaron al lecho de la herida mediante el uso de suturas reabsorbibles (Vicryl® 6.0 Ethicon), empleando un patrón simple continuo. Las heridas fueron cubiertas con un vendaje oclusivo (Tegaderm®3M Co.) y una venda ortopédica impermeable (PetFlex® AndoverHealthcare), para prevenir la contaminación bacteriana y la irritación medioambiental (Figura 3-2).

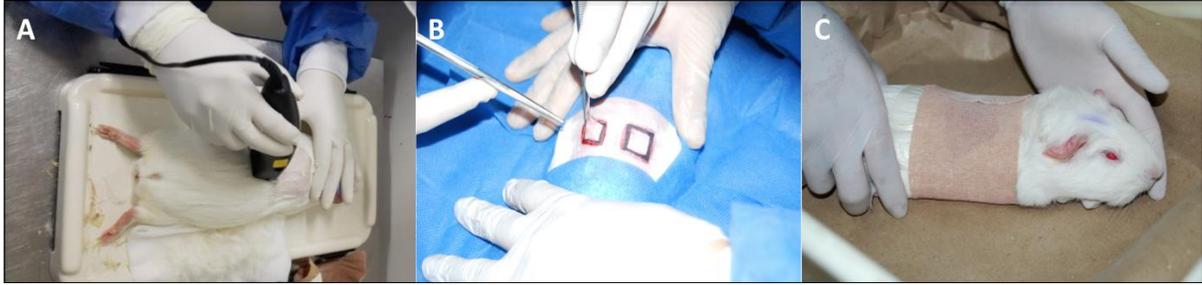


Figura 3-2 Procedimiento Quirúrgico A. Tricotomía B. Creación de la herida C. Vendaje y postquirúrgico de los animales.

Los animales fueron alojados individualmente durante su recuperación y se utilizó una manta eléctrica en el postquirúrgico inmediato para prevenir la hipotermia. El protocolo de medicación postquirúrgico contempló el uso de Tramadol a dosis de 3mg/kg (Tramadol Genfar®) por vía subcutánea cada 24 horas durante 3 días consecutivos y el uso de Enrofloxacin a dosis de 5mg/kg (Baytril®Bayer) por vía intraperitoneal cada 12 horas durante 5 días. Siete días después de la cirugía se realizó desbridamiento de la herida, y se colocó un nuevo soporte repitiendo el mismo procedimiento.

3.5.7 Seguimiento clínico

Se realizó seguimiento diario a los cobayos con el fin de verificar su estado de salud. En los días 7, 15, 21 y 30 se tomó registro de variables categóricas: persistencia o desalojo del injerto, presencia o no de úlceras, permanencia del material de sutura y evidencia clínica de infección e inflamación. Con éste fin, se empleó la herramienta de registro Bates–Jensen Wound Assessment Tool (BWAT)(McNees, 2006) (Tabla 3-2), además se hizo registro fotográfico de las zonas tratadas en los días 0, 15, 21 y 30 postratamiento.

Tabla 3-2 Resumen del Sistema de Puntuación y los Elementos de Descripción (Herramienta BWAT), empleados para la Evaluación de las Características Clínicas de las Heridas *.

Elemento de descripción	1	2	3	4	5
Bordes	Indistintos, difusos, no visibles.	Delineados, adheridos y con la misma altura de la herida	Bien definidos, no adheridos a la base de la herida.	Bien definidos, no adheridos a la base y engrosados.	Bien definidos, fibroticos e hiperqueratoticos
Separación tejido	Ninguno	Menos de 2cm en los márgenes de la herida	2-4 cm en el 50% de los márgenes de la herida	2-4 cm en más del 50% de los márgenes de	Mayor a 4cm o formando túneles en cualquier área.

				la herida.	
Tipo Exudado	Ninguno	Sanguinolento	Serosanguinolento	Seroso	Purulento
Cantidad Exudado	Ninguno, herida seca	Herida húmeda, pero sin exudación visible	Escasa	Moderada	Abundante
Color de la piel alrededor de la herida	Rosa o normal	Rojo brillante y que palidece con la presión	Blanca o gris pálida // hipopigmentada	Rojo oscuro// purpura y que no cambia con la presión	Negra o hiperpigmentada
Edema del tejido periférico	Sin hinchazón o edema	El edema no es indentable y no se extiende más de 4cm en la periferia	El edema no es indentable y se extiende más de 4cm en la periferia	Edema indentable que se extiende <4cm	Edema indentable que se extiende > 4cm
Tumefacción del tejido periférico	No presente	Tumefacción <2cm alrededor herida	Tumefacción de 2-4 cm que se extiende <50% de la herida	Tumefacción de 2-4 cm que se extiende >50% de la herida	Mayor a 4cm en cualquier área de la herida
Epitelización	100% de la herida cubierta superficie intacta	75-100% de la herida cubierta y/o el tejido epitelial se extiende más de 0.5 cm en el lecho de la herida	50-75% de la herida cubierta y/o el tejido epitelial se extiende más de 0.5 cm en el lecho de la herida	25-50% de la herida cubierta	<25% de la herida cubierta

*Cada elemento fue calificado en una escala de 5 puntos. Un puntaje de 5 equivale al resultado más severo para cada característica particular y 1 representa el menos severo. El puntaje total se deriva de la sumatoria de los elementos individuales.

3.5.8 Análisis histológico e histomorfométrico del tejido

Se realizó eutanasia de todos los animales 4 semanas después de la creación de las heridas, siguiendo los protocolos establecidos en las guías para la eutanasia de animales de laboratorio de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) (Leary *et al.*, 2013). Posteriormente, se tomaron biopsias de espesor total del tejido de la zona injertada y de la zona que cerró por segunda intención, también se incluyó piel sana adyacente como control. Las biopsias fueron fijadas en una solución de formol al 10% en PBS (pH 7,4 a 4°C durante 24 h) y procesadas para la obtención de cortes histológicos que fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

Las preparaciones obtenidas fueron evaluadas mediante microscopia de luz; para ello, se tomaron fotografías de los cortes histológicos de manera aleatoria. A excepción de la evaluación de la disposición de fibras de colágeno, los datos obtenidos en la zona de la herida fueron normalizados respecto a los datos obtenidos en la zona sana adyacente. Se evaluaron 18 campos con el objetivo 40x (90 imágenes por tratamiento y el control para cada grupo), en las imágenes se analizó:

- Número de capas del epitelio: Número de células desde la membrana basal hasta el estrato granuloso.
- Vascularización: Conteo de vasos por campo.
- Intensidad del infiltrado inflamatorio: Conteo de leucocitos por campo, el valor promedio se intercaló en un rango de valores para clasificar la inflamación como nula, leve, moderada y severa (Espinosa *et al.*, 2010).
- Disposición de las fibras colágenas: Porcentaje de campos clasificados de acuerdo a características cualitativas de la disposición de fibras en cuanto a orientación (aleatoria y paralela al eje del epitelio) y densidad (laxa, fibrosa y densa), por cada tratamiento y el control uniendo todos los grupos (Gibson Corley, Olivier, & Meyerholz, 2013).

Las imágenes histológicas fueron analizadas usando el software NIS ELEMENTS AR 3.0 (Nikon, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan) y el software Image J [versión libre obtenida por medio electrónico del National Institutes of Health (NIH), USA].

3.6 Análisis Estadístico

Para el desarrollo del análisis estadístico se plantearon modelos log-lineales mixtos para las variables número de capas del epitelio y número de vasos sanguíneos. Igualmente, modelos de regresión normal mixtos para el grosor de tejido conectivo y número de células inflamatorias, a tres vías de clasificación (Tamaño de la herida, presencia o no de soporte y presencia o no de *Aloe vera*). Se desarrollaron análisis de desvíos para determinar la significancia de cada uno de los factores y su interacción, posterior a esto, se llevó a cabo pruebas de comparaciones múltiples para determinar diferencias significativas entre pares

de tratamientos y seleccionar el que produce una mejor respuesta. Los supuestos del modelo se evaluaron mediante *envelopes*.

3.7 Consideraciones Éticas

Este trabajo hace parte del proyecto “Evaluación de soportes de colágeno tipo I modificados microestructuralmente para su asociación a extractos vegetales con actividad cicatrizante en el tratamiento de heridas de la piel de espesor total con diferentes tamaños” financiado por Colciencias; el cual, fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias (Acta 03 del 3 de junio de 2012).

El uso de animales de experimentación se realizó de acuerdo a los lineamientos internacionales [Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (National Association for Biomedical Research, 2007; National Institute of Health, 1996), ARVO] y nacionales [Artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989]. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo por personal calificado, los materiales biosanitarios y anatomopatológicos fueron almacenados y se hizo disposición de los mismos, según lo establecido por los protocolos de bioseguridad de la Universidad Nacional de Colombia y del Instituto Nacional de Salud.

4 Resultados

4.1 Ensayo piloto para el desarrollo de un modelo de herida de espesor total en la especie *Cavia porcellus*.

Antes de cumplir con este objetivo de la tesis, se llevó a cabo una revisión de la literatura que hace referencia a los diferentes modelos animales disponibles para la evaluación de sustitutos artificiales de piel como parte del desarrollo de un producto de la ingeniería de tejidos. La Grafica 4-1. muestra los resultados obtenidos después de la búsqueda en 3 de las principales bases de datos relacionadas con el tema interés (Scopus, Pubmed, Science Direct) (Steinbrook, 2006). El modelo animal ideal para la evaluación de los sustitutos cutáneos es el cerdo, debido a que estructuralmente su piel se asemeja en más de un 90% con la piel humana (Sullivan, Eaglstein, Davis, & Mertz, 2001; Summerfield, Meurens, & Ricklin, 2014; Wang, Olson, Reno, Wright, & Hart, 2001). Sin embargo, este modelo está limitado por el costo de mantenimiento de los animales, los requerimientos de espacio para su alojamiento y el hecho de que en el país no se cuenta con granjas certificadas que provean animales de grado experimental.



Figura 4-1 Resumen de Publicaciones Anuales en la Búsqueda de Bases de Datos Las palabras claves empleadas fueron “animal models skin tissue engineering” and “pig/guinea-pig/mice/rat” Tomado y modificado de Scopus, Science Direct y Pubmed 2016.

La gráfica muestra que la mayoría de los ensayos emplearon como sujetos experimentales roedores; en primer lugar, ratones, seguido de ratas y finalmente cobayos. Para ésta tesis se seleccionó el modelo cobayo, por tres razones primordiales:

1. El diseño particular del sustituto dificulta su manipulación en tamaños inferiores a un centímetro cuadrado (1 cm^2) y una herida excisional de este tamaño o de un tamaño superior en un animal con un peso inferior a los 200 gramos se considera cruenta (Dorsett-Martin & Wysocki, 2008; V. W. Wong *et al.*, 2011). Adicionalmente, el planteamiento inicial supone la evaluación de dos tamaños de herida lo cual se traduce en que se debe realizar una herida de por lo menos 1 cm^2 y otra de un tamaño superior.
2. Dos características del cobayo hacen que sea un modelo más cercano al modelo ideal para este tipo de desarrollos: es un animal deficiente en vitamina C al igual que los humanos y el ácido ascórbico es un cofactor en la síntesis de colágeno (Lachapelle & Drouin, 2011), la respuesta inflamatoria celular inicial- crítica en el proceso de cierre de herida- es similar a la de los humanos adultos (Bos, 2005; Padilla-Carlin, McMurray, & Hickey, 2008; Summerfield *et al.*, 2014).
3. Es una especie dócil y es el único animal de cría controlada con fines de experimentación (diferente a ratones, ratas y hámsters) que está disponible en el país (Botero & Gómez, 2013).

Una vez escogida la especie animal, se llevó a cabo el ensayo piloto con el fin de determinar el tamaño crítico de herida, el procedimiento quirúrgico y obtener datos experimentales que fundamentaron el diseño experimental del ensayo animal definitivo. En la Figura 4-2 se observan fotografías que muestran el procedimiento quirúrgico y los dos tipos de heridas realizados (1cm^2 y 3cm^2). Los datos del ensayo piloto permitieron determinar la viabilidad de hacer heridas contralaterales de los dos tamaños evaluados; igualmente, evidenciar que solo se puede hacer una herida mayor a 3cm^2 por animal.



Figura 4-2 Procedimiento Quirúrgico Realizado en el Ensayo Piloto A. Delimitación del área a escindir. B. Heridas de espesor total de 1cm², nótese que a pesar de ser las de menor tamaño comprometen buena parte del dorso del animal. C. Heridas de espesor total de 3cm².

4.2 Evaluación Clínica del Desempeño de los Tratamientos en Estudio.

Con el fin de comparar el cierre de las heridas contralaterales realizadas en el dorso de cada animal, se hizo seguimiento de las mismas en los días 7, 15, 21 y 30 post-cirugía. Para cada momento del seguimiento se empleó una escala de valoración y registro fotográfico. La escala de valoración fue elaborada teniendo en cuenta la herramienta BWAT, que permite establecer un puntaje de severidad para cada tratamiento, e implementada por la veterinaria y la técnica veterinaria encargadas del manejo de los animales.

El análisis de la escala de valoración sugirió que, en los dos tamaños de herida estudiados, las heridas tratadas con SC-GC considerando todos los puntos de observación tuvieron mejores características clínicas que las heridas control. En el séptimo día de observación fue evidente este comportamiento para las heridas de los dos tamaños y en los días 21 y 30 de seguimiento se observó un mejor desempeño en las heridas de 1cm². Igualmente, los resultados sugieren que el cierre de herida en los animales sometidos a este tratamiento fue mejor que el observado en los grupos que recibieron SC-GC-Av y MP-Av. En éstos últimos grupos, el cierre fue similar o de menor calidad que el observado en los respectivos controles (Figura 4-3).

Las heridas de mayor tamaño en los tratamientos con SC-GC y SC-Av presentaron puntuaciones ligeramente superiores que las heridas de menor tamaño en cada una de las observaciones. En cambio, las heridas tratadas con MP-Av mostraron puntuaciones superiores comparadas con el control y con los demás tratamientos.

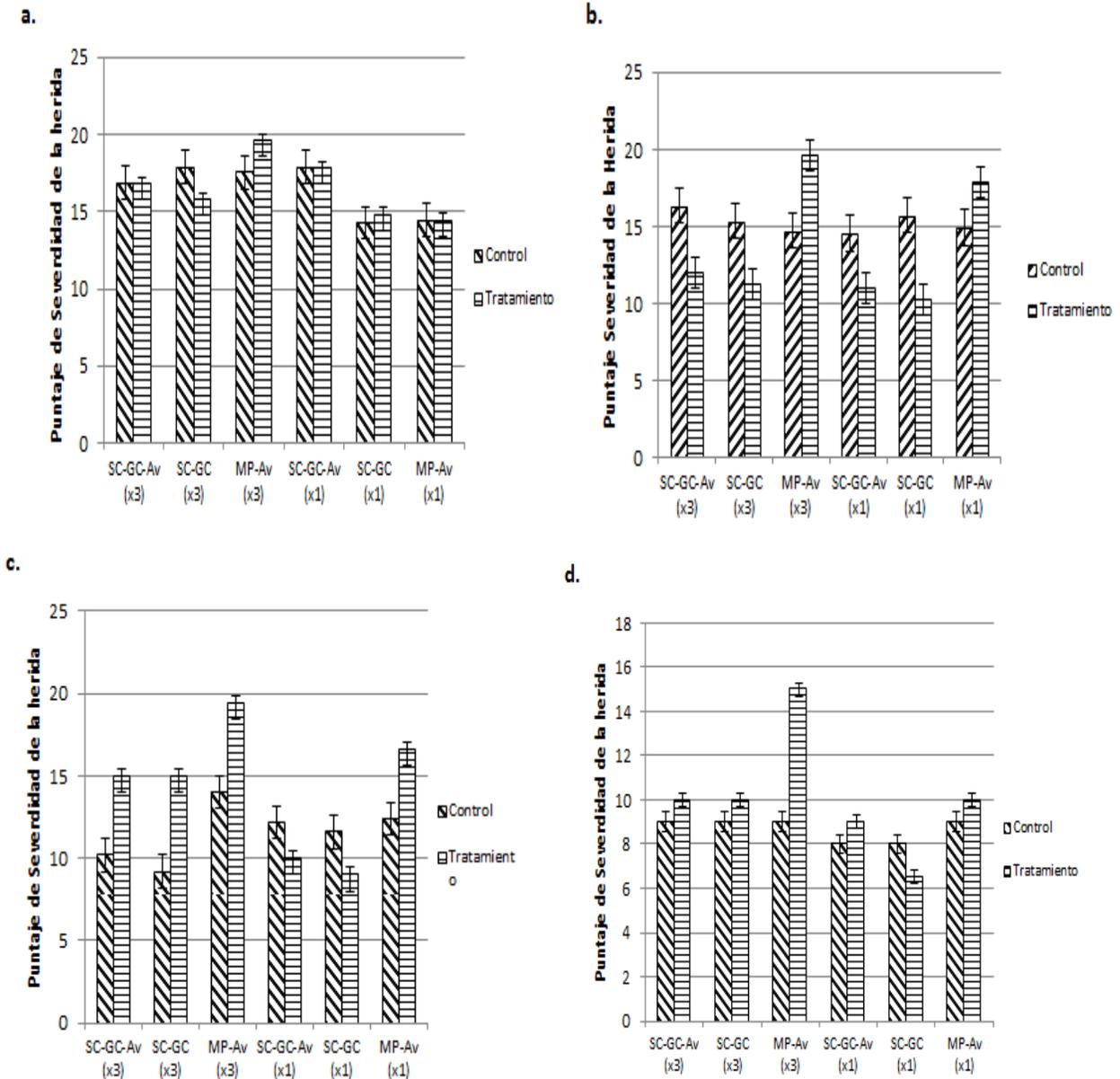


Figura 4-3 Severidad de las Heridas en los Tres Grupos de Animales Estudiados Puntuación de severidad para cada tratamiento, establecida con base en las observaciones consignadas en la escala de valoración implementada en (a) día 7; (b) día 15; (c) día 21 y (d) día 30 post-cirugía.

En ninguno de los grupos el registro fotográfico de los tratamientos y sus controles, incluye las fotografías correspondientes a las observaciones del día 15. En el seguimiento fotográfico de los dos grupos tratados con SC-GC, las heridas mostraron morfología plana con bordes nítidos, moderada exudación y formación de tejido de granulación. No se observaron signos visibles de procesos infecciosos o zonas necróticas. El soporte se adhirió al lecho de la herida y se observó su degradación parcial el día 7, momento en el

cual se realizó desbridamiento de la herida y se reposicionó un soporte con las mismas características del soporte inicial (Figura 4-4). En el día 21 se veían los soportes sin signos de degradación y encapsulados, razón por la cual, fueron removidos observándose la epitelización casi completa de todas las heridas (tratadas y control) (Figura 4-5).

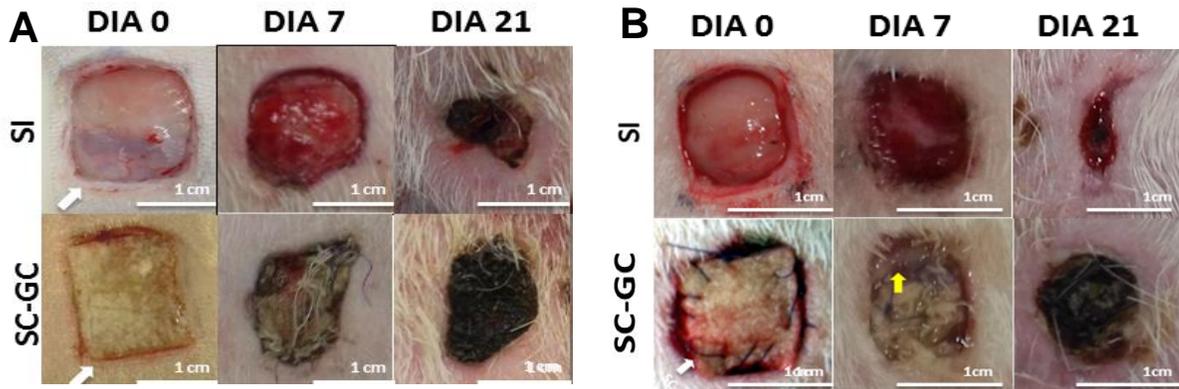


Figura 4-4 Seguimiento Clínico del Grupo Tratado con SC-GC A. Seguimiento fotográfico del grupo con tamaño de herida de 3cm². **B.** Seguimiento fotográfico del grupo con tamaño de herida de 1 cm². Las flechas blancas señalan los soportes posicionados el día 0, las flechas amarillas muestran la degradación parcial de los soportes el día 7.



Figura 4-5 Apariencia de la Zona Tratada con SC-GC en el Día 21 Borde levantado del SC-GC- que evidencia la ocurrencia de cierre cicatrizal por debajo del material injertado.

En los grupos tratados con SC-GC cargado con *Aloe vera*, las heridas mostraron morfología plana con bordes identificables, moderada exudación y formación de tejido de granulación (Figura 4-6). En ningún caso se observó degradación del soporte al momento del desbridamiento (día 7), ni en los días posteriores. Antes y después del séptimo día, los soportes se mantuvieron adheridos al lecho de la herida y después de ser removidos en el día 21, se observó epitelización insipiente.

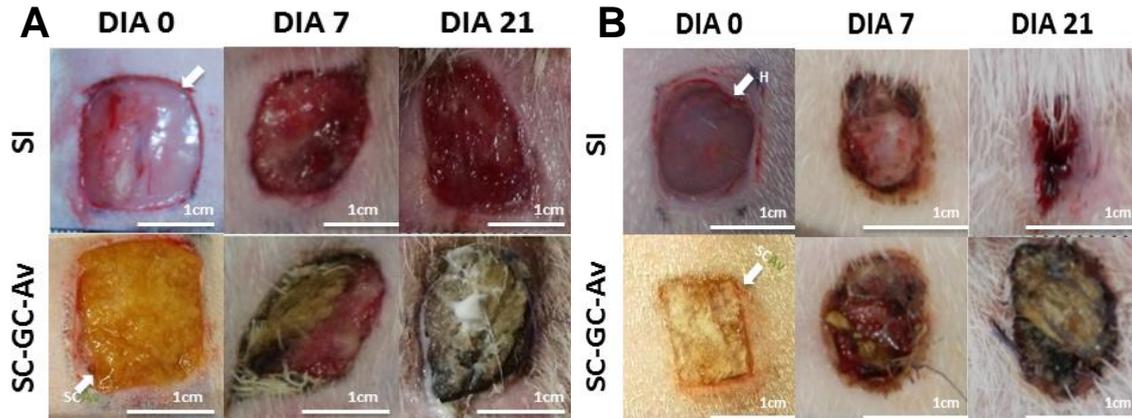


Figura 4-6 Seguimiento del Grupo Tratado con SC-GC asociado a Aloe vera (SC-GC-Av) A. Seguimiento fotográfico del grupo con tamaño de herida de 3cm². **B.** Seguimiento fotográfico del grupo con tamaño de herida de 1 cm². Las flechas blancas señalan los soportes posicionados el día 0.

Las heridas de los grupos tratados con dispersión coloidal de colágeno y micropartículas de *A. vera* exhibieron edema del tejido periférico y bordes inflamados, formación de espacio muerto y abundante exudado sero-sanguinolento durante las dos primeras semanas de observación (Figura 4-7). Aparentemente, el tejido de granulación en las heridas tratadas fue mucho menor que el formado en la herida control; igualmente, en el día 21 las heridas tratadas mostraron menor contracción que las heridas control; las cuales, exhibieron cierre casi completo (Ver flechas blancas, Figura 4-7)

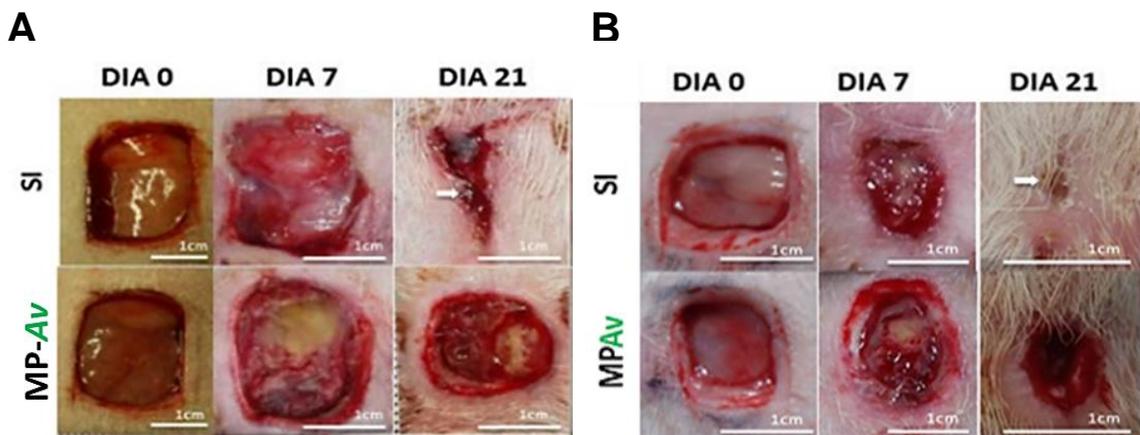


Figura 4-7 Fotografías del Grupo Tratado con Dispersión Coloidal de Colágeno y Micropartículas de Gelatina-Colágeno Asociadas con Aloe vera. A. Seguimiento fotográfico del grupo con tamaño de herida de 3cm². **B.** Seguimiento fotográfico del grupo con tamaño de herida de 1 cm². Las flechas blancas señalan la evidente contracción de las heridas control en el día 21.

La Figura 4-8 muestra imágenes representativas de la apariencia en el día 30, de las heridas tratadas y control de los seis grupos incluidos en el estudio. En todos los sujetos experimentales de los grupos tratados con SC-GC, las heridas epitelizaron completamente y mostraron menor contractura que las heridas control. También, se observó que las cicatrices formadas presentaron la misma coloración de la piel sana adyacente. Aunque todos los controles del grupo con heridas de mayor tamaño epitelizaron, algunos de los controles del grupo con heridas de menor tamaño presentaron zonas en las que no se formó epitelio (Figura 4-8, Panel A).

El Panel B de la Figura 4-8 contiene el registro fotográfico representativo de los animales que fueron injertados con SC-GC-Av. En éste grupo, las heridas de mayor tamaño presentaron epitelización incompleta en todos los sujetos experimentales. Aunque las heridas pequeñas epitelizaron mejor que las grandes, en todos los casos se formaron cicatrices hiperpigmentadas (Figura 4-8, Panel B).

La Figura 4-8, Panel C muestra imágenes representativas de los animales en cuyas heridas se aplicó dispersión coloidal de colágeno con micropartículas de *A. vera* y sus controles. En todos los casos las heridas de 3cm² que recibieron tratamiento no cerraron observándose epitelización incompleta. Contrariamente, en todas las heridas de menor tamaño tratadas se formaron cicatrices con escasa contractura, de tonalidad rojiza y con epitelialización completa.

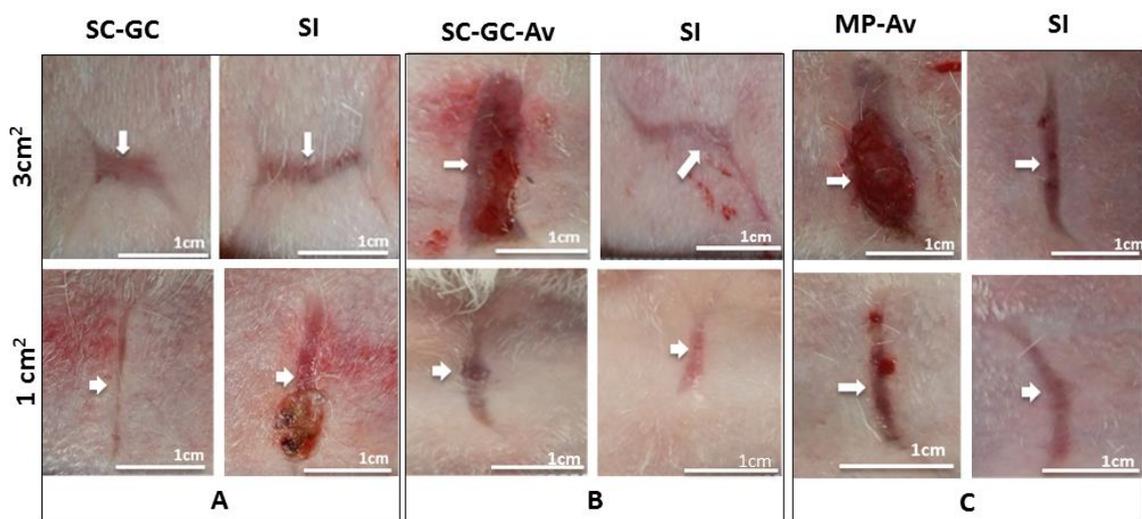


Figura 4-8 Imágenes clínicas representativas de las cicatrices después de los tratamientos en cada grupo SC-GC: Soporte de colágeno, SC-GC-Av: soporte de colágeno asociado al extracto de *Aloe vera*, MP-

Av: Dispersión con micropartículas y *Aloe vera*, SI: cierre por segunda intención. Las flechas blancas indican la formación de cicatriz. Nótese el mejor aspecto clínico de las heridas tratadas con SC-GC.

4.3 Análisis Histomorfométrico del Tejido

El análisis histomorfométrico de las biopsias de tejido proveniente de las zonas tratadas y sanas circundantes evaluó cualitativamente la apariencia histológica de los cortes (análisis histológico descriptivo) y cuantitativamente (análisis morfométrico) las siguientes variables: número de capas de epitelio, grosor del tejido conectivo, disposición de las fibras de colágeno, cantidad de células inflamatorias (inflamación) y cantidad de vasos sanguíneos (vascularización). En todos los casos los datos fueron normalizados con los datos obtenidos en la zona sana adyacente.

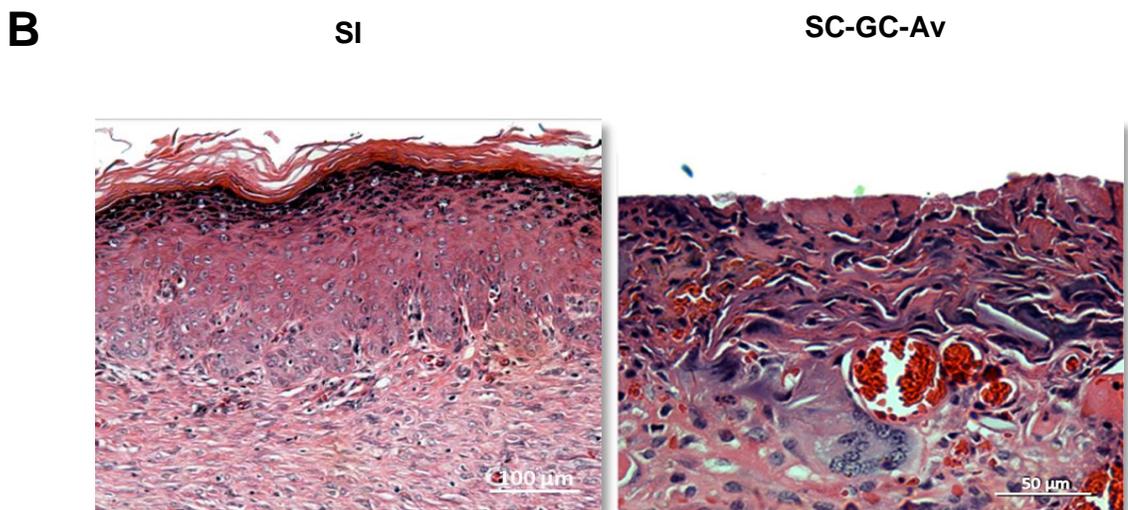
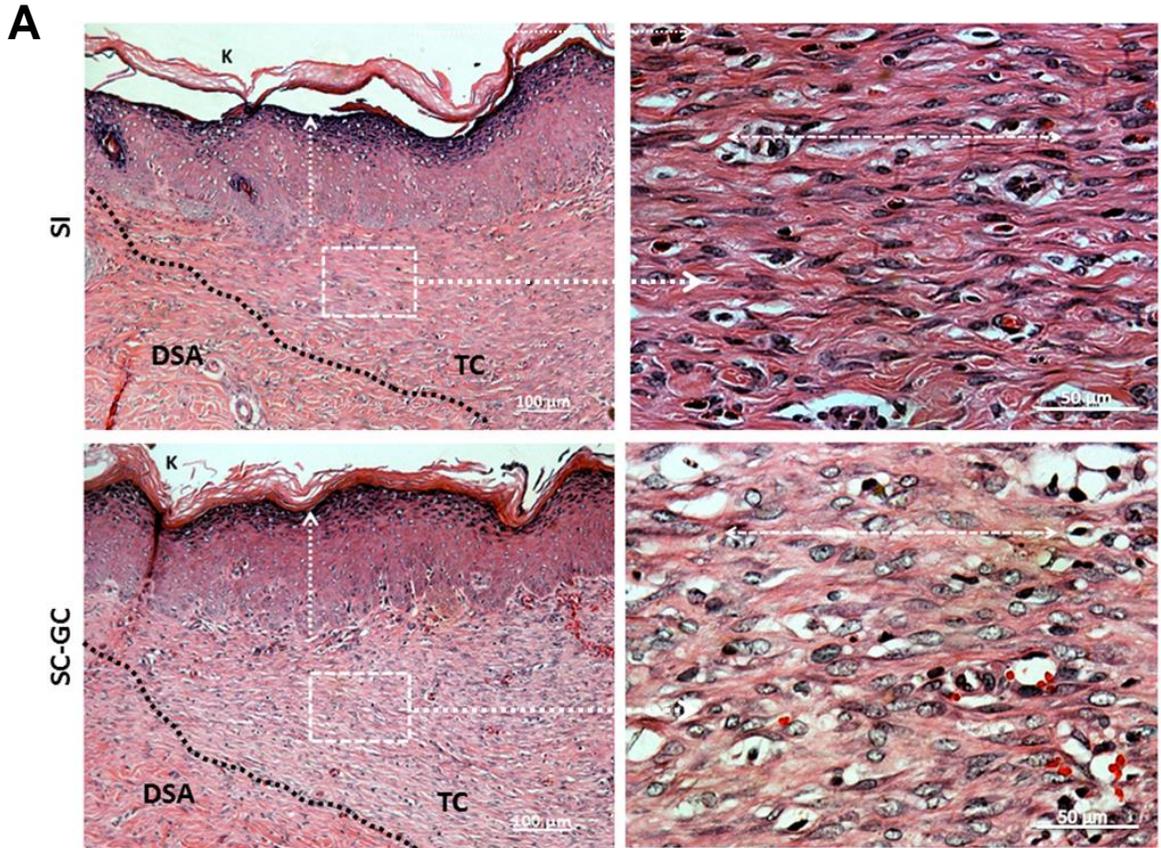
4.3.1 Análisis histológico descriptivo

En las heridas de los grupos tratados con SC-GC se encontraron las características propias de la fibroplasia del tejido cicatrizal. El nuevo epitelio mostró una estratificación adecuada, con evidente formación de queratina madura en la zona apical. La dermis superficial y la dermis profunda presentaron reacción inflamatoria nula o leve con infiltrado linfoplasmocitario; aunque hubo formación de tejido con fibras colágenas dispuestas al azar que sugieren regeneración dérmica, también se detectaron zonas de fibras colágenas laxas, unidireccionadas sugestivas de fibrosis. En las heridas control se formaron fibras densas, unidireccionadas y paralelas al nuevo epitelio (Figura 4-9, Panel A).

En las heridas de 3cm² injertadas con los soportes cargados (SC-GC-Av), la epitelialización fue incompleta y el epitelio presentó una estratificación pobre (Figura 4-9 Panel B). Tanto en la dermis superficial como en la dermis profunda fue evidente la presencia de infiltrado inflamatorio severo, rico en fagocitos mononucleares y escasos eosinófilos (Figura 4-9 Panel); en la dermis profunda, también se observó la formación de estructuras tipo granuloma de cuerpo extraño con la presencia de células gigantes, infiltrado linfocítico y fibrosis periférica. La histología de los controles en el grupo, fue similar a la de los controles de las heridas tratadas con SC-GC (Figura 4-9 Panel C).

En las heridas tratadas con la dispersión coloidal de micropartículas de gelatina-colágeno cargadas con extracto (MP-AV), el epitelio formado aparentemente fue más grueso que el epitelio del tejido sano adyacente y el epitelio formado en las heridas control. En la dermis

superficial y profunda se produjo reacción inflamatoria moderada de predominio linfoplasmocitario, formación de abundantes vasos sanguíneos y celularidad elevada. Las fibras de colágeno se organizaron paralelamente al eje del epitelio, mostrando una conformación densa fibrosa. (Figura 4-9, Panel D)



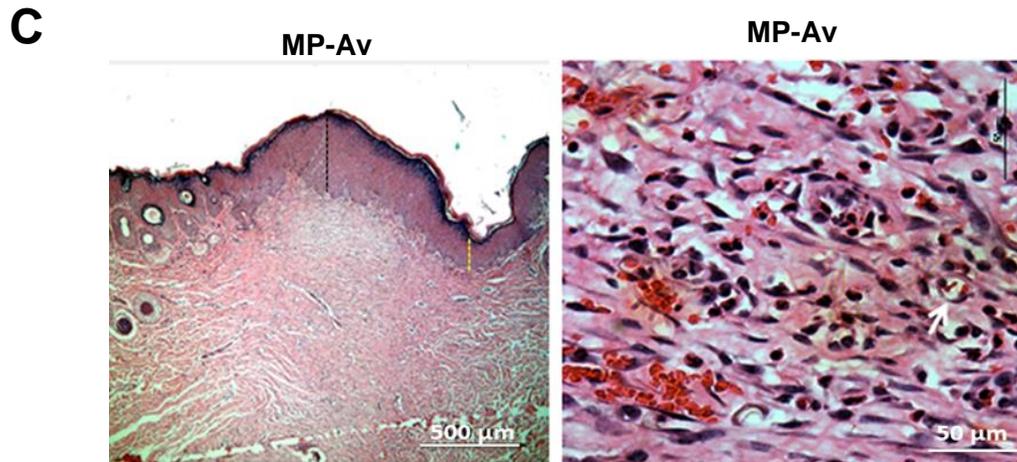


Figura 4-9 Análisis Histológico Descriptivo Panel A: (SI) Cierre por segunda intención; (SC-GC) Zona injertada con soporte de colágeno que contiene micropartículas de gelatina-colágeno. (TSA) Dermis Sana Adyacente (TC) Tejido cicatrizal Panel B: (SI) Cierre por segunda intención; (SC-GC-Av) Zona injertada con soporte de Colágeno asociado con *A. vera*. Panel C: (MP-Av) Zona tratada con la dispersión coloidal de micropartículas de gelatina-colágeno cargadas con extracto de *A. vera*.

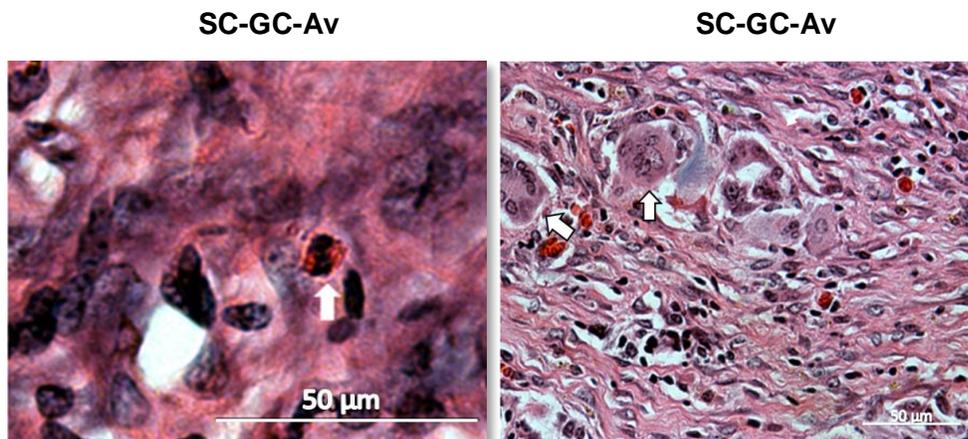


Figura 4-10 Detalle de la zona injertada con soporte de Colágeno asociado con soporte de colágeno asociado a *A. vera*. (SC-GC-Av)

4.3.2 Número de capas de epitelio

Usando el programa Image J, se hizo una evaluación cuantitativa de las capas de epitelio que se formaron en cada herida (tratadas y sus controles). La comparación del

número de capas formadas después de los tratamientos, mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo injertado con SC-GC y el grupo tratado con MP-Av; igualmente, que hay diferencias entre estos dos tratamientos con los controles y con los grupos injertados con SC-GC-Av. En estos dos últimos grupos, el número de capas de epitelio fue significativamente menor (Figura 4-11).

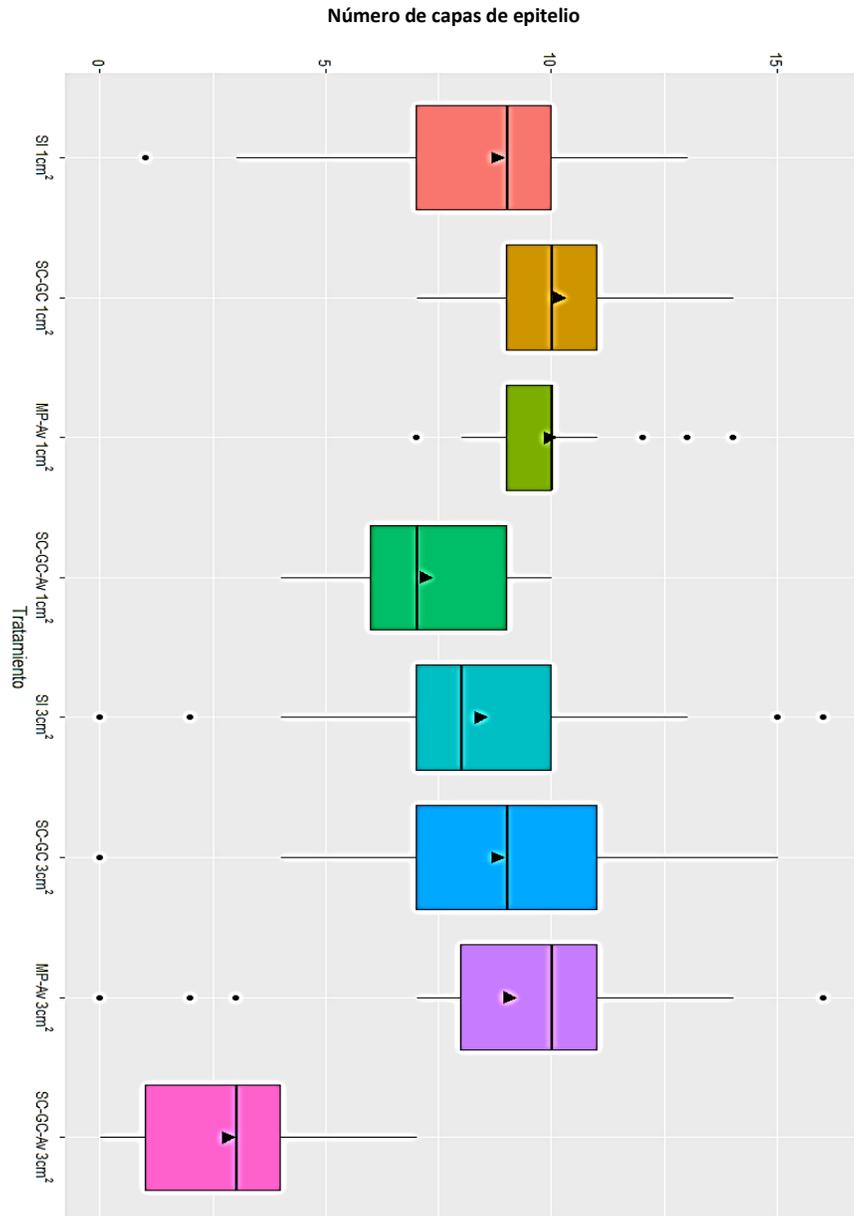


Figura 4-11 Evaluación del Número de Capas de Epitelio Formado. El número de capas de epitelio de las heridas tratadas con SC-GC fue significativamente mayor que el observado en los grupos controles ($p=0.0016$) y en los animales tratados con SG-GC-Av ($p=0.0004$). El grupo tratado con MP-Av no presentó diferencias significativas con el grupo tratado con SG-GC ($p=0.746$), pero sí mostró un número de capas de epitelio mayor que el observado en los grupos control ($p=0.0001$) y en las heridas injertadas con SC-GC-Av ($p=0.001$).

4.3.3 Grosor del tejido conectivo

La comparación del grosor del tejido conectivo neoformado, mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en las heridas de 1cm². En las heridas de mayor tamaño se observaron diferencias significativas en el grosor del conectivo, que fue significativamente mayor en las heridas tratadas con MP-Av que en las injertadas con SC-GC. Del mismo modo, los dos grupos mencionados mostraron un tejido conectivo más grueso que el de los controles y el de los animales injertados con SC-GC-Av.

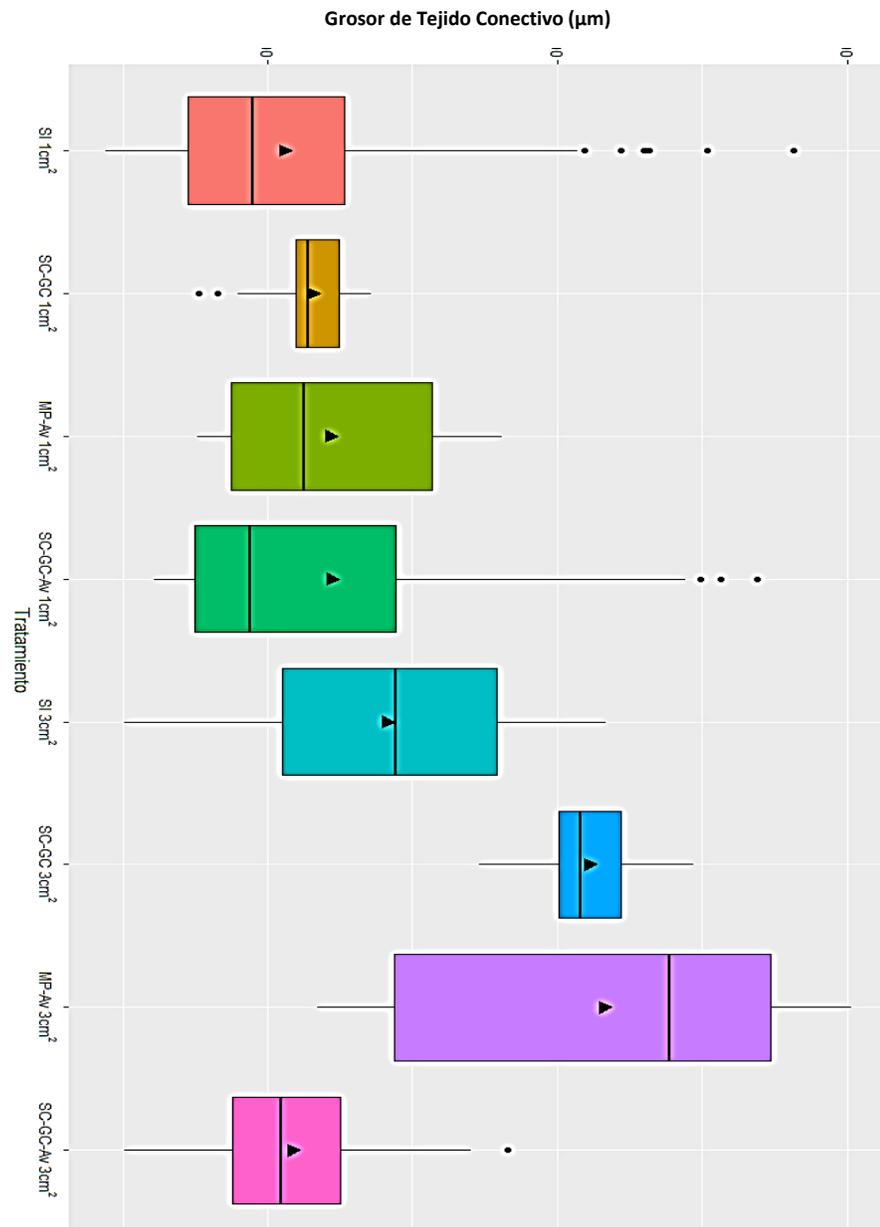


Figura 4-12 Evaluación del Grosor del Tejido Conectivo Formado. El grosor del tejido conectivo de las heridas de mayor tamaño tratadas con SC-GC fue significativamente mayor que el observado en los grupos control ($p < 0.001$) y tratadas con SG-GC-Av ($p < 0.001$), igualmente, el grupo tratado con MP-Av mostró un grosor mayor que el observado en los grupos control ($p = 0.005$) y en las heridas injertadas con SC-GC-Av ($p < 0.001$). En las heridas de 1cm², no se observaron diferencias significativas en el grosor del epitelio ($p = 0.04$).

4.3.4 Disposición de las fibras colágenas

En el tejido formado en todas las heridas se observaron 3 tipos de disposición de fibras de colágeno: fibroso y paralelo al eje del epitelio, fibroso y aleatorio, y laxo y paralelo al eje del epitelio. En ningún caso el tejido formado fue completamente conformado por fibras densas de disposición aleatoria, lo cual es característico de la piel sana.

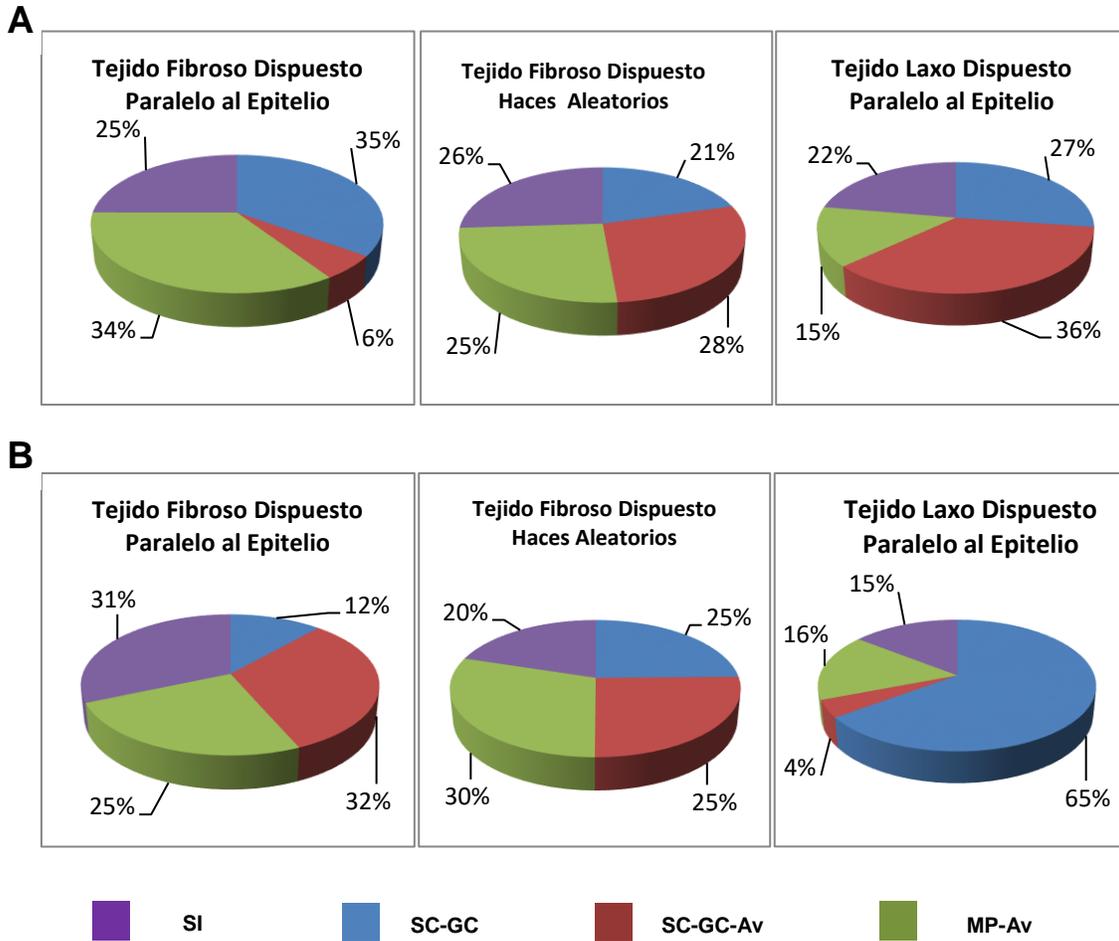


Figura 4-13 Porcentajes de la Disposición de Fibras Colágenas. A. Herida de 3cm² B. Herida de 1cm²

4.3.5 Infiltrado Inflamatorio y Vascularización

La evaluación del número de células inflamatorias para las heridas de 3cm² indica que en las heridas tratadas con SC-GC-Av hubo más infiltrado inflamatorio que en las heridas injertadas con SC-GC ($p < 0.00001$), tratadas con MP-Av ($p < 0.00001$) y control ($p = 0.00015$) (Figura 4-12). El infiltrado inflamatorio observado en los animales que se injertaron con SC-GC-Av, se mantuvo durante los 30 días de observación, lo cual, soporta la ocurrencia de reacción a cuerpo extraño evidenciada por la histología.

En este grupo las heridas injertadas con SC-GC exhibieron una menor cantidad de células inflamatorias que las heridas tratadas con MP-Av y el control ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre las heridas tratadas con MP-Av y el control ($p = 0.12$) (Figura 4-12).

En el grupo con heridas de 1cm², se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Los animales injertados con SC-GC-Av exhibieron un infiltrado inflamatorio severo comparado con las heridas injertadas con SC-GC ($p < 0.0001$) MP-Av ($p < 0.0001$) y el control ($p < 0.0001$) (Figura 4-12).

Los animales injertados con SG-GC mostraron una reacción inflamatoria leve, significativamente menor que la observada en el control ($p = 0.000012$) y en los animales tratados con MP-Av ($p < 0.0001$), por su parte, este grupo presentó un infiltrado inflamatorio de leve a moderado significativamente mayor que el exhibido por los animales control ($p < 0.0001$) (Figura 4-12).

En cuanto a la cantidad de vasos sanguíneos formados en el nuevo tejido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SC-GC, MP-Av y control ($p > 0.1$), pero si entre estos grupos y los injertados con SC-GC-Av; en los que hubo mayor cantidad de vasos sanguíneos ($p < 0.001$). El comportamiento fue similar para los dos tamaños de herida (Figura 4-13).

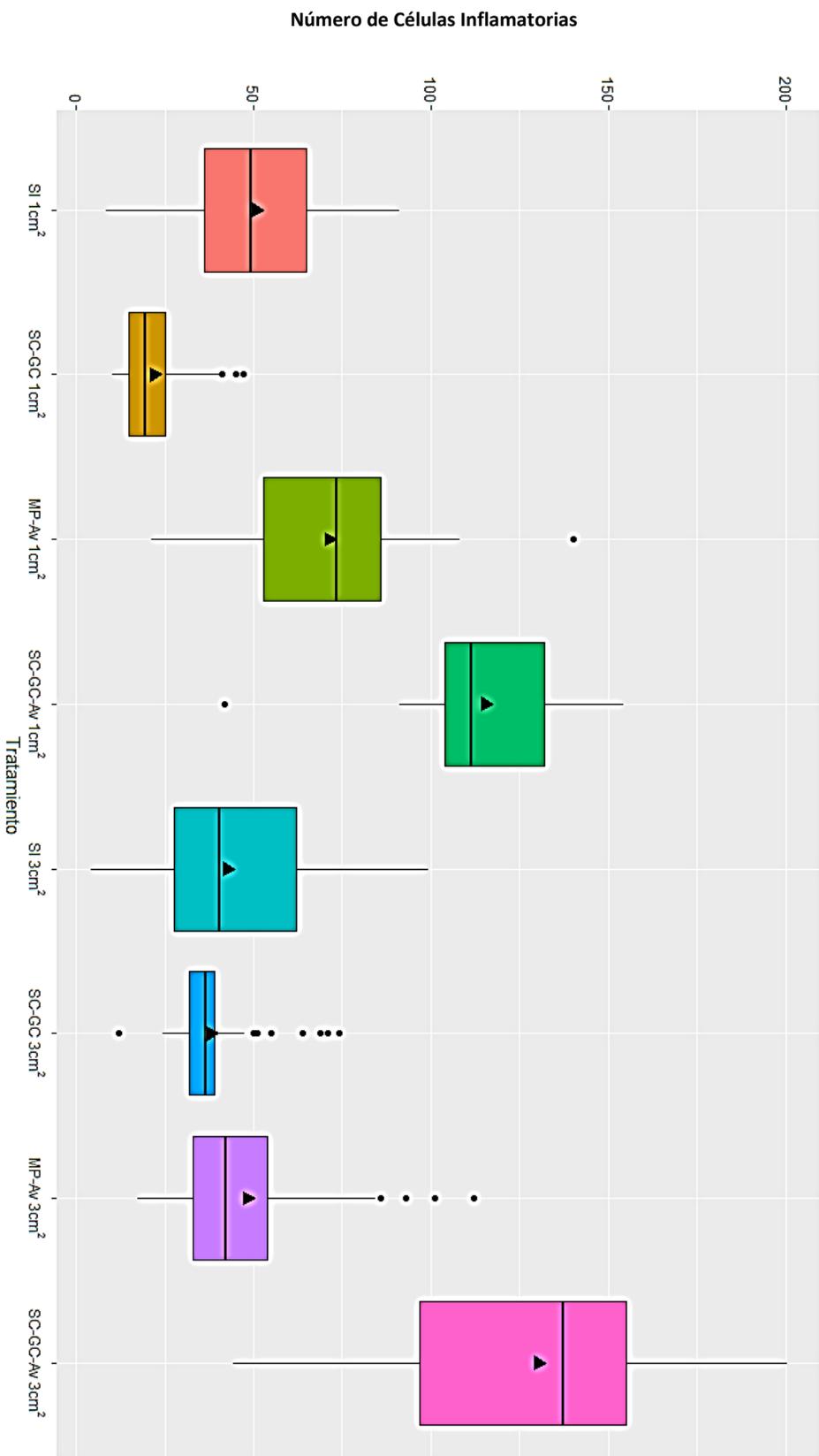


Figura 4-14 Número de células inflamatorias después del cierre de las heridas en cada grupo. En las heridas de mayor tamaño se observaron diferencias significativas entre las injertadas con SC-GC-Av, los demás tratamientos $p < 0.00001$ y el control $p = 0.00015$. En las heridas de 1cm² las diferencias fueron significativas entre todos los tratamientos, se resalta el tratamiento con SC-GC que mostró un menor infiltrado inflamatorio que los demás tratamientos ($p < 0.0001$) e incluso que el observado en la herida control ($p = 0.000012$)

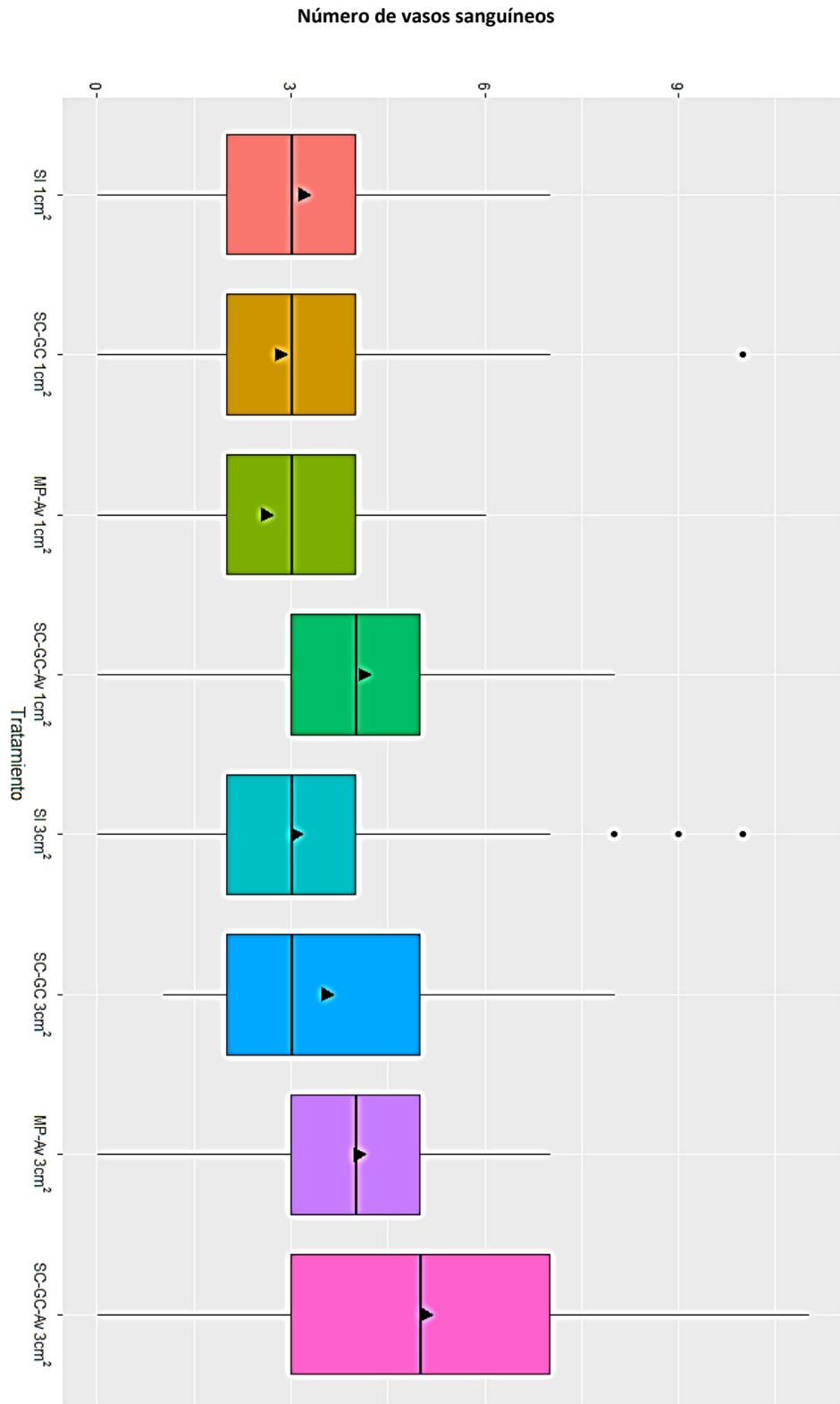


Figura 4-15 Número de Vasos Sanguíneos para cada grupo Para los dos tamaños de herida se observaron diferencias significativas entre las injertadas con SC-GC-Av y los demás grupos $p < 0.001$. No se observaron diferencias significativas entre los animales tratados con MP-Av, Injertados con SC-GC y control ($p > 0.1$)

5 Discusión

El presente trabajo propuso evaluar el desempeño pre-clínico de soportes de colágeno tipo I que contienen micropartículas de gelatina-colágeno (SC-GC), asociados a un extracto acuoso de mucílago de la hoja de *Aloe vera* en heridas cutáneas de espesor total. El conjunto de los datos indica que la inclusión del extracto acuoso de *A. vera* tiene un efecto deletéreo en el desempeño del sistema diseñado para el tratamiento de heridas agudas de espesor total. Los soportes cargados con el extracto no mejoraron la cicatrización; por el contrario, la cicatrización de las heridas en los animales sujetos a dicho tratamiento fue inferior a las heridas contralaterales que cerraron por segunda intención (control).

Acá se sugiere que los resultados del modelo animal, pueden deberse a que la presencia del extracto vegetal estabiliza a los soportes que lo contienen, probablemente aumentando su entrecruzamiento. Trabajos llevados a cabo en un modelo murino de herida por escisión de espesor total, estudiaron las características fisicoquímicas del colágeno I sintetizado después de tratar las heridas con un extracto de *Aloe vera*. Los autores encontraron que colágeno formado cuando se aplicó el extracto era menos susceptible a la degradación enzimática que el colágeno formado en las heridas control. Igualmente, que el contenido de grupos aldehídos del colágeno sintetizado en los tratamientos era mayor que el de la proteína sintetizada en las heridas control. Debido a que los aldehídos a través de la formación de iminas entrecruzan las moléculas de colágeno que integran las fibras colágenas del tejido cutáneo, se sugirió que lo encontrado podía explicarse por el aumento en el entrecruzamiento del colágeno (Pandarinathan Chithra, Sajithlal, & Chandrakasan, 1998; P Chithra, Sajithlal, & Chandrakasan, 1998; DeVore, 1977).

El entrecruzamiento de las fibras de colágeno está inversamente relacionado con su tasa de degradación, es decir, a mayor grado de entrecruzamiento menor degradación (Nowotny & Grune, 2014; Suesca, 2013; van der Slot-Verhoeven *et al.*, 2005) y la degradación se relaciona con la integración del soporte en el lecho de la herida. El proceso

ideal de degradación debe estar coordinado con la aparición de tejido neoformado (Grover, Cameron, & Best, 2012). En éste estudio, el SC-GC-Av no se integró de manera adecuada, debido a que no fue biodegradado. Lo anterior, explica los hallazgos de la histología descriptiva, donde se observa una reacción por cuerpo extraño exacerbada.

La biodegradación de la matriz provisional de fibrina o de sustitutos artificiales y la formación de nuevo tejido debe ocurrir simultáneamente, para que pueda llevarse a cabo un cierre regenerativo. La degradación del colágeno presente en un injerto cutáneo, involucra una reacción inflamatoria que en la mayoría de los casos está limitada a las dos semanas posteriores al injerto (Sabol *et al.*, 2012). Durante éste tiempo migran células inflamatorias del lecho de la herida al interior del dispositivo, las cuales, se activan y promueven la fagocitosis y la lisis de proteínas que conducen a la degradación del injerto (Ye, 2013). Cuando la degradación del injerto no sucede de manera coordinada con la formación de tejido nuevo, se desencadena una reacción inflamatoria crónica que impide la reparación y la regeneración del tejido dañado o perdido (Anderson, Rodriguez, & Chang, 2008; Jumaat *et al.*, 2011; Ruszczak, 2003; Stern, R., McPherson, M., & Longaker, 1990; Truong, Kowal-Vern, Latenser, Wiley, & Walter, 2005; Wosgrau *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las aloínas que hacen parte del mucílago del *Aloe vera* reducen la actividad de metaloproteinasas de matriz extracelular, principalmente MMP-2 y MMP9, que catalizan la degradación del colágeno; así como, aumentan la sobreexpresión de los inhibidores de metaloproteinasas TIMP1 y TIMP2 (Barrantes & Guinea, 2003; Curto, Labelle, & Chandler, 2014; Tabandeh *et al.*, 2014). Por otro lado, un estudio en ratones C57BL/6 mostró que discos de colágeno I implantados subcutáneamente se degradan más lentamente que aquellos implantados en el pericardio. Al realizar el perfil de citoquinas de ambas zonas, se encontró que TIMP-1 e interleuquina 10 (IL-10), un potente inductor de TIMP-1, eran expresados únicamente en el tejido subcutáneo (Q. Ye, van Amerongen, Sandham, Bank, & van Luyn, 2011). Es posible que la poca degradación de los soportes cargados con el extracto de *A. vera* cuando se injertan obedezca a un aumento en su grado de entrecruzamiento y/o a la disminución de la actividad enzimática de las metaloproteasas debido a la presencia del extracto. En este momento se están llevando a cabo experimentos tendientes a determinar el grado de entrecruzamiento y la tasa de degradación enzimática de soportes con micropartículas cargados o no con el extracto.

Trabajos previos del grupo han mostrado que soportes acelulares de colágeno I injertados en heridas de espesor parcial en la mucosa oral de conejos, son degradados en dos semanas (Espinosa *et al.*, 2010). A pesar de que los soportes empleados en el trabajo mencionado no contenían micropartículas de gelatina-colágeno, los hallazgos de ésta tesis sugieren que las características morfológicas y fisiológicas del sitio anatómico también influyen en la degradación y recambio de los sustitutos tisulares. De hecho, trabajos publicados han demostrado que soportes de colágeno I entrecruzados y no entrecruzados injertados en la gingiva se degradan más rápidamente que cuando se implantan en bolsillos dentro del tejido blando del paladar (Tal, Kozlovsky, Artzi, Nemcovsky, & Moses, 2008).

En la literatura revisada no se encontraron reportes de soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno cargados con *A. vera*; sin embargo, se ha reportado la elaboración y caracterización fisicoquímica, mecánica e *in vitro* de soportes de colágeno I, quitosano y *A. vera*, soportes de quitosano y *A. vera* y soportes de policaprolactona y *A. vera* (Jithendra *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Suganya *et al.*, 2014). A pesar de que estos investigadores concluyen que estos soportes pueden tener aplicación en ingeniería de tejidos, ninguno de los trabajos citados llevó a cabo pruebas *in vivo* que representan un desafío completamente diferente para cualquier desarrollo, debido a la complejidad propia del modelo.

In vivo en un modelo murino de quemadura de segundo grado se estudió el desempeño de micropartículas de quitosano, *A. vera* y vitamina E vehiculizadas en un gel de ácido hialurónico con buenos resultados (Pereira *et al.*, 2014), sin embargo, nuestro trabajo difiere en cuanto al tipo de herida y características esenciales como la presencia o no del soporte y el biomaterial empleado, por esta razón no es posible comparar los resultados. La importancia de los datos obtenidos en ésta tesis, radica en que provienen de la evaluación clínica de los injertos SC-GC-Av y ayudan al direccionamiento de nuevas investigaciones del grupo de investigación.

Éste trabajo mostró que el soporte de colágeno con micropartículas solo tuvo un mejor desempeño promoviendo el cierre de herida, esto refuerza la hipótesis de que la biocompatibilidad del soporte fue afectada por la inclusión del extracto. Como se observó mediante la herramienta de seguimiento clínico BWAT y en los resultados del análisis histomorfométrico, al parecer el soporte de colágeno modula la respuesta inflamatoria.

Trabajos de otros investigadores señalan que mediante la modulación del proceso inflamatorio es posible conseguir un balance positivo hacia la regeneración (Eming, Krieg, & Davidson, 2007; Janis & Harrison, 2014; Philip & Slauson, 2002; Velnar *et al.*, 2009). Lo anteriormente mencionado, permite sugerir que el soporte solo es una alternativa a considerar en el tratamiento de heridas de agudas de piel de espesor total.

6 Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Se estableció un modelo animal novedoso útil para la evaluación de soportes de colágeno producto de la ingeniería de tejidos.
- Los soportes de colágeno I y micropartículas de gelatina-colágeno cargados con *Aloe vera* no son bioactivos, retardan el cierre de herida en comparación con los mismos soportes sin extracto y modifican las características finales de la cicatriz a nivel clínico e histológico.

6.2 Recomendaciones

- Evaluar y comparar el grado de entrecruzamiento de soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno, cargados o no con el extracto de *A. vera*.
- Evaluar y comparar la tasa de degradación enzimática de soportes de colágeno I con micropartículas de gelatina-colágeno, cargados o no con el extracto de *A. vera*.
- Determinar cuáles son las interacciones químicas y físicas entre el extracto y el soporte, y establecer como estas interacciones modifican la estructura del soporte.

Bibliografía

- Anaya, D., & Quintero, G. (1998). Epidemiología de las heridas de tratamiento hospitalario en Colombia. *Revista Colombiana de Cirugía*, 13(3), 181–184.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, 20(2), 86–100. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
- Ansell, D. M., Holden, K. a., & Hardman, M. J. (2012). Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Experimental Dermatology*, 21(8), 581–585. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01540.x>
- Auger, F. a, Berthod, F., Moulin, V., Pouliot, R., & Germain, L. (2004). Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39(Pt 3), 263–275. <http://doi.org/10.1042/BA20030229>
- Badylak, S. F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28, 3587–3593. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.043>
- Barrantes, E., & Guinea, M. (2003). Inhibition of Collagenase and Metalloproteinases by Aloins and Aloe gel. *Life Sciences*, 72(7), 843–850. [http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02308-1](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02308-1)
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and Cytokines in Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585–601. <http://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
- Bos, J. D. (2005). *Skin immune system (SIS): Cutaneous immunology and clinical immunodermatology*. Boca Raton: CRC Press.
- Botero, L., & Gómez, R. M. (2013). Uso de Animales de Laboratorio en Colombia: Reflexiones Sobre Aspectos Normativos y Éticos. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 60(3), 213–219.
- Brookes, J. P., & Kumar, A. (2005). Appendage Regeneration in Adult Vertebrates and Implications for Regenerative Medicine. *Science*, 310(5756), 1919–1923. <http://doi.org/10.1126/science.1115200>
- Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7 Suppl), 12S–34S. <http://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
- Canonico, S., & Campitiello, F. (2013). Treatment of Leg Chronic Wounds with Dermal Substitutes and Thin Skin Grafts. *InTech, Doi*. <http://doi.org/10.5772/51852>
- Carsin, H., Ainaud, P., Le Bever, H., Rives, J. M., Lakhel, A., Stephanazzi, J., ... Perrot, J. (2000). Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: A five year single-center experience with 30 patients. *Burns*, 26(4), 379–387. [http://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00143-6](http://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00143-6)
- Celleno, L., & Tamburi, F. (2009). Chapter 1 - Structure and Function of the Skin. In A. T. M. Blair (Ed.), *Nutritional Cosmetics* (pp. 3–45). Boston: William Andrew Publishing. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-8155-2029-0.50008-9>
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the*

- Cervical Spine Research Society*, 17 Suppl 4, 467–79. <http://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>
- Chanjuan, D., & Yonggang, L. (2016). Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering : Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*, 8(42), 1–20. <http://doi.org/10.3390/polym8020042>
- Chattopadhyay, S., & Raine, R. T. (2014). Collagen Based Biomaterials for wound Healing. *Biopolymers*, 101(8), 821–833. <http://doi.org/10.1002/bip.22486>.Collagen-Based
- Chaudhari, M., & Mengi, S. (2006). Evaluation of phytoconstituents of Terminalia arjuna for wound healing activity in rats. *Phytotherapy Research*, 20(9), 799–805. <http://doi.org/10.1002/ptr.1857>
- Chen, W., Van Wyk, B.-E., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Cape aloes—A review of the phytochemistry, pharmacology and commercialisation of Aloe ferox. *Phytochemistry Letters*, 5(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.09.001>
- Chithra, P., Sajithlal, G. B., & Chandrakasan, G. (1998). Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 181, 71–76.
- Chithra, P., Sajithlal, G. B., & Chandrakasan, G. (1998). Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59, 195–201.
- Choi, S.-W., Son, B.-W., Son, Y.-S., Park, Y.-I., Lee, S.-K., & Chung, M.-H. (2001). The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. *British Journal of Dermatology*, 145(4), 535–545. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04410.x>
- Cormane, J., & Rodelo, A. (2014). Epidemiología del cáncer no melanoma en Colombia Resumen. *Revista de La Asociacion Colombiana de Dermatología*, 1, 20–26.
- Cross, S. E., Naylor, L., Coleman, R. A., & Teo, T. C. (1995). An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *British Journal of Plastic Surgery*, 48(4), 189–197. [http://doi.org/10.1016/0007-1226\(95\)90001-2](http://doi.org/10.1016/0007-1226(95)90001-2)
- Curto, E. M., Labelle, A., & Chandler, H. L. (2014). Aloe vera: An in vitro study of effects on corneal wound closure and collagenase activity. *Veterinary Ophthalmology*, 17(6), 403–410. <http://doi.org/10.1111/vop.12163>
- Dagne, E., Bisrat, D., Viljoen, A., & Wyk, B. Van. (2000). Chemistry of Aloe Species. *Current Organic Chemistry*, 4(September 2000), 1055–1078. <http://doi.org/10.2174/1385272003375932>
- Dat, A. D., Poon, F., Pham, K. B. T., & Doust, J. (2012). Aloe vera for treating acute and chronic wounds. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2(2), CD008762. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD008762.pub2>
- Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R., & Herman, I. M. (2013). Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Advanced Skin Wound Care*, 25(7), 304–314. <http://doi.org/10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0>.Acute
- DeVore, D. T. (1977). Collagen xenografts for bone replacement: The effects of aldehyde-induced cross-linking on degradation rate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 43(5), 677–686. [http://doi.org/10.1016/0030-4220\(77\)90050-0](http://doi.org/10.1016/0030-4220(77)90050-0)
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9(4), 283–289. <http://doi.org/10.2741/1184>
- Dorsett-Martin, W. A. (2004). Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration*, 12(6), 591–9. <http://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x>
- Dorsett-Martin, W. A., & Wysocki, A. B. (2008). Rat Models of Skin Wound Healing. In P. M. Conn

- (Ed.), *Sourcebook of Models for Biomedical Research* (pp. 631–638). Humana Press.
- Dunn, M., & Ghodbane, S. (2016). Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(11), 2685–2692.
- Eming, S. a, Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514–525. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>
- Enoch, S., & Leaper, D. J. (2005). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 23(2), 37–42. <http://doi.org/10.1383/surg.23.2.37.60352>
- Espinosa, Lady, Sosnik, A., & Fontanilla, M. R. (2010). Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. *Tissue Engineering Part A*, 16, 1667–79.
- Ferraro, G. (2009). Revisión del Aloe vera (Barbadosensis Miller) en la Dermatología Actual. *Revista Argentina de Dermatología*, 218–223.
- Fitzpatrick, T. B., & Frydman, J. (2001). *Dermatología en Medicina General* (Vol. 2). Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Fontanilla, M. R., Suesca Quintero, E., & Casadiegos Rincon, S. (2015). Ingeniería de tejidos: Sustitutos artificiales para uso en piel y mucosa oral. In *Biomateriales Aplicados al Diseño de Sistemas Terapéuticos Avanzados*. Coimbra, Portugal: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Galiano, R. D., Michaels, J., Dobryansky, M., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12(4), 485–492. <http://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>
- Gantwerker, E. A., & Hom, D. B. (2012). Skin: Histology and physiology of wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*, 39(1), 85–97. <http://doi.org/10.1016/j.cps.2011.09.005>
- Gawronska-kozak, B. (2012). Scarless Skin Wound Healing in Foxn1Deficient (Nude) Mice Is Associated With Distinctive Matrix. *Matrix Biolog*, 30(4), 290–300. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.04.004>. SCARLESS
- Gawronska-Kozak, B., Grabowska, A., Kopcewicz, M., & Kur, A. (2014). Animal models of skin regeneration. *Reproductive Biology*, 14(1), 61–67. <http://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.01.004>
- German, D., Falke, F., & Atala, A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 98(2), 103–115.
- Gibson Corley, K. ., Olivier, A. ., & Meyerholz, D. . (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology*, (April). <http://doi.org/10.1177/0300985813485099>
- Gilbert, S. . (2000). Regeneration.
- Gómez, C. M., Soto Merizalde, G. J., & Múnera Restrepo, L. M. (2012). Sustitutos Cutáneos Desarrollados Por Ingeniería De Tejidos. *Iatreia*, 25(1), 42–53.
- Gonzales, M., Weksler, B., Tsuruta, D., Goldman, R. D., Yoon, K. J., Hopkinson, S. B., ... Jones, J. C. (2001). Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(January), 85–100.
- Gorgieva, S., & Kokol, V. (2008). Biomaterials and Their Biocompatibility : Review and Perspectives. *INTECH Open Access Publisher*.
- Gouma, E., Simos, Y., Verginadis, I., Lykoudis, E., Evangelou, a., & Karkabounas, S. (2012). A simple procedure for estimation of total body surface area and determination of a new value of Meeh's constant in rats. *Laboratory Animals*, 46(1), 40–45. <http://doi.org/10.1258/la.2011.011021>

- Greenwood, H., & Thorsteinsdóttir, H. (2006). Regenerative medicine: new opportunities for developing countries. *International Journal of ...*, 8, 60–77. <http://doi.org/10.1504/IJBT.2006.008964>
- Grover, C. N., Cameron, R. E., & Best, S. M. (2012). Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10, 62–74. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.02.028>
- Guo, S., & Dipietro, L. a. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–29. <http://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Gupta, V. K., & Malhotra, S. (2012). Pharmacological attribute of Aloe vera: Revalidation through experimental and clinical studies. *Ayu*, 33(2), 193–6. <http://doi.org/10.4103/0974-8520.105237>
- Gutierrez Bolivar, N. (2014). Lesiones por pólvora hasta el periodo epidemiológico III, Colombia, 2014-137. *Informe Quincenal Epidemiológico. Instituto Nacional de Salud*.
- Hahm, G., Glaser, J. J., & Elster, E. a. (2011). Biomarkers to predict wound healing: the future of complex war wound management. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 127 Suppl, 21S–26S. <http://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181f8e291>
- Hamman, J. H. (2008). Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules*, 13(8), 1599–1616. <http://doi.org/10.3390/molecules13081599>
- Hart, J. (2002). Inflammation : Its Role in the Healing of Acute Wounds. *Journal of Wound Care*, 11(6), 205–209.
- Heitland, A., Piatkowski, A., Noah, E. M., & Pallua, N. (2004). Update on the use of collagen/glycosaminoglycate skin substitute - Six years of experiences with artificial skin in 15 German burn centers. *Burns*, 30(5), 471–475. <http://doi.org/10.1016/j.burns.2004.01.010>
- Huang, S., & Fu, X. (2011). Tissue-engineered skin : bottleneck or breakthrough. *International Journal Burns and Trauma*, 1(1), 1–10.
- Janis, J. E., & Harrison, B. (2014). Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(2), 199e–207e. <http://doi.org/10.1097/01.prs.0000437224.02985.f9>
- Jimenez, R. (2013). Tesis de Maestría. *Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (Calendula officinalis)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Jimenez, R. A., Millan, D., Suesca, E., Sosnik, A., & Fontanilla, M. R. (2015). Controlled release of an extract of Calendula officinalis flowers from a system based on the incorporation of gelatin-collagen microparticles into collagen I scaffolds: design and in vitro performance. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 209–218. <http://doi.org/10.1007/s13346-015-0217-3>
- Jithendra, P., Merlin Rajam, Abraham Kalaivani, T., Baran Mandal, A., & Chellan, R. (2013). Preparation and Characterization of Aloe Vera Blended Collagen-Chitosan Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(15), 7291–7298.
- Jumaat, S., Yussof, M., Halim, A. S., Zaharil, A., Saad, M., & Jaafar, H. (2011). Evaluation of the Biocompatibility of a Bilayer Chitosan Skin Regenerating Template , Human Skin Allograft , and Integra Implants in Rats. *ISRN Materials Science*, 2011. <http://doi.org/10.5402/2011/857483>
- Kamolz, L.-P., & Lumenta, D. B. (2013). *Dermal Replacements in General, Burn, and Plastic Surgery: Tissue Engineering in Clinical Practice*. Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-7091-1586-2>
- Koivisto, L., Heino, J., Häkkinen, L., & Larjava, H. (2014). Integrins in Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 3(12), 762–783. <http://doi.org/10.1089/wound.2013.0436>

- Lachapelle, M. Y., & Drouin, G. (2011). Inactivation dates of the human and guinea pig vitamin C genes. *Genetica*, 139(2), 199–207. <http://doi.org/10.1007/s10709-010-9537-x>
- Langer, R., & Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260, 920–6.
- Lazic, T., & Falanga, V. (2011). Bioengineered skin constructs and their use in wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 127 Suppl, 75S–90S. <http://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182009d9f>
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., ... Yanong, R. (2013). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals : 2013 Edition*.
- Leibovich, S. J., & Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American Journal of Pathology*, 78(1), 71–100. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1915032&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lesser, T., Aboseif, S., & Abbas, M. a. (2008). Combined endorectal advancement flap with Alloderm?? graft repair of radiation and cryoablation-induced rectourethral fistula. *American Surgeon*, 74(4), 341–345.
- Levenson, S. M., Geever, E. F., Crowley, L. V., Oates, J. F., Berard, C. W., & Rosen, H. (1965). Healing of Rat Skin Wounds. *Annals of Surgery*, 161(2), 293–308.
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25, 9–18. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>
- Li, J., Zhang, Y. ., & Kirsner, R. . (2003). Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech*, 60, 107–114.
- Li, J., Zhou, L., Tran, H. T., Chen, Y., Nguyen, N. E., Karasek, M. a, & Marinkovich, M. P. (2006). Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126, 432–440. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700089>
- Longaker, M. T., Whitby, D. J., Adzick, N. S., Crombleholme, T. M., Langer, J. C., Duncan, B. W., ... Harrison, M. R. (1990). Studies in fetal wound healing VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. *Journal of Pediatric Surgery*, 25(1), 63–69. [http://doi.org/10.1016/S0022-3468\(05\)80165-4](http://doi.org/10.1016/S0022-3468(05)80165-4)
- Lorenti, A. (2012). Wound Healing : From Epidermis Culture to Tissue Engineering. *CellBio*, 2012(December), 17–29. <http://doi.org/10.4236/cellbio.2012.12003>
- McNees, P. (2006). Skin and wound assessment and care in oncology. *Seminars in Oncology Nursing*, 22(3), 130–43. <http://doi.org/10.1016/j.soncn.2006.04.003>
- Middelkoop, E., Van Den Bogaerdt, a. J., Lamme, E. N., Hoekstra, M. J., Brandsma, K., & Ulrich, M. M. W. (2004). Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials*, 25(9), 1559–1567. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00502-7](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00502-7)
- Millan Cortes, D. M. (2014). Tesis de Maestría. *Evaluacion de la biocompatibilidad y eficiencia como sustituto artificial de soportes de colágeno tipo I asociados con extractos de caléndula (Calendula officinalis) en heridas cutáneas en un modelo animal lagomorfo*. Universidad Nacional de Colombia.
- Moustafa, M., Bullock, A. J., Creagh, F. M., Heller, S., Jeffcoate, W., Game, F., ... MacNeil, S. (2007). Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers. *Regenerative Medicine*, 2(6), 887–902. <http://doi.org/10.2217/17460751.2.6.887>
- Namazi, M. R., Fallahzadeh, M. K., & Schwartz, R. A. (2011). Strategies for prevention of scars:

- What can we learn from fetal skin? *International Journal of Dermatology*, 50(1), 85–93. <http://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04678.x>
- Nowotny, K., & Grune, T. (2014). Degradation of oxidized and glycoxidized collagen: role of collagen cross-linking. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 542, 56–64. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.007>
- Omar, A. ., Mavor, A. I. D., Jones, A. M., & Homer-Vanniasinkam, S. (2004). Treatment of venous leg ulcers with Dermagraft. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 27(6), 666–672. <http://doi.org/10.1016/j.ejvs.2004.03.001>
- Oryan, A., Mohammadipour, A., Moshiri, A., & Tabandeh, M. R. (2014). Topical Application of Aloe vera Accelerated Wound Healing, Modeling, and Remodeling: An Experimental Study With Significant Clinical Value. *Annals of Plastic Surgery*, 0(0), 1–10. <http://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000239>
- Padilla-Carlin, D. J., McMurray, D. N., & Hickey, A. J. (2008). The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comparative Medicine*, 58(4), 324–340.
- Parenteau-bareil, R., Gauvin, R., Cliche, S., Gariépy, C., Germain, L., & Berthod, F. (2011). Acta Biomaterialia Comparative study of bovine , porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. *Acta Biomaterialia*, 7(10), 3757–3765. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.020>
- Park, J. E., & Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American Journal of Surgery*, 187(5 SUPPL. 1), 2–7. [http://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00296-4](http://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00296-4)
- Peng, Y. Y., Howell, L., Stoichevska, V., Werkmeister, J. A., Dumsday, G. J., & Ramshaw, J. A. M. (2012). Towards scalable production of a collagen-like protein from *Streptococcus pyogenes* for biomedical applications. *Microbial Cell Factories*, 11(146), 1–8.
- Pereira, G. G., Santos-Oliveira, R., Albernaz, M. S., Canema, D., Weismüller, G., Barros, E. B., ... Guterres, S. S. (2014). Microparticles of Aloe vera/Vitamin E/Chitosan: Microscopic, a Nuclear Imaging and an In Vivo Test Analysis for Burn Treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 292–300. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.10.011>
- Philip, B., & Slauson, D. (2002). Inflammation and Repair of Tissue. In *Mechanisms of Disease* (Third, pp. 140–246).
- Robson, M. C. (1997). Wound Infection. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 637–650. [http://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70572-7](http://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70572-7)
- Robson, M. C., Steed, D. L., & Franz, M. G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38(2), 72–140. <http://doi.org/10.1067/msg.2001.111167>
- Ruszczak, Z. (2003). Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1595–1611. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.003>
- Sabol, F., Dancakova, L., Gal, P., Vasilenko, T., Novotny, M., Smetana, K., & Lenhardt, L. (2012). Immunohistological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. *Veterinarni Medicina*, 57(2), 77–82.
- Sasireka, K., & Sivakumar, V. (2013). *Tissue Engineering in Periodontal. Principles of Tissue Engineering* (Second Edi, Vol. 3). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-436630-5.50072-6>
- Seifert, A. W., Kiama, S. G., Seifert, M. G., Goheen, J. R., Palmer, T. M., & Maden, M. (2012). Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*, 489(7417), 561–5. <http://doi.org/10.1038/nature11499>

- Shevchenko, R. V., James, S. L., & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7(43), 229–258. <http://doi.org/10.1098/rsif.2009.0403>
- Shilo, S., Roth, S., Amzel, T., Harel-adar, T., & Tamir, E. (2013). Cutaneous Wound Healing After Treatment with Recombinant Plant-derived Human Flowable Collagen. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 19, 1519–1526. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0345>
- Shrimanker, M., Patel, N., Modi, H., & Dave, R. (2013). A Review : Screening Models for Wound Healing Activity in Animals. *Am J Pharm Tech Res*, 3(May).
- Silva, S. S., Popa, E. G., Gomes, M. E., Cerqueira, M., Marques, A. P., Caridade, S. G., ... Reis, R. L. (2013). An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6790–6797. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.027>
- Sindrilaru, A., & Scharffetter-Kochanek, K. (2013). Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 2(7), 357–368. <http://doi.org/10.1089/wound.2012.0407>
- Sinno, H., & Prakash, S. (2013). Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic Surgery International*, 2013, 146764. <http://doi.org/10.1155/2013/146764>
- Steinbrook, R. (2006). Searching for the right search—reaching the medical literature. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 4–7.
- Stern, R., McPherson, M., & Longaker, M. T. (. (1990). Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *Journal of Burn Care & Research*, 11(1), 7–13.
- Suesca, E. (2013). Tesis Doctoral. *Optimización de la Obtención de Soportes de Colágeno y Estudio del Efecto de su Microestructura en el Desarrollo de Mucosa Oral Artificial*. Universidad Nacional de Colombia.
- Suganya, S., Venugopal, J., Agnes Mary, S., Ramakrishna, S., Lakshmi, B. S., & Giri Dev, V. R. (2014). Aloe vera incorporated biomimetic nanofibrous scaffold: A regenerative approach for skin tissue engineering. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, 23(3), 237–248. <http://doi.org/10.1007/s13726-013-0219-2>
- Sullivan, T. P., Eaglstein, W. H., Davis, S. C., & Mertz, P. (2001). The Pig as a Model for Human Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*, 9, 66–76. <http://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2001.00066.x>
- Summerfield, A., Meurens, F., & Ricklin, M. E. (2014). The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*, 66(1), 14–21. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.10.023>
- Supp, D. M., & Boyce, S. T. (2005). Engineered skin substitutes: Practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, 23(4), 403–412. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.023>
- Swift, M. E., Burns, A. L., Gray, K. L., & DiPietro, L. a. (2001). Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 117, 1027–1035. <http://doi.org/10.1046/j.0022-202X.2001.01539.x>
- Tabandeh, M. R., Oryan, A., & Mohammadalipour, A. (2014). Polysaccharides of Aloe vera induce MMP-3 and TIMP-2 gene expression during the skin wound repair of rat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 424–430. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.055>
- Tal, H., Kozlovsky, A., Artzi, Z., Nemcovsky, C. E., & Moses, O. (2008). Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: a histological study in the cat. *Clinical Oral Implants Research*, 19(8), 760–766. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01546.x>

- Tausche, A. K., Skaria, M., Böhlen, L., Liebold, K., Hafner, J., Friedlein, H., ... Hunziker, T. (2003). An autologous epidermal equivalent tissue-engineered from follicular outer root sheath keratinocytes is as effective as split-thickness skin autograft in recalcitrant vascular leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 11(4), 248–252. <http://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2003.11403.x>
- Tellechea, A., Leal, E., Veves, A., & Carvalho, E. (2010). Inflammatory and Angiogenic Abnormalities in Diabetic Wound Healing: Role of Neuropeptides and Therapeutic Perspectives~!2009-09-05~!2009-09-20~!2010-03-04~! *The Open Circulation & Vascular Journal*, 3, 43–55. <http://doi.org/10.2174/1877382601003020043>
- Truong, A.-T. N., Kowal-Vern, A., Latenser, B. A., Wiley, D. E., & Walter, R. J. (2005). Comparison of dermal substitutes in wound healing utilizing a nude mouse model. *Journal of Burns and Wounds*, 4, e4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1501115&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tziotzios, C., Profyris, C., & Sterling, J. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 13–24. <http://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.08.035>
- van der Slot-Verhoeven, A. J., van Dura, E. A., Attema, J., Blauw, B., DeGroot, J., Huizinga, T. W. J., ... Bank, R. A. (2005). The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740(1), 60–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.02.007>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–42. <http://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Vermeulen, H., Ubbink, D. T., Goossens, A., De Vos, R., & Legemate, D. A. (2005). Systematic review of dressings and topical agents for surgical wounds healing by secondary intention. *British Journal of Surgery*, 92(6), 665–672.
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827–839. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- Wang, J. F., Olson, M. E., Reno, C. R., Wright, J. B., & Hart, D. A. (2001). The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. *Comparative Medicine*, 51(4), 341–348.
- Williamson, D., & Harding, K. (2004). Wound healing. *Medicine*, 32, 4–7. <http://doi.org/10.1383/medc.32.12.4.55399>
- Wong, D. J., & Chang, H. Y. (2009). Skin tissue engineering. *StemBook*, 1–9. <http://doi.org/10.3824/stembook.1.44.1>
- Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T., & Gurtner, G. C. (2011). Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–8. <http://doi.org/10.1155/2011/969618>
- Wosgrau, A. C., Da Silva, J., Leonardi, D. F., Pereima, M. J., Di Giunta, G., & Trentin, A. (2015). Comparative experimental study of wound healing in mice: Pelnac versus integra. *PLoS ONE*, 10(3), 4–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0120322>
- Xu, Y., Wu, J., Chen, Y., Liu, J., Li, N., & Yang, F. (2010). The Use of Zein and Shuanghuangbu for Periodontal Tissue Engineering. *International Journal of Oral Science*, 2(3), 142–148. <http://doi.org/10.4248/IJOS10056>

- Yamaguchi, Y., & Yoshikawa, K. (2001). Cutaneous wound healing: an update. *The Journal of Dermatology*, 28(10), 521–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732719>
- Yannas, I. V. (2013). Emerging rules for inducing organ regeneration. *Biomaterials*, 34(2), 321–30. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.006>
- Ye, Q. M. and cellular mechanisms of collagen degradation in the foreign body reaction G. s. n. (2013). *Molecular and cellular mechanisms of collagen degradation in the foreign body reaction*. University of Groningen.
- Ye, Q., van Amerongen, M. J., Sandham, J. A., Bank, R. A., & van Luyn, M. J. A. (2011). Site-specific tissue inhibitor of metalloproteinase-1 governs the matrix metalloproteinases-dependent degradation of crosslinked collagen scaffolds and is correlated with interleukin-10. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 264–274.
- Zhang, Q., Lu, H., Kawazoe, N., & Chen, G. (2013). Preparation of collagen scaffolds with controlled pore structures and improved mechanical property for cartilage tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 28(5), 426–438. <http://doi.org/10.1177/0883911513494620>
- Zhang, Z., & Michniak-Kohn, B. B. (2012). Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics*, 4, 26–41. <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010026>